



**HAL**  
open science

# IDENTIFICATION DE NOUVEAUX DETERMINANTS MOLECULAIRES DE L'INTERACTION DU RECEPTEUR DES DIHYDROPYRIDINES AVEC LE RECEPTEUR A LA RYANODINE

Hicham Bichraoui

► **To cite this version:**

Hicham Bichraoui. IDENTIFICATION DE NOUVEAUX DETERMINANTS MOLECULAIRES DE L'INTERACTION DU RECEPTEUR DES DIHYDROPYRIDINES AVEC LE RECEPTEUR A LA RYANODINE. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00615499

**HAL Id: tel-00615499**

**<https://theses.hal.science/tel-00615499>**

Submitted on 19 Aug 2011

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

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

# THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE**

Spécialité: physiologie, physiopathologie et pharmacologie

---

## **IDENTIFICATION DE NOUVEAUX DETERMINANTS MOLECULAIRES DE L'INTERACTION DU RECEPTEUR DES DIHYDROPYRIDINES AVEC LE RECEPTEUR A LA RYANODINE**

---

*Directeur de thèse : Michel Ronjat*

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Hicham BICHRAOUI**

Le 30 septembre 2010

**Devant le jury composé de :**

Hervé DARBON, rapporteur  
Jean Marc SABATIER, rapporteur  
Susan TREVES, examinatrice  
Bruno ALLARD, examinateur  
Stefan NONCHEV, examinateur  
Michel RONJAT, directeur de thèse

Thèse réalisée au sein de l'Institut des neurosciences de Grenoble (GIN) dans l'équipe 3 « Canaux  
Calciques, Fonctions et Pathologies »  
INSERM U836







# Sommaire

## *INTRODUCTION ET RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES* \_\_\_\_\_ 12

## **Chapitre 1 : le muscle squelettique** \_\_\_\_\_ 12

### **1.1 Organisation structurale du muscle squelettique** \_\_\_\_\_ 12

1.1.1 Anatomie du muscle \_\_\_\_\_ 12

1.1.2 Organisation et structure des fibres musculaires \_\_\_\_\_ 13

1.1.3 Structure des myofibrilles et de l'appareil contractile \_\_\_\_\_ 14

### **1.2 Mécanisme de la contraction et de la relaxation musculaire** \_\_\_\_\_ 18

1.2.1 Mécanisme général \_\_\_\_\_ 18

1.2.2 Mécanisme moléculaire \_\_\_\_\_ 19

### **1.3 Organisation et rôle du système membranaire de la fibre musculaire squelettique** \_\_\_\_\_ 21

1.3.1 Le sarcolemme \_\_\_\_\_ 21

1.3.1.1 Les tubules transverses ou système tubulaire transverse \_\_\_\_\_ 21

1.3.1.2 Les cavéoles et la cavéoline 3 dans les muscles squelettiques \_\_\_\_\_ 22

1.3.1.2.1 Structure et rôle \_\_\_\_\_ 22

1.3.1.2.2 Les cavéolinopathies \_\_\_\_\_ 24

1.3.1.2.3 Tubules T et Cav-3 \_\_\_\_\_ 25

1.3.2 Le réticulum sarcoplasmique \_\_\_\_\_ 25

1.3.3 La triade \_\_\_\_\_ 26

### **1.4 Principaux éléments de régulation de l'homéostasie calcique** \_\_\_\_\_ 27

1.4.1 Systèmes de régulation « ON » \_\_\_\_\_ 29

1.4.1.1 Les canaux calciques dépendants du voltage (CCVDs) \_\_\_\_\_ 29

1.4.1.1.1 Les CCVDs du muscle squelettique : Canaux de type L et T \_\_\_\_\_ 31

1.4.1.2 Les canaux TRP et l'entrée capacitive de calcium \_\_\_\_\_ 32

1.4.1.3 Le Récepteur de la ryanodine (RyR) \_\_\_\_\_ 33

1.4.1.4 Les Récepteurs de l'IP3 (IP3Rs) \_\_\_\_\_ 33

1.4.2 Systèmes de régulation « OFF » \_\_\_\_\_ 33

1.4.2.1 Recapture du  $Ca^{2+}$  par le RS : les pompes calciques – SERCA- \_\_\_\_\_ 34

1.4.2.2 Les systèmes d'extrusion du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique : échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  et pompes calciques de la membrane plasmique. \_\_\_\_\_ 35

1.4.2.2.1 Les échangeurs  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) \_\_\_\_\_ 35

1.4.2.2.2 Les pompes  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA) \_\_\_\_\_ 36

1.4.2.3 Les protéines tampons liant le  $Ca^{2+}$  \_\_\_\_\_ 37

1.4.3 Conclusion \_\_\_\_\_ 39

## **Chapitre 2** \_\_\_\_\_ 40

## **Le couplage EXCITATION-CONTRACTION** \_\_\_\_\_ 40

### **2.1 Les protéines responsables du CEC** \_\_\_\_\_ 41

2.1.1 Le récepteur des dihydropyridines (DHPR) \_\_\_\_\_ 41

2.1.1.1 Rôles du DHPR \_\_\_\_\_ 42

2.1.1.2 Structure moléculaire du DHPR: les différentes sous-unités \_\_\_\_\_ 44

2.1.2 Le récepteur de la ryanodine, canal calcique du réticulum sarcoplasmique	52
2.1.2.1 Généralités	52
2.1.2.2 Structure tridimensionnelle	53
2.1.2.3 Propriétés électrophysiologiques et biophysiques du canal calcique RyR	56
2.1.2.4 Pharmacologie : régulation par des facteurs exogènes	56
2.1.2.5 Un modèle de souris déficientes pour RyR1 : les souris dyspédiques	58
2.1.2.6 Contrôle de l'activité du RyR	59
2.1.2.6.1 Les protéines associées au RyR	59
2.1.2.6.2 Régulation par des ligands non protéiques ( $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, $\text{Mg}^{2+}$ )	64
2.1.3 Organisation spatiale du DHPR et du RyR au sein de la triade	65
2.1.3.1 Dans le muscle squelettique	65
2.1.3.2 Dans le muscle cardiaque	67
<b>2.2 Mécanismes du couplage excitation-contraction (CEC)</b>	<b>68</b>
2.2.1 Le couplage orthograde DHPR/RyR	68
2.2.1.1 Identification du DHPR comme détecteur du voltage : un mouvement de charges intramembranaire déclencheur du relâchement de $\text{Ca}^{2+}$ hors de la RS	68
2.2.1.2 Interactions DHPR/RyR : la sous-unité $\alpha 1\text{S}$ du DHPR au centre du CEC	69
2.2.1.3 Identification du RyR comme canal calcique responsable du relâchement du calcium hors du RS	70
2.2.2 Existence d'un couplage rétrograde	71
2.2.3 Le CEC dans la cellule musculaire cardiaque	72

## **Chapitre 3** \_\_\_\_\_ **74**

### **Les domaines du RYR et du DHPR impliqués dans le couplage-excitation contraction de type squelettique** \_\_\_\_\_ **74**

<b>3.1 La sous-unité <math>\alpha 1</math> du DHPR</b>	<b>75</b>
3.1.1 La boucle II-III	75
3.1.2 La boucle III-IV	83
3.1.3 Le domaine N-terminal	84
3.1.4 Le domaine C-terminal	84
<b>3.2 La sous-unité <math>\beta 1a</math>.</b>	<b>85</b>
<b>3.3 Le récepteur de la ryanodine</b>	<b>89</b>
<b>3.4 La maurocalcine, un outil pour l'étude du CEC</b>	<b>92</b>

## **MATERIELS ET METHODES** \_\_\_\_\_ **98**

<b>1. Analyse des protéines</b>	<b>98</b>
1.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide	98
1.2 Immunodétection des protéines par western blot	98
<b>2. Clonage, expression et purification de protéines recombinantes</b>	<b>100</b>
2.1 Clonage	100
2.2 Expression des protéines recombinantes dans un système bactérien	101
2.3 Purification des protéines recombinantes	103
2.4 Synthèse de protéine in vitro (traduction in vitro)	106
<b>3. Obtention des peptides biotinylés</b>	<b>106</b>

<b>4. Techniques de mesure des interactions protéines/protéines</b>	<b>107</b>
4.1 La co-précipitation sur billes ou « Pull-down »	107
4.2 Co-immunoprécipitation de complexes protéiques	109
<b>5. Préparation de vésicules de RS et mesure de la liaison de ryanodine</b>	<b>109</b>
5.1 Préparation des vésicules de RS (ou vésicules de HSR)	109
5.2 Liaison de ryanodine sur les HSR	110
<b>6. Culture primaire, transfection et imagerie calcique sur des myotubes de souris transgéniques</b>	<b>111</b>
6.1 Protocole de préparation des cultures de myotubes	111
6.2 Protocole de transfection	113
6.3 Imagerie calcique sur les myotubes.	113
<b>7. Étude des canaux ioniques par expression dans un système hétérologue</b>	<b>114</b>
7.1 Protocole de préparation des ovocytes	114
7.2 Transcription de l'ADN et injection des ovocytes	115
7.3 Enregistrement des courants en double électrode	116
<b><i>RESULTATS ET DISCUSSION</i></b>	<b>122</b>
<b>Objectifs</b>	<b>122</b>
<b>1. Interactions au sein de la sous-unité <math>\alpha 1S</math> du DHPR</b>	<b>123</b>
Introduction	123
1.1 Interactions inter-boucles au sein de la sous-unité $\alpha 1S$	123
1.2 Etude du rôle fonctionnel des interactions	127
1.3 Etude de l'interaction de la CAV-3 avec la sous-unité $\alpha 1S$	128
Discussion et perspectives	132
<b>2. Etude de l'interaction <math>\beta 1a</math> /RyR1</b>	<b>134</b>
Introduction	134
2.1 L'interaction $\beta 1a/\alpha 1S$ modifie l'interaction $\beta 1a/RyR1$	134
2.2 Le domaine C terminal de la sous-unité $\beta 1a$ contrôle l'interaction $\beta 1a/RyR1$	136
Discussion et perspectives	141
<b>3. Etude structurale du domaine de RyR1 correspondant au site d'interaction de la MCa et du domaine A du DHPR</b>	<b>144</b>
Introduction	144
3.1 Identification d'une séquence de RyR1 portant le site de liaison de la MCa et du domaine A du DHPR.	145
3.2 Expression et purification de la protéine F7.2.3	147
3.3 Étude structurale du site d'interaction	150

Discussion et perspectives _____	154
<b>4. Etude de l'effet de la MCa sur les myotubes dysgéniques _____</b>	<b>156</b>
<b>5. Caractérisation de la MCa-D, un analogue pharmacologiquement inerte de la MCa _____</b>	<b>162</b>
Effet sur la liaison de ryanodine _____	163
Effet sur le relâchement de Ca <sup>2+</sup> _____	164
<b><i>DISCUSSION GÉNÉRALE _____</i></b>	<b>168</b>
<b><i>ANNEXES _____</i></b>	<b>176</b>
<b><i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</i></b>	<b>192</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Structure du muscle squelettique : des tendons aux constituants de la fibre musculaire .....	13
Figure 2 : La jonction neuromusculaire.....	14
Figure 3 : Filaments fins et épais formant les myofibrilles.....	16
Figure 4: Vue d'ensemble de l'ultrastructure d'un sarcomère dans une fibre musculaire squelettique .....	17
Figure 5: Mécanisme moléculaire de la contraction musculaire.....	20
Figure 6 : Les systèmes membranaires de la fibre musculaire squelettique .....	21
Figure 7: Formation des cavéoles et cavéoline.....	23
Figure 8: Structure primaire et topologie de la cavéoline .....	24
Figure 9 : Vue détaillée du réticulum sarcoplasmique et des tubules T de la fibre musculaire squelettique.....	26
Figure 10 : Coupe longitudinale de deux triades de muscle de poisson observées par microscopie électronique. ...	27
Figure 11 : Principaux systèmes de régulation de l'homéostasie calcique de la cellule musculaire.....	28
Figure 12: Visualisation de calsésquestrine dans des citernes terminales d'une triade hydratée puis congelée (« frozen hydrated »).....	38
Représentation « surface rendered » d'une triade isolée.....	38
Figure 13: Représentation schématique de la structure moléculaire d'un canal calcique voltage dépendant.....	41
Figure 14: Organisation structurale de la sous-unité $\alpha 1S$ .....	45
Figure 15: Structure tridimensionnelle de la sous-unité $\beta$ .....	48
Figure 16: Modulation des CCVDs squelettique et cardiaque par la sous-unité auxiliaire $a2\delta$ .....	51
Figure 17: Image d'une triade observée en microscopie électronique.....	54
Figure 18: Représentation de la structure 3D du RyR .....	54
Figure 19: Représentation tridimensionnelle du RyR1 dans différentes vues .....	56
Figure 20: Représentation schématique de l'arrangement RyR/[triadine/Junctine/CSQ] au sein d'une triade ....	62
Figure 21: Représentation schématique de l'organisation des RyRs et des DHPRs au niveau des triades dans la fibre musculaire squelettique .....	66
Figure 22: Comparaison de l'activité contractile dans des cultures primaires de myotubes .....	70
Figure 23: Contractions induites par dépolarisation de myotubes dysgéniques exprimant des constructions chimériques de la sous-unité $\alpha 1S$ .....	76
Figure 24: Localisation des domaines définis par El-Hayek (1995) sur la boucle II-III. ....	77
Figure 25: Représentation schématique de sous-unité $\alpha 1S$ chimérique présentant des boucles II-III d'origine différente ( $\alpha 1S/M$ ). Alignement des séquences en acides aminés des boucles II-III d'origine squelettique ( $\alpha 1S$ ), cardiaque ( $\alpha 1C$ ) et de muscle squelettique de drosophile ( $\alpha 1M$ ). ....	78
Figure 26: Représentation schématique des différentes insertions de protéines fluorescentes au sein de la sous-unité $\alpha 1S$ . ....	80
Figure 27: Représentation schématique du rôle des différentes boucles cytoplasmiques d' $\alpha 1S$ dans l'interaction DHPR/RyR1 et la formation de tétrades.....	82
Figure 28: Représentation schématique du rôle de la sous-unité $\beta 1a$ dans le contrôle de l'interaction $\alpha 1S/RyR$ ...88	
Figure 29 : Schéma résumant les différentes interactions et sites impliqués dans le couplage entre la sous-unité $\alpha 1S$ et le RyR1 .....	89
Figure 30: La maurocalcine et le domaine A du DHPR .....	93
Figure 31: Schéma du montage de la cassette de transfert pour un western blot .....	99
Figure 32: Schéma des différentes étapes permettant l'expression et la purification de protéines recombinantes .....	102
Figure 33: Interaction entre les résidus histidines de l'étiquette 6-His et une matrice Ni-NTA .....	105
Figure 34: Principe de la co-précipitation sur bille ou « pull-down ».....	107
Figure 35: Embryons de souris prélevés à E18.....	112
Figure 36: Les différentes étapes de l'étude de canaux ioniques exprimés dans l'ovocyte de xénope .....	118
Figure 37: Schéma des protéines recombinantes utilisées au cours de l'étude des interactions au sein de la sous-unité $\alpha 1S$ .....	124

Figure 38: Interaction des boucles I-II et II-III de la sous-unité $\alpha 1S$ .....	125
Figure 39: L'interaction de la boucle I-II avec la boucle II-III implique le domaine A. ....	125
Figure 40: Interaction de la boucle III-IV avec le domaine A .....	126
Figure 41: Courants de type L mesurés sur des ovocytes de xénope exprimant l'isoforme cardiaque ou squelettique de la sous-unité $\alpha 1$ .....	128
Figure 42: Interaction de Cav-3 avec les différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité $\alpha 1S$ .....	130
Figure 43: Mesure de l'affinité de la liaison Cav-3/boucle I-II.....	131
Figure 44: Schéma résumant les interactions intramoléculaires au sein de la sous-unité $\alpha 1S$ .....	132
Figure 45 : La sous-unité $\beta 1a$ interagit avec RyR1 .....	135
Figure 46: Interaction $\beta 1a$ /RyR1 en présence ou en absence de peptide AID.....	136
Figure 47: Représentation schématique de différentes constructions de la sous-unité $\beta 1a$ .....	137
Figure 48 : La construction de $\beta 1a$ délétés du domaine C-terminale interagit toujours avec le domaine AID.....	138
Figure 49 : Tableau récapitulatif des expériences de co-précipitation sur billes réalisées avec les différentes constructions de la sous-unité $\beta 1a$ .....	139
Figure 50: Mesure des transitoires calciques dans des myotubes $\beta 1$ -null exprimant différentes constructions de la sous-unité $\beta 1a$ .....	140
Figure 51 : Structure cristallographique de la sous-unité $\beta 1a$ en interaction avec AID.....	143
Figure 52: Les différents fragments de RyR1 étudiés.....	144
Figure 53: Représentation schématique des différents fragments F7.2 de RyR1.....	146
Figure 54: Interaction des fragments F7.2.1 et F7.2.2 avec la M $Ca$ et le peptide A.....	146
Figure 55: Interaction du fragment F7.2.3 avec la M $Ca$ et le peptide A.....	147
Figure 56: Chromatogramme de la purification de la protéine recombinante His/F7.2.3 sur colonne d'affinité .	148
Figure 57: Chromatogramme de la purification de la protéine recombinante F7.2.3 sur colonne C18 en phase inverse.....	149
Figure 58: Analyse de différentes fractions protéiques correspondant aux différentes étapes de purification.....	150
Figure 59: Spectre HSQC $^1H$ - $^{15}N$ de la protéine F7.2.3.....	151
Figure 60: Superposition des spectres HSQC $^1H$ - $^{15}N$ de la forme libre du fragment F7.2.3 et de ceux obtenus après ajout de différentes concentrations de M $Ca$ .....	152
Figure 61: Exemple de variations chimiques induites par la M $Ca$ mesurées pour deux acides aminés. ....	153
Figure 62: Effet de la dépolarisation au KCl et de la M $Ca$ sur des myotubes normaux .....	157
Figure 63 : Effet de la M $Ca$ sur les myotubes dysgéniques.....	159
Figure 64: Effet des M $Ca$ -D et -L sur la liaison de ryanodine .....	163
Figure 65: Effet des M $Ca$ -D et -L sur le relâchement de $Ca^{2+}$ à partir de vésicules de HSR .....	164

## Liste des tableaux et Annexes

Tableau I : Nomenclature des canaux calciums dépendants du voltage. ....	31
Tableau II : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques du DHPR. ....	42
Tableau III : Classification et distribution tissulaire des différents isoformes de la sous-unité $\beta$ .....	47
Tableau IV: Caractéristiques des différents isoformes du RyR.....	53
Tableau V: Protéines interagissant avec le RyR.....	63
Tableau VI: Liste des anticorps utilisés .....	100
Tableau VII: Caractéristiques des différents vecteurs utilisés.....	101
Tableau VIII: Composition des tampons de lyse pour les bactéries.....	104
Tableau IX: Solutions utilisées pour la préparation des vésicules de HSR.....	110
Tableau X: Solutions et milieux pour la culture primaire de myotubes .....	112
Tableau XI: Solutions utilisées pour la préparation des ovocytes de xénopes.....	116
Tableau XII: Solutions utilisées pour l'enregistrement de courants calciums sur ovocytes de xénopes en doubles électrodes .....	117

ANNEXE 1: Revue parut dans le livre <i>Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology</i> , "Maurocalcine, a tool for the study of the excitation-contraction coupling process" .....	176
ANNEXE 2: Article en cours de soumission, "Caveolin-3 is a direct molecular partner of the $Ca_v1.1$ subunit of the skeletal muscle L-type calcium channel" .....	178
ANNEXE 3: Article parut dans <i>Journal of Biological Chemistry</i> , "D-maurocalcine, a pharmacologically-inert efficient cell penetrating peptide analogue".....	180
ANNEXE 4: Article parut dans <i>Journal of Physiology</i> , "In vivo expression of G-protein beta1gamma2 dimer in adult mouse skeletal muscle alters L-type calcium current and excitation-contraction coupling". .....	182
ANNEXE 5: Article parut dans <i>Journal of Biological Chemistry</i> , "Direct Peptide Interaction with Surface Glycosaminoglycans Contributes to the Cell Penetration of Maurocalcine".....	184
ANNEXE 6: Liste des acides aminés .....	186
ANNEXE 7 : Composition du milieu minimum enrichi en $^{15}N$ et $^{13}C$ .....	187
ANNEXE 8 : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Cav1.2.....	188

## Liste des abréviations

<b>aa</b> : acide aminé	<b>Kb</b> : kilo base
<b>ABP</b> : AID Binding Pocket	<b>Kd</b> : Constance de dissociation
<b>ADN</b> : Acide Désoxyribonucléique	<b>kDa</b> : Kilo Dalton
<b>ADNc</b> : Acide Désoxyribonucléique complémentaire	<b>kDa</b> : Kilo Dalton
<b>AID</b> : Alpha Interaction Domain	<b>LVA</b> : Low Voltage Activated
<b>AMPc</b> : Adénosine Monophosphate Cyclique	<b>MAGUK</b> : Membrane-Associated Guanylate Kinase
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	<b>MCa</b> : maurocalcine
<b>ARNm</b> : ARN messenger	<b>Mg<sup>2+</sup></b> : Ion magnesium
<b>ATP</b> : Adenosine Tri-Phosphate	<b>Na<sup>+</sup></b> : Ion sodium
<b>ATP</b> : Adénosine Triphosphate	<b>NCA</b> : Nuclear Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>Ba<sup>2+</sup></b> : Ion barium	<b>NCX</b> : Echangeurs Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>BID</b> : Beta Interaction Domain	<b>NMDA</b> : N-Méthyl-D-Aspartate
Bisphosphate	<b>N-ter</b> : Amino-terminal
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : Ion calcium	<b>pA</b> : peptide A
<b>Ca<sub>v</sub></b> : Canal Calcique activé par le voltage	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline
<b>CBPs</b> : Calcium Binding Proteins	<b>pC</b> : peptide C
<b>cDNA</b> : complementary DNA	<b>PCR</b> : Polymerase Chain Reaction
<b>CEC</b> : Couplage Excitation-Contraction	<b>PIP<sub>2</sub></b> : Phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate
<b>CICR</b> : Calcium-Induced Calcium Release	<b>PMCA</b> : Plasma Membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>CSQ</b> : Calséquestrine	<b>RE</b> : Réticulum Endoplasmique
<b>Cter</b> : Carboxy-terminal	<b>ROC</b> : Receptor Operated Channel
<b>DAG</b> : Diacylglycérol	<b>ROS</b> : Reactive Oxygen Species
<b>DHP</b> : dihydropyridines	<b>RS</b> : Réticulum Sarcoplasmique
<b>DHPR</b> : récepteur sensible à la DHP	<b>RyR</b> : Récepteur à la Ryanodine
<b>DICR</b> : Depolarisation-Induced Calcium Release	<b>SDS-PAGE</b> : Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>DMEM</b> : Dulbecco's Modified Eagle Medium	<b>SERCA</b> : Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>DO</b> : Densité Optique	<b>SH3</b> : Src Homology-3
<b>ECCE</b> : Excitation Coupled Calcium Entry	<b>siRNA</b> : small interfering RNA
<b>EGFP</b> : Enhanced Green Fluorescent Protein	<b>SOC</b> : Store Operated Channels
<b>EGTA</b> : Glycol Ether Diamine Tetraacetic Acid	<b>TRP</b> : Transient Receptor Potential
<b>FRET</b> : Fluorescence Resonance Energy Transfer	<b>VOC</b> : Voltage Operated Channel
<b>GDP</b> : Guanosine Diphosphate	<b>YFP</b> : Yellow Fluorescent Protein
<b>GDP</b> : Guanosine Diphosphate	
<b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein	
<b>GK</b> : Guanylate Kinase	
<b>GST</b> : Gluthation-S-Transferase	
<b>GTP</b> : Guanosine Triphosphate	
Guanylate Kinase	
<b>HRP</b> : HorseRadish Peroxydase	
<b>HSR</b> : Heavy sarcoplasmic reticulum	
<b>HVA</b> : High Voltage Activated	
<b>IP<sub>3</sub></b> : Inositol Trisphosphate	
<b>IP<sub>3</sub>R</b> : Récepteur à l'IP <sub>3</sub>	
<b>IPTG</b> : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	

INTRODUCTION ET RAPPELS  
BIBLIOGRAPHIQUES



# INTRODUCTION ET RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

## CHAPITRE 1 : LE MUSCLE SQUELETTIQUE

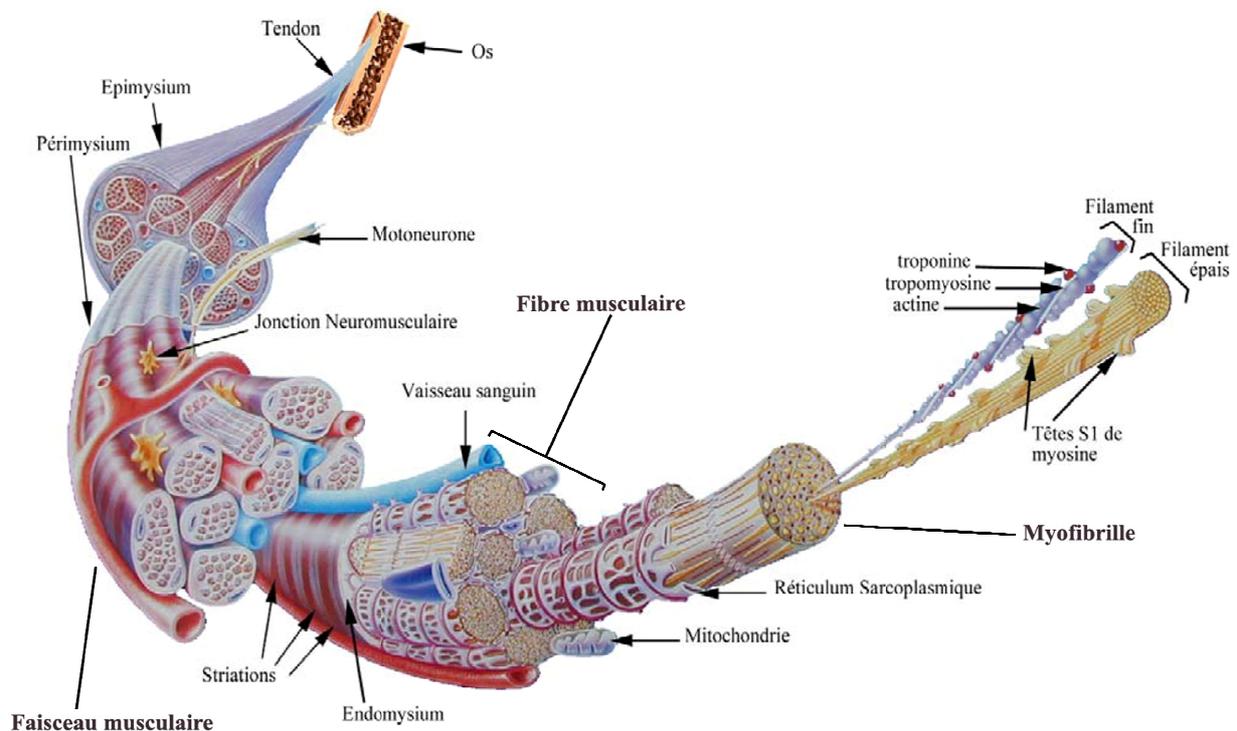
Le muscle désigne le tissu contractile qui permet le mouvement. Il représente environ 40 % de la masse corporelle. Ce mot tiendrait son origine d'une dérive sémantique partant de la constatation que des muscles en action ressemblaient à des souris s'activant sous la peau. Nos anciens leur auraient ainsi donné le nom de « muscle », en référence à « mus musculus » (« petite souris » en latin). La principale caractéristique de cet organe est sa capacité à transformer l'énergie chimique en énergie mécanique ; c'est-à-dire à produire une force. On distingue trois catégories de muscles : les muscles lisses, qui se contractent lentement et involontairement et que l'on retrouve par exemple dans les parois du tube digestif, des artères et des bronches ; le muscle cardiaque qui assure la circulation du sang ; et enfin, les muscles striés squelettiques dont la fonction est de mobiliser les différentes parties du squelette pour assurer la posture, et la manipulation. Dans ce premier chapitre, je décrirai brièvement quelques généralités sur la structure et la physiologie des muscles squelettiques, leur mécanisme de contraction et les protéines mises en jeu. L'importance du calcium dans la régulation de la contraction sera aussi abordée.

### 1.1 Organisation structurale du muscle squelettique

#### 1.1.1 Anatomie du muscle

Les muscles sont principalement composés d'un ensemble de cellules (les fibres musculaires) formant des faisceaux musculaires. Les fibres musculaires sont insérées sur les os par l'intermédiaire de tendons. Ces derniers sont constitués par le prolongement de tissus conjonctifs élastiques (appelés aussi gaines conjonctives). Ces gaines sont composées de l'épimysium correspondant à la couche la plus externe entourant le muscle, du périmysium qui entoure les faisceaux de fibres ; et enfin, de l'endomysium, formant une couche plus mince, entourant chaque fibre. Ces gaines conjonctives assurent le maintien de la structure musculaire au repos et permettent la transmission de la force aux articulations durant la contraction. Ce tissu conjonctif participe à l'élasticité du muscle. Le muscle est également irrigué par un réseau de vaisseaux sanguins qui

apporte aux cellules musculaires les nutriments et l'oxygène dont elles ont besoin et permet l'élimination des déchets notamment le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) (figure 1).



**Figure 1 : Structure du muscle squelettique : des tendons aux constituants de la fibre musculaire**

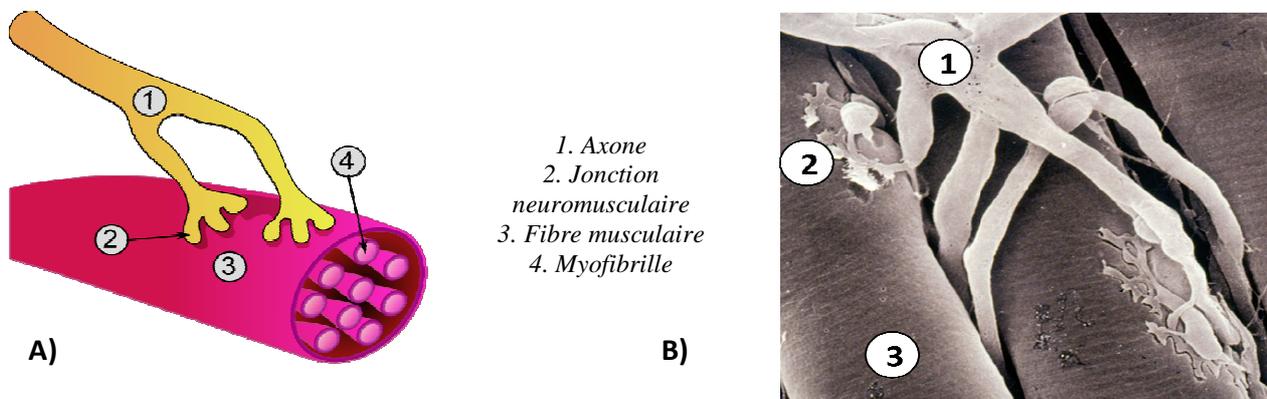
Chaque muscle est composé de milliers de fibres regroupées en faisceaux et enveloppées de tissus conjonctifs. Chaque fibre musculaire est elle-même composée de myofibrilles formées par un assemblage complexe de myofilaments fins et épais. Les cellules musculaires striées mesurent plusieurs dizaines de centimètres de longueur.

### **1.1.2 Organisation et structure des fibres musculaires**

Une fibre musculaire possède une structure syncytiale, formée par un cytoplasme plurinucléé issu de la fusion au cours du développement embryonnaire de nombreuses petites cellules pré-musculaires immatures, les myoblastes. Ces derniers forment les myotubes, qui formeront finalement les fibres musculaires adultes après maturation. Leur diamètre est compris entre 20 et 150  $\mu\text{m}$  et leur longueur peut atteindre plusieurs dizaines de centimètres chez l'Homme.

Les cellules musculaires contiennent donc plusieurs noyaux situés sous la membrane plasmique (le sarcolemme), de nombreuses mitochondries stockant l'énergie de la cellule et un réticulum endoplasmique (RE) très développé qui est une réserve de calcium intracellulaire (le réticulum sarcoplasmique, RS). Une grande partie de la fibre musculaire est occupée par des éléments contractiles, les myofibrilles (de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre), elles-mêmes composées de myofilaments. Ces myofibrilles constituent le support de la contraction musculaire. Le RS et le sarcolemme forment un réseau membranaire complexe enveloppant les myofibrilles (figure 1).

L'activité contractile de chaque fibre musculaire est régulée par un seul motoneurone. Un même motoneurone innerve plusieurs fibres qui forment une unité motrice (figure 1 et 2). L'intensité de la contraction d'un muscle est fonction du nombre d'unités motrices qui ont été activées. Ci-dessous une vue simplifiée d'une jonction neuromusculaire.



**Figure 2 : La jonction neuromusculaire**

A. Vue globale simplifiée d'une jonction neuromusculaire, B. Vue au microscope électronique à balayage

Les fibres musculaires sont donc constituées de structures hautement différenciées et très organisées aussi bien au niveau macroscopique que microscopique, avec un système membranaire spécifique très développé.

### **1.1.3 Structure des myofibrilles et de l'appareil contractile**

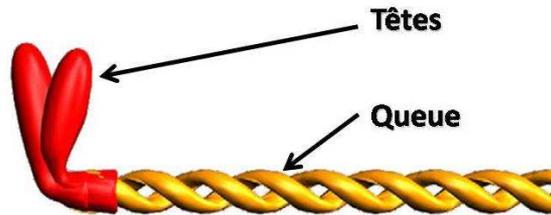
La contraction résulte d'un processus coordonné basé sur l'interaction de deux protéines formant les myofibrilles, l'actine et la myosine (figure 1). L'organisation des myofibrilles les unes par rapport aux autres permet la mise en place du phénomène contractile. Ces interactions sont sous le contrôle de mécanismes fins de variation et de détection de la concentration cytosolique de calcium. Une augmentation de cette concentration est le facteur déclenchant la contraction. Ces mécanismes impliquent plusieurs complexes protéiques régulateurs. La cohésion et la régulation de cet ensemble de protéines sont assurées par des protéines de structures et un réseau de membranes complexe (RS, sarcolemme).

Dans la fibre musculaire squelettique, les myofilaments composant les myofibrilles sont arrangés parallèlement à l'axe de la fibre selon un modèle très régulier et précis. On trouve deux types de myofilaments, les filaments fins et les filaments épais. La fibre musculaire présente donc une striation transversale caractéristique due à l'organisation des protéines contractiles des

myofilaments (essentiellement l'actine et la myosine) en une succession de sarcomères, unité anatomo-fonctionnelle de la myofibrille.

- ✓ Les **filaments épais** (15 nm de diamètre) formés par l'assemblage de molécules de myosine ont une forme assimilable à un club de golf (figure 3). Chaque molécule de myosine possède deux chaînes lourdes (200 KDa) auxquelles sont associées deux chaînes légères (18 à 22 KDa). Les chaînes lourdes forment une hélice par entrelacement de leur extrémité C-terminale (encore appelées « queue de myosine »). L'extrémité N-terminale de ces chaînes lourdes est de structure globulaire et constitue, en s'associant avec les chaînes légères, les « têtes de myosine » qui sont dirigées vers l'extérieur du filament. Les têtes de myosine présentent une activité ATPasique importante pour le processus de contraction.
  
- ✓ Les **filaments fins** (5 à 8 nm de diamètre) sont essentiellement composés de polymères d'actine (figure 3). L'actine monomérique est une protéine globulaire (actine G). Elle polymérise en milieu salin pour former une structure en double hélice serrée. Chaque molécule d'actine dispose d'un site d'interaction avec une tête de myosine. Les myofilaments fins sont aussi associés à deux protéines régulatrices : la tropomyosine (Tm), protéine fibreuse formant un filament stabilisant le filament d'actine, et la troponine (Tn) qui est un complexe polypeptidique capable de fixer fortement le calcium, régulièrement espacé le long du filament d'actine face aux têtes de myosine (figure 3). Les filaments fins sont le support architectural indispensable pour le processus de la contraction et chacune des protéines qui le composent y joue un rôle clef.

## A) Filament épais de myosine



## B) Filament fin d'actine

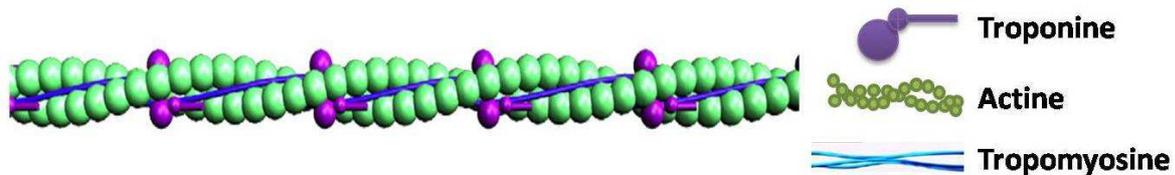
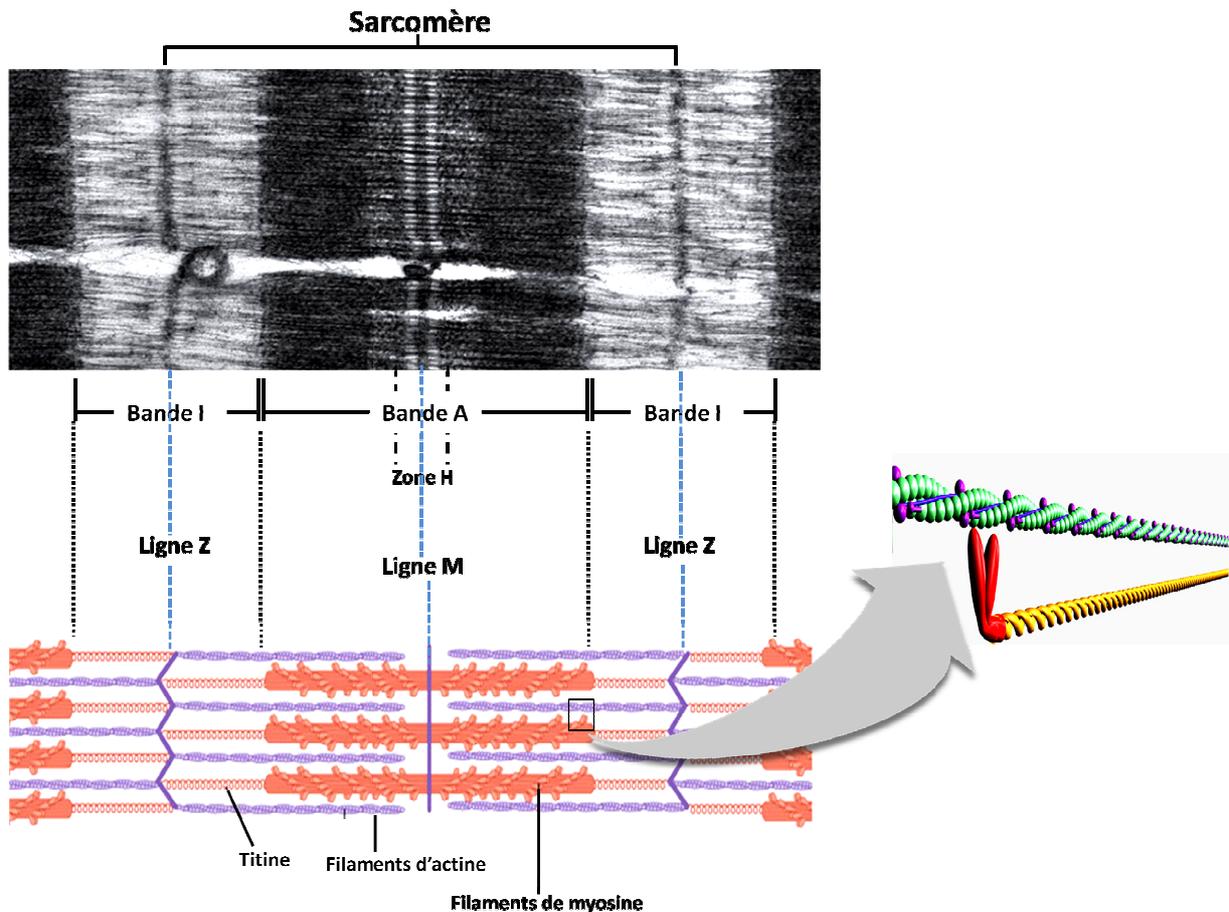


Figure 3 : Filaments fins et épais formant les myofibrilles

Chaque myofibrille est composée d'une multitude de sarcomères alignés. En microscopie électronique, des striations caractéristiques sont observées qui correspondent à l'alternance de différentes bandes (figure 4) : des bandes sombres ou bandes A (anisotrope), correspondantes aux zones de chevauchement des filaments d'actine et de myosine, et des bandes plus claires, ou bandes I (isotrope), constituées uniquement de filaments fins d'actine. Au milieu de chaque bande A, on distingue une zone plus claire appelée zone H, où les filaments d'actine sont absents. Cette zone H est elle-même centrée par une ligne (ou disque) M formée par l'assemblage de protéines sur les filaments épais. Une zone plus dense marque le centre des bandes I et est appelée disque Z ou ligne Z en raison de la forme adoptée par l'actine au niveau de cette zone. Au sein d'une myofibrille, chaque sarcomère est délimité par deux lignes Z. Ainsi, un sarcomère est caractérisé par la succession suivante : une ligne Z, une demi-bande I, une bande A, une demi-bande I, une ligne Z (figure 4). L'organisation régulière de ces structures est donc responsable de l'aspect strié du muscle squelettique aussi appelé muscle strié.



**Figure 4: Vue d'ensemble de l'ultrastructure d'un sarcomère dans une fibre musculaire squelettique**

(en Haut) Image obtenue en microscopie électronique : on peut observer deux sarcomères en parallèle ; (en bas) Représentation schématique du sarcomère ; (à droite) Zoom sur une zone d'interaction entre une tête de myosine et un filament fin d'actine.

Au cours de la contraction, la longueur des sarcomères varie suite au coulisement des filaments fins et épais entre eux. Les lignes Z se rapprochent, entraînant un raccourcissement des sarcomères. Le sarcomère peut donc être vu comme l'unité structurale et fonctionnelle principale de la myofibrille, directement responsable de la contraction musculaire (Rigoard et al., 2009a).

L'interaction entre les têtes de myosine et l'actine est à la base de la contraction musculaire. Au sein d'un sarcomère, chaque tête de myosine peut interagir avec une molécule d'actine. On parle de « ponts d'actine et de myosine ». D'autres éléments structuraux composés de diverses protéines se superposent aux myofilaments contractiles décrits ci-dessus. Ces éléments sont non contractiles et ont pour rôle principal le maintien de l'organisation des myofibrilles (titine, protéine M, myomésine). Certaines de ces protéines ont des propriétés mécaniques qui les rendent responsables

de la transmission de la force produite par les éléments contractiles des myofilaments fins et épais, assurant ainsi la coordination de la contraction produite par chaque sarcomère. C'est notamment le rôle de la titine, une protéine fibreuse de grande taille (3000 kDa) qui représente environ 10% de la masse myofibrillaire. Celle-ci est ancrée dans la ligne Z et se prolonge le long de la myofibrille jusqu'à la ligne M (figure 4).

## **1.2 Mécanisme de la contraction et de la relaxation musculaire**

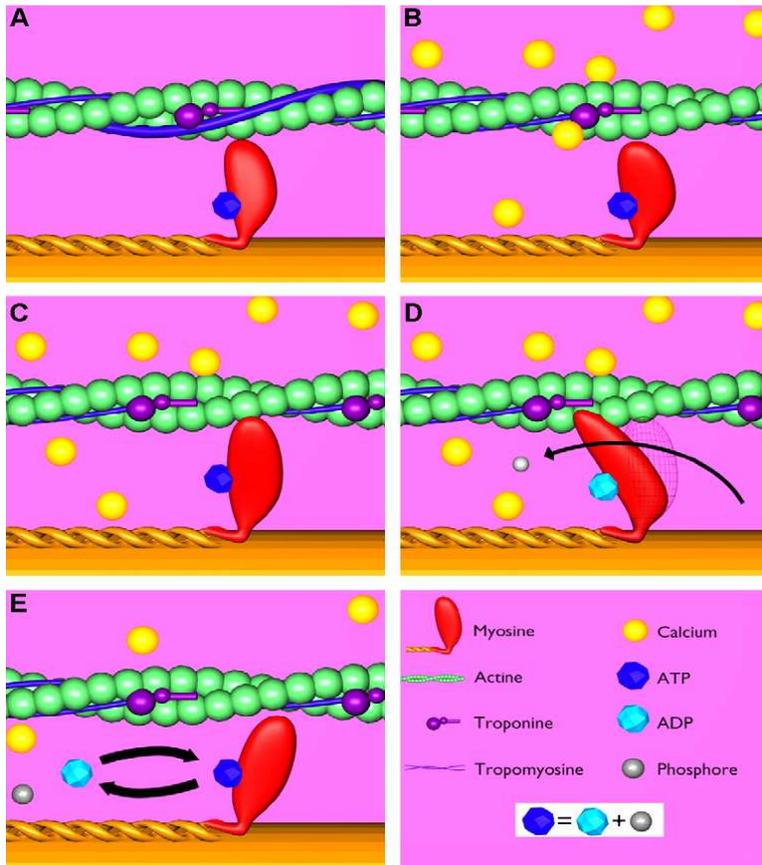
### **1.2.1 Mécanisme général**

La contraction musculaire est déclenchée par un stimulus électrique qui correspond à une dépolarisation de la membrane plasmique de la fibre musculaire. Chaque fibre musculaire reçoit l'innervation d'un motoneurone. Dans la terminaison nerveuse d'un motoneurone, l'arrivée d'un potentiel d'action (PA) déclenche la libération du neuromédiateur qui va activer l'ouverture de son récepteur spécifique, entraînant ainsi une dépolarisation locale du sarcolemme de la fibre musculaire. Cette dépolarisation résulte de l'activation des canaux sodiques puis potassiques localisés au niveau du sarcolemme. Par l'activation successive de ces canaux, la dépolarisation se propage le long du sarcolemme. Grâce à l'invagination de la membrane plasmique formant les tubules T, elle atteint simultanément et très rapidement l'ensemble des myofibrilles. Le résultat de la dépolarisation de la membrane plasmique est une libération rapide (1 à 2 ms) et massive du calcium contenu dans le RS. Ce relâchement de calcium dans le cytoplasme donne lieu à une élévation rapide et transitoire de la concentration cytoplasmique de calcium de l'ordre de 100 à 1000 fois. Ce calcium ainsi libéré se fixe sur les protéines contractiles entraînant une modification structurale des protéines composant les myofilaments et qui aboutit au glissement de ces myofilaments entre eux et donc à la contraction du muscle. L'élévation de la concentration cytoplasmique en calcium induit dans le même temps l'activation de pompes calciques qui transportent le calcium du cytoplasme vers le RS. Ce « repompage » du calcium vers le RS entraîne une diminution de la concentration cytoplasmique de calcium, sa dissociation des protéines contractiles, et donc la relaxation musculaire. Le calcium est ainsi le messenger principal du déclenchement de la contraction et les mécanismes de contrôle du relâchement du calcium hors du RS sont extrêmement importants pour la physiologie de la cellule musculaire. L'ensemble des étapes qui mène de la dépolarisation du sarcolemme à la libération de calcium hors du RS est appelé « couplage excitation-contraction » (CEC).

### **1.2.2 Mécanisme moléculaire**

Le mécanisme de contraction musculaire a donc pour origine un glissement des ponts d'actine et de myosine entre eux au sein du sarcomère. Ce mécanisme dit des filaments glissants a été initialement décrit par Huxley en 1975 (Huxley, 1975). Mais remontons un peu dans l'espace et le temps pour une description plus précise de l'enchaînement d'évènements moléculaires à l'origine de ce phénomène. Au repos, la concentration en calcium est faible dans le sarcoplasme et élevée dans le RS. Les sites d'interactions actines/myosines sont partiellement bloqués par la tropomyosine (Tm) (figure 5A). Comme décrite précédemment, la concentration calcique cytosolique est sous contrôle nerveux, la dépolarisation du sarcolemme entraîne alors la libération du calcium par le RS. Au sein de l'espace myofibrillaire, le calcium va se fixer sur les molécules de troponine (figure 5B). Cette fixation modifie la position des molécules de tropomyosine fixées sur la double hélice formée par le filament d'actine (figure 5C). Cette modification rend ainsi accessibles les sites d'interaction des têtes de myosine sur l'actine. Considérant qu'au repos, ce complexe Troponine/Tropomyosine bloque l'interaction myosine/actine, on peut parler d'une levée d'inhibition par ce complexe. L'interaction des têtes de myosine sur l'actine permet alors un glissement des filaments fins (actine) vers le centre des filaments épais (myosine) (figure 5C et 5D). Au niveau ultrastructural, les filaments fins pénètrent vers la ligne M à l'intérieur de la bande A. Les bandes I et H se rétrécissent alors que la bande A reste de longueur stable (figure 5). Ce glissement des myofilaments est donc dû à une interaction cyclique qui a lieu entre les molécules d'actine et de myosine engendrant une force contractile dont l'énergie est issue de l'hydrolyse de l'ATP.

Les têtes de myosine possèdent un site de fixation pour l'ATP. En présence d'ATP, l'interaction actine/myosine s'accompagne d'une hydrolyse de l'ATP en ADP ainsi que d'une libération de phosphate inorganique (Pi) (figure 5D) qui apporte l'énergie nécessaire au mouvement des têtes globulaires de myosine vers le centre du sarcomère. À ce stade de la contraction, l'actine est fortement liée aux têtes de myosine, la dissociation de l'ADP et du Pi puis l'arrivée d'une nouvelle molécule d'ATP sur la myosine entraîneront le détachement des têtes de myosine du filament d'actine et donc le démarrage d'un nouveau cycle (figure 5E et 5B). Notons qu'en l'absence d'ATP, les molécules d'actine et de myosine resteraient fixées l'une à l'autre et la relaxation musculaire serait bloquée. Citons là un exemple qui permettra aux amateurs de séries policières dont je fais partie de briller devant un épisode des « Experts » : ce blocage de la relaxation est en partie responsable du phénomène de rigidité observé sur un cadavre (appelé rigidité cadavérique).



**Figure 5: Mécanisme moléculaire de la contraction musculaire**

Tirée de (Rigoard et al., 2009b)

La contraction est basée sur un coulisement des filaments fins et épais suite aux interactions cycliques entre filaments d'actine et têtes de myosine. L'énergie nécessaire à la production de ce mouvement est issue de l'activité ATPasique portée par les têtes de myosine. [A] à [D] : Étapes du cycle attachement-détachement de la myosine sur l'actine permettant la contraction.

La diminution de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et l'arrêt de l'hydrolyse d'ATP permettent la relaxation musculaire. Sous ces effets combinés, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se détachent de la troponine, entraînant un mouvement de la tropomyosine qui rend les sites de fixation de la myosine sur l'actine à nouveau inaccessibles. Les filaments d'actine et de myosine glissent alors en sens inverse par un phénomène passif. Les sarcomères raccourcis pendant la phase de contraction retrouvent leur taille initiale. L'abaissement et le maintien de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique à son niveau basique se fait *via* une ATPase calcique située dans la membrane du RS. (SERCA, pour Sarco-Endoplasmique Reticulum Calcium ATPase) (Voir paragraphe 1.4.2.1).

Dans une fibre musculaire, c'est donc au sein du sarcomère que la force contractile est produite par les chevauchements et les glissements des filaments fins et épais, permettant l'allongement ou le raccourcissement des muscles. Ce processus est contrôlé principalement par le calcium et nécessite l'hydrolyse de molécules d'ATP par les têtes de myosine. L'ensemble du processus fait donc intervenir la transduction d'un signal électrique en un signal chimique lui-même traduit en énergie mécanique.

## 1.3 Organisation et rôle du système membranaire de la fibre musculaire squelettique

Pour que la contraction des fibres musculaires soit efficace, il est nécessaire que tous les sarcomères d'une même myofibrille puissent être activés de manière synchronisée. Une organisation tout à fait spécifique des systèmes membranaires au sein de la fibre musculaire permet cette synchronisation. Une myofibrille contient deux systèmes distincts de membranes impliqués dans l'activation de la contraction de muscle (figure 6) : (1) le sarcolemme enveloppe chaque myofibrille et s'invagine pour former le système tubulaire transverse (tubules T) pénétrant dans la fibre. (2) En regard de ces tubules T, le réticulum sarcoplasmique forme des citernes terminales qui constituent les lieux de stockage du calcium nécessaire à la contraction musculaire. La structure correspondant à la juxtaposition des tubules T et des citernes terminales est appelée triade.

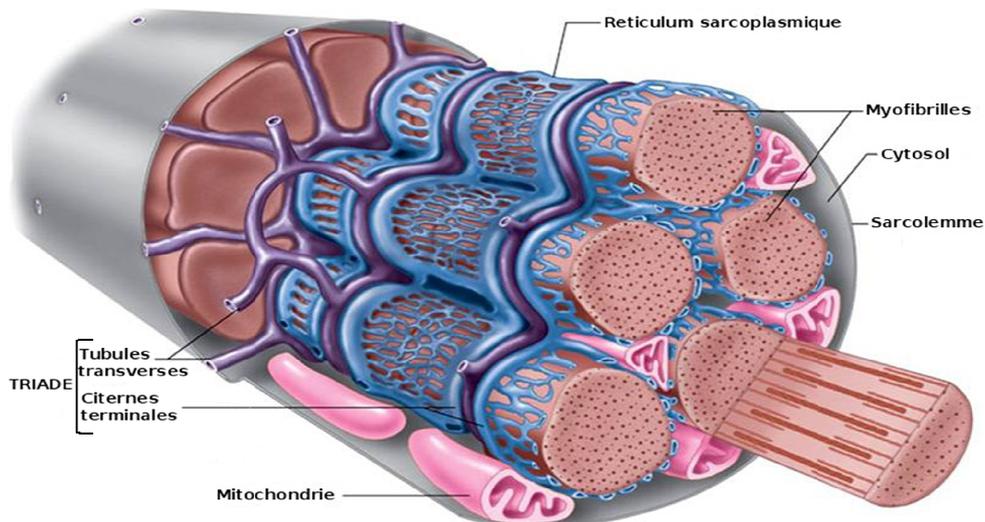


Figure 6 : Les systèmes membranaires de la fibre musculaire squelettique

### 1.3.1 Le sarcolemme

#### 1.3.1.1 Les tubules transverse ou système tubulaire transverse

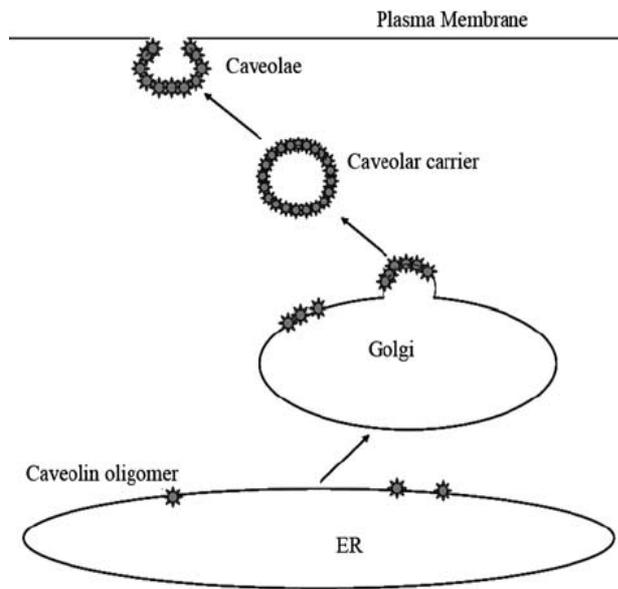
Le sarcolemme délimite la fibre et interagit avec la matrice extracellulaire. Il présente un réseau complexe et régulier d'invaginations de profondeur variable qui augmente la surface membranaire. Ces invaginations sont présentes sur toute la surface de la fibre musculaire et forment ce que l'on appelle les tubules transverse (tubules T) (figure 6 et 9).

Le système tubulaire transverse représente un réseau membranaire pénétrant en profondeur dans la fibre musculaire et entourant les myofibrilles (figure 6 et 9). Chez les mammifères, les tubules T sont positionnés au niveau des jonctions entre les bandes A et I de chaque sarcomère. On distingue deux formes différentes de tubules T : (1) les tubules T jonctionnels qui sont droits, plats et allongés. Ils sont perpendiculaires à l'axe de la fibre et se juxtaposent à la membrane du RS au niveau des triades. (2) les tubules T non jonctionnels plus étroits, suivent une trajectoire non rectiligne et relient les tubules jonctionnels entre eux (pour revue voir Peachey et Franzini-Armstrong, 1983). Les tubules T fournissent un axe de communication important entre l'extérieur de la fibre et les myofibrilles qui la composent. Ils servent principalement à acheminer rapidement le potentiel d'action à l'intérieur de la fibre musculaire afin de provoquer la contraction simultanée de tous les sarcomères.

### **1.3.1.2 Les cavéoles et la cavéoline 3 dans les muscles squelettiques**

#### **1.3.1.2.1 Structure et rôle**

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique moins profondes que le système tubulaire transverse (50 à 100 nm de profondeur) que l'on trouve dans la plupart des types cellulaires. Elles sont, cependant, détectées en plus grand nombre dans les adipocytes, les cellules endothéliales et les myocytes. Les cavéolines (Cav) sont les principales protéines marqueurs associées aux cavéoles (Rothberg et al., 1992). Outre leur rôle structural dans la biogenèse des cavéoles, il a été montré que les cavéolines participent à de nombreux processus cellulaires comme le transport vésiculaire, l'homéostasie du cholestérol, et la transduction des signaux (Razani, Woodman & Lisanti, 2002). La famille des cavéolines de mammifères est codée par 3 gènes formant les différents isoformes, Cav-1, Cav-2 et Cav-3. Les Cav-1 et 2 sont exprimées principalement dans les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les pneumocytes de type I. Elles sont co-exprimées et forment des oligomères (figure 7). La Cav-3 est plus spécifique, puisqu'on la retrouve spécifiquement dans les tissus musculaires squelettiques, cardiaque, ainsi que dans les muscles lisses.



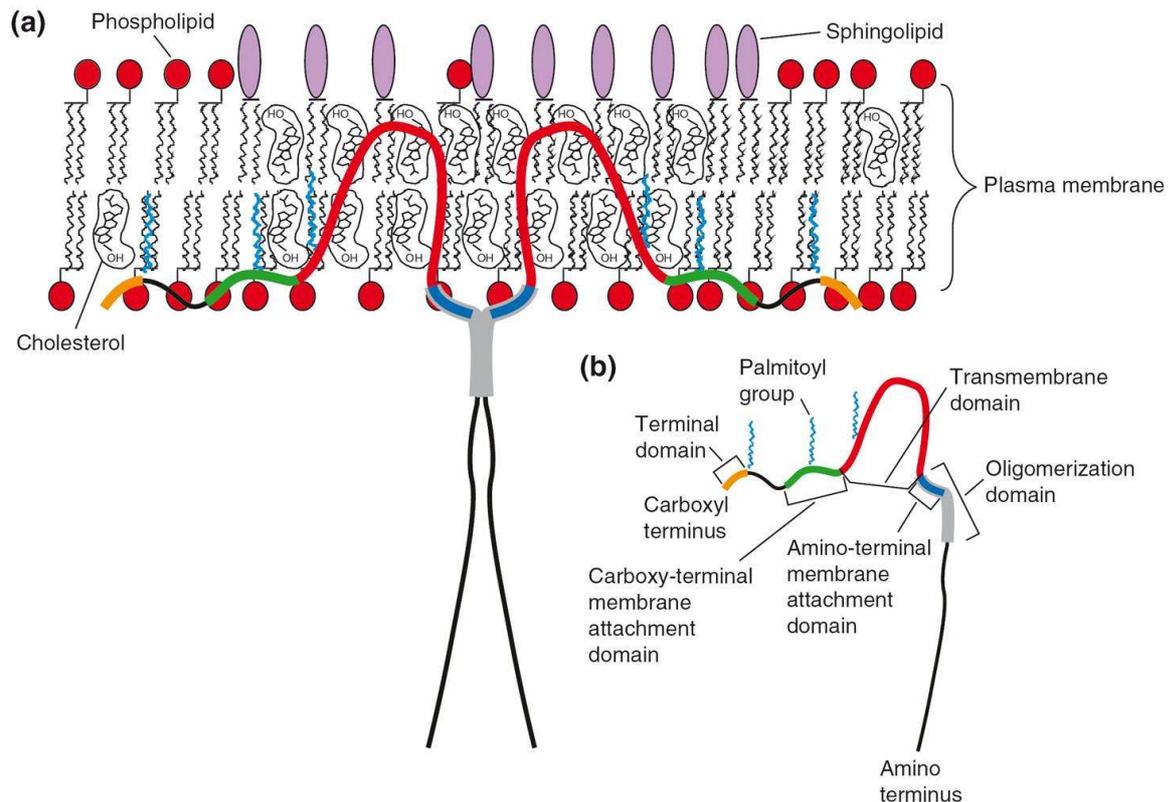
**Figure 7: Formation des cavéoles et cavéoline**

D'après (Gazzerro et al., 2009)

)

La cavéoline est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (dans la figure, ER) et est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi sous forme d'oligomères. Là, les oligomères s'associent aux glycosphingolipides et aux domaines enrichis en cholestérol des rafts lipidiques. Ils forment alors des transporteurs cavéolaires ou vésicules de transfert post golgiennes (caveolar carrier) qui vont fusionner avec la membrane plasmique et former les cavéoles. Au niveau de la membrane plasmique, les interactions entre les oligomères de cavéolines et le cholestérol déforment la membrane, pour la courber et lui donner une forme d'oméga renversé ( $\Omega$ ) caractéristique des invaginations cavéolaires.

La Cav-3 est une protéine de 151 acides aminés avec un poids moléculaire de 22 kDa. Les études structurales principalement menées sur l'isoforme Cav-1 ont permis de déterminer une structure type pour les cavéolines (figure 8). De plus, en raison du haut degré de similitude entre Cav-1 et Cav-3 (85 %), les propriétés structurales de Cav-1 sont aussi attribuées à Cav-3. Les extrémités N- et C-terminales de la protéine sont cytoplasmiques et contiennent les domaines responsables de l'attachement membranaire de la protéine (Figure 8B en vert et bleu) (Schlegel & Lisanti, 2000). La région C-terminale possède 3 sites de palmitoylation qui stabilisent ce positionnement. La Cav-3 est capable de former des complexes oligomériques de haut poids moléculaire (350 à 400 kDa) grâce à un domaine d'oligomérisation situé sur la partie N-terminale. Ce dernier contient notamment le domaine scaffolding de la protéine. Les domaines scaffolding (de l'anglais « scaffold » qui désigne un échafaudage) permettent aux protéines d'organiser des réseaux plus ou moins complexes de molécules en interactions et de réguler leur activité. Les protéines dites de scaffolding sont présentes dans de nombreuses voies de signalisation et jouent un rôle clef dans la régulation de la transduction du signal et la localisation des composants impliqués.



**Figure 8: Structure primaire et topologie de la cavéoline**

D'après (Williams & Lisanti, 2004)

(a) Prédiction de la topologie membranaire de la cavéoline. (b) Différents domaines structuraux et fonctionnels de la cavéoline.

La cavéoline est capable de former des oligomères. Pour des raisons de simplicité seules, deux monomères de cavéolines formant un dimère sont représentés en (a), mais entre 14 et 16 monomères de cavéolines peuvent s'associer entre eux pour former un homo (ou hétéro)-oligomère de cavéoline suivant leur composition en cavéolines. Les domaines N- et C- terminaux sont orientés vers la face cytosolique de la membrane avec une structure en tête d'épingle insérée uniquement dans le feuillet interne de la bicouche lipidique (en rouge). Noter que le domaine d'attachement N-terminal (en bleu) est aussi le domaine scaffolding de la protéine (CSD, caveolin scaffolding domain).

### 1.3.1.2.2 Les cavéolinopathies

Les myopathies associées à des mutations de la Cav-3 sont appelées cavéolinopathies. Elles résultent souvent en une perturbation de l'expression de la Cav-3 (absence ou surexpression). Parmi celles-ci, une des premières pathologies caractérisées est une forme autosomale dominante de LGMD (aussi appelée myopathie des ceintures), la LGMD-1C (Limb Girdle Muscular Dystrophy de type 1C). La LGMD-1C est due à des mutations ou une délétion dans le gène Cav-3 qui provoque une déficience en Cav-3 (Minetti et al., 2002). Les LGMDs sont un groupe de maladies neuromusculaires caractérisées par une détérioration progressive des muscles engendrant un

affaiblissement qui affectent essentiellement les muscles volontaires situés autour de la région scapulaire (épaules) et pelvienne (hanches).

### **1.3.1.2.3 Tubules T et Cav-3**

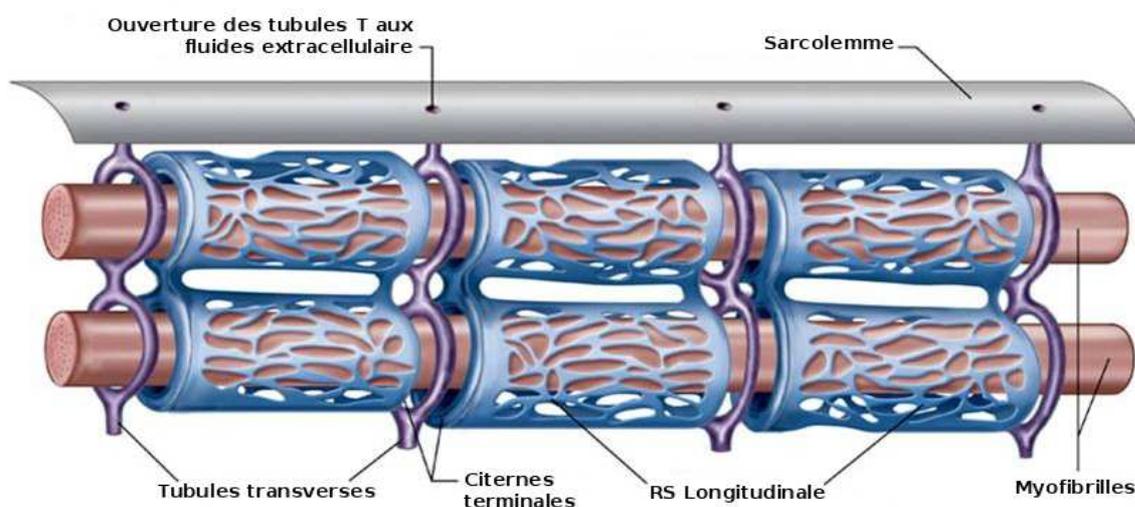
Plusieurs résultats suggèrent que l'assemblage des cavéoles est important pour la biogenèse des tubules T. Il a été montré que la Cav-3 s'associe transitoirement avec les tubules T en développement (Parton et al., 1997). De plus, un modèle de souris dont le gène codant la Cav-3 est invalidé présente des tubules T déformés et dilatés et une absence de cavéoles dans leurs fibres musculaires (Galbiati et al., 2001). L'association de la Cav-3 et des tubules T a aussi été montrée dans les fibres musculaires différenciées, mais ce résultat est controversé (Ralston & Ploug, 1999). De plus, du point de vue ultrastructural, on retrouve souvent dans les fibres musculaires plusieurs cavéoles (1 à 4) regroupées au niveau de l'ouverture des tubules T sur la membrane plasmique (Razani et al., 2002). L'apparition de transcrits primaires de Cav-3 dans les somites en développement et le cœur dès le 10<sup>ème</sup> jour de gestation chez la souris (Biederer et al., 2000) suggèrent aussi un lien développemental entre tubules T et Cav-3. Enfin, on a pu noter un développement anormal des tubules T chez les patients atteints de LGMD-1C (Galbiati et al., 2000).

Ainsi, l'hypothèse d'une origine cavéolaire des tubules T s'est renforcée. Cette dernière n'est pas récente puisque dès 1968, Ishikawa proposait que le système tubulaire transverse dérivait d'une fusion des cavéoles (Ishikawa, 1968). Sur cette base, un modèle de biogenèse coordonnée a été proposé (Yuan, Arnold & Jorgensen, 1991). En effet, pour Yuan et ses collaborateurs, lors de la formation des tubules T, les vésicules de transfert post golgiennes (figure 7) contiennent déjà des éléments triadiques et notamment les récepteurs aux dihydropyridines (DHPR) responsables du CEC (voir chapitre 3). En fusionnant de manière répétitive avec la membrane plasmique, ces vésicules formeraient des invaginations membranaires en forme de « collier de perles » et permettraient la mise en place des protéines dans les tubules T. Enfin, la colocalisation dans la fibre adulte de la Cav-3, du DHPR et de la dysferline suggère que le pool de DHPRs des tubules T est maintenu grâce à l'incorporation de vésicules contenant ces 3 éléments (Ampong et al., 2005).

## **1.3.2 Le réticulum sarcoplasmique**

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est un compartiment intracellulaire occupant entre 1,5 et 10 % du volume cellulaire suivant l'espèce animale et le type de fibre. Dans la fibre musculaire, il est principalement dédié au stockage, à la libération et à la recapture du calcium (Peachey, 1965; Volpe & Simon, 1991). Le RS est un réticulum lisse hautement spécialisé, formant un vaste réseau

membranaire interne entourant chaque myofibrille (Porter & Palade, 1957) (figure 9). Encadrant les tubules T, le réseau formé par le RS s'arrête au niveau des jonctions entre les bandes A et I de chaque sarcomère (figure 4). Il peut être divisé en deux régions structurellement et fonctionnellement distinctes : les citernes terminales qui sont légèrement dilatées et font face aux tubules T et un réseau de tubules longitudinaux (le RS longitudinal) reliant les citernes terminales entre-elles. Au sein des citernes terminales, on distingue deux régions: la face jonctionnelle (située face à un tubule T) et la face non jonctionnelle (Costello et al., 1986; Saito et al., 1984). Les citernes terminales sont impliquées plus particulièrement dans la libération du calcium nécessaire à la contraction, alors que le réticulum longitudinal porte les protéines participants à sa recapture.



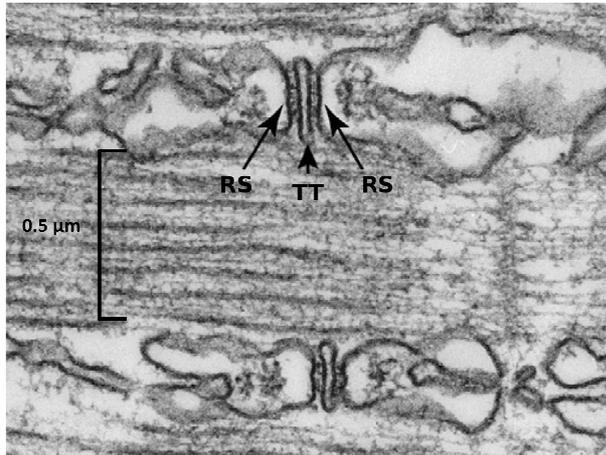
**Figure 9 : Vue détaillée du réticulum sarcoplasmique et des tubules T de la fibre musculaire squelettique**

Le sarcolemme entourant la cellule musculaire, présente de fines invaginations tubulaires (les tubules transverses ou tubules T) qui sont réparties régulièrement le long de la fibre et y pénètrent profondément. Le RS forme des citernes terminales accolées aux tubules T. Le réseau constitué par le réticulum sarcoplasmique parcourt la myofibrille dans le sens de la longueur et forme au contact du tubule T, des structures appelées citernes terminales. Cet ensemble (tubules T + 2 citernes terminales) joue un rôle important dans le déclenchement de la contraction musculaire. Il est appelé « triade » en raison de sa composition impliquant trois structures membranaires (voir figure 10).

### **1.3.3 La triade**

La triade ou jonction triadique est la structure formée d'un tubule T et de deux citernes terminales de RS à l'interface entre les bandes A et I des sarcomères chez l'Homme (Porter & Palade, 1957) (figure 9 et 10). La triade constitue une unité fonctionnelle, véritable « synapse intracellulaire » qui caractérise la fibre musculaire squelettique et participe à la modulation de l'activité contractile. En effet, elle est le site d'une étape clef du déclenchement de la contraction musculaire : le couplage entre la dépolarisation du sarcolemme et le relâchement du calcium hors du

RS (Franzini-Armstrong & Jorgensen, 1994). Cette étape est appelée « couplage excitation-contraction » (CEC). Au sein de la triade, l'agencement spécifique de protéines localisées dans la membrane des tubules T et de protéines localisées dans la membrane du RS est à la base de la réalisation d'un couplage excitation-contraction efficace. Ces protéines forment un complexe dit de « mobilisation calcique » et seront décrites précisément dans le chapitre 2.



**Figure 10 : Coupe longitudinale de deux triades de muscle de poisson observées par microscopie électronique.**

Adaptée de (Serysheva, Chiu & Ludtke, 2007)

**RS**, réticulum sarcoplasmique ; **TT**, Tubule transverse. La membrane du tubule T est bordée par les membranes de la face jonctionnelle des citernes terminales du RS. Les structures plus denses que l'on observe au niveau de l'espace entre le TT et les RS correspondent aux protéines du complexe de mobilisation calcique.

## 1.4 Principaux éléments de régulation de l'homéostasie calcique

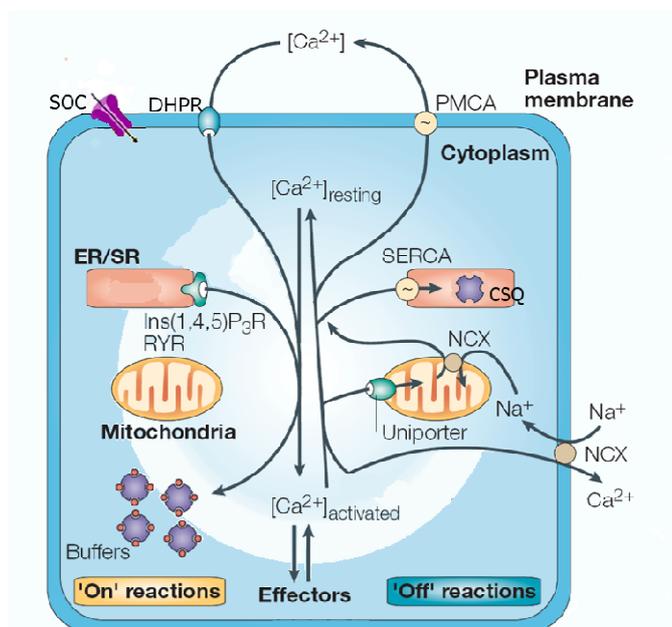
“Almost everything we do is controlled by calcium.” (Berridge, Bootman & Lipp, 1998)

### Faisons un peu d'histoire...

Vers la fin du 17<sup>ème</sup> siècle, Sidney Ringer fut le premier à découvrir l'importance du calcium pour la transduction du signal. Il montra notamment que le  $\text{Ca}^{2+}$  était important pour la contraction cardiaque (Ringer, 1883) et la contraction du muscle squelettique (Ringer, 1886; Ringer & Buxton, 1887). Durant la même période, Locke et Overton montrèrent que le  $\text{Ca}^{2+}$  jouait un rôle crucial dans la transmission du signal entre les nerfs et les muscles. Étonnamment, les cinquante années qui suivirent ces découvertes n'apportèrent pas d'avancée majeure dans le domaine de la signalisation calcique. Jusqu'au début des années 1940, lorsque Lewis Victor Heilbrunn développa l'idée que le  $\text{Ca}^{2+}$  agissait comme un messenger intracellulaire universel contrôlant presque toutes les réactions cellulaires. Il fut aussi le premier à développer le concept d'un relâchement de calcium intracellulaire à partir d'un stock spécifique qu'il appela « cortex rigide » (Heilbrunn, 1943); (Berridge, Lipp & Bootman, 2000). À l'époque, les thèses d' Heilbrunn passaient pour excentriques aux yeux de ses pairs, et l'importance du calcium pour la contraction, pourtant démontrée par Ringer, n'était pas universellement reconnue. Le tournant eu lieu dans les années 1960, grâce aux travaux menés principalement par Setsuro Ebashi qui démontrèrent que la relaxation musculaire est

due à un repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS via une ATPase. En 1968, Ebashi et Endo exposèrent la théorie de la contraction musculaire telle que nous la connaissons aujourd'hui (Ebashi, 1968).

Le calcium est un messenger secondaire ubiquitaire dans le monde vivant. Chez la plupart des organismes eucaryotes, la variation de sa concentration cytoplasmique est un signal intracellulaire qui régule un grand nombre de processus cellulaires (prolifération cellulaire, exocytose, transcription, apoptose, etc.) (pour revue voir (Berridge, Bootman & Roderick, 2003; Berridge et al., 2000)). Pour cela, la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  doit être très finement ajustée à chaque instant et en chaque domaine de la cellule. On parle de maintien de l'homéostasie calcique. En réalité, la première contrainte pour la cellule est de maintenir une très faible concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique. La deuxième contrainte est de pouvoir induire des augmentations contrôlées dans l'espace et le temps de cette concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$ . Toute augmentation non contrôlée de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  est, de fait, nocive pour la cellule. Le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le cytoplasme résulte d'un équilibre entre des réactions dites « ON » qui contrôlent l'élévation de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$ , et des réactions dites « OFF » qui permettent un retour de cette concentration au niveau basal (figure 11). Le maintien de l'homéostasie calcique fait donc intervenir un grand nombre de protéines, il repose principalement sur : a) des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane plasmique via des canaux et des pompes b) la capacité de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  libre par des protéines cytoplasmiques ou du RS et c) des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane du RS.



**Figure 11 : Principaux systèmes de régulation de l'homéostasie calcique de la cellule musculaire**

Adaptée de (Berridge et al., 2003)

Pendant les réactions « ON », la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  libre augmente grâce notamment à l'action des RyRs, des récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, des SOCs, et des DHPRs. Pendant les réactions « OFF », la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique diminue. Au sein du cytosol et du lumen, ce  $\text{Ca}^{2+}$  peut se fixer sur des « calcium bindings protéins » (CBPs) (calséquestrine, calmoduline). Dans la cellule musculaire, le  $\text{Ca}^{2+}$  est principalement repompe vers la lumière du RS par les pompes SERCAs, mais il peut être rejeté vers l'extérieur de la cellule via divers échangeurs et pompes: l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique (PMCA). La mitochondrie joue aussi un rôle pendant les processus de diminution de la concentration calcique via un uniport calcique. Les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant les réactions « ON » et « OFF » se compensent pour que la cellule au repos ait toujours la même concentration basale en  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **1.4.1 Systèmes de régulation « ON »**

La membrane plasmique, comme toutes les membranes biologiques, est imperméable au  $\text{Ca}^{2+}$  et sépare un compartiment riche en  $\text{Ca}^{2+}$ , le milieu extracellulaire (1 à 2 mM) d'un compartiment pauvre en  $\text{Ca}^{2+}$ , le cytoplasme (100 nM au repos). Il en résulte un gradient électrochimique entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule largement en faveur d'une entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. De ce fait, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule ne nécessite pas de transport actif et est assurée par la diffusion passive du  $\text{Ca}^{2+}$  via des protéines canaux localisées dans la membrane plasmique. Dans la cellule musculaire la principale famille de canaux calciques présents dans la membrane plasmique est la famille des canaux dits « voltage dépendants » car activés par une variation du potentiel membranaire. Une autre famille de canaux a plus récemment été identifiée dans la cellule musculaire squelettique, la famille des TRP (Transient Receptor Potential) eux aussi potentiellement responsables d'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Le rôle et l'importance physiologique de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule musculaire squelettique via ces deux familles de canaux restent encore à être définis de façon précise.

Comme la membrane plasmique, la membrane du RS est imperméable au  $\text{Ca}^{2+}$  et la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS est comme celle du milieu extracellulaire extrêmement élevé par rapport à la concentration cytoplasmique. La sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS est donc elle aussi assurée par l'ouverture de canaux calciques. Dans la cellule musculaire, le principal canal responsable de la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS est un canal calcique de la famille des récepteurs de la ryanodine. La présence d'une autre famille de canaux calciques, celle des récepteurs de l'IP<sub>3</sub>, a également été décrite, mais leur rôle exact reste également à définir.

#### **1.4.1.1 Les canaux calciums dépendants du voltage (CCVDs)**

Les canaux calciques dépendants du voltage (CCVD) sont activés en réponse à une dépolarisation membranaire et régulent de nombreux processus cellulaires comme la contraction, la sécrétion, la neurotransmission et l'expression génique selon le type cellulaire (Catterall et al., 2005). De façon étonnante, on retrouve ces canaux non seulement dans les cellules excitables, mais également dans les cellules non excitables (ex. : cellules spermatogéniques). Ces canaux servent de transducteur du signal électrique, capté à la surface de la membrane, en événements physiologiques. Ces derniers sont initiés par des changements de la concentration locale en  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la cellule. L'activation des CCVDs est fonction du potentiel membranaire et leur sensibilité au potentiel varie d'une famille de canaux à une autre. Les CCVDs se présentent sous 3 états

conformationnels différents suivant l'état électrique de la membrane : un état fermé (aux potentiels inférieurs au seuil d'activation), un état ouvert (état activé transitoire) et un état inactivé (état non conducteur induit par des dépolarisations soutenues). Lors d'une dépolarisation de la membrane plasmique supérieure au seuil d'activation, ces canaux s'ouvrent et le  $\text{Ca}^{2+}$  diffuse dans la cellule de manière passive suivant le gradient électrochimique. Les CCVDs sont des protéines membranaires complexes composées de 4 sous-unités codées par de multiples gènes (voir tableau I) (Catterall, 2000). Trois sous-unités membranaires,  $\alpha 1$  qui forme la partie canal,  $\alpha 2\delta$  et  $\gamma$  ainsi qu'une sous-unité  $\beta$  entièrement cytoplasmique (voir chapitre 2, structure du DHPR).

On distingue 2 catégories de CCVD : ceux qui s'activent pour de faibles dépolarisations, aussi appelés canaux bas seuil ou LVA (pour Low Voltage Activated) et ceux qui s'activent à des dépolarisations plus élevées, les canaux haut seuil ou HVA (pour high Voltage Activated). Au sein de ces catégories, plusieurs types de canaux calciques ont été décrits. Ils ont d'abord été classés suivant des critères électrophysiologiques (cinétiques d'activation, d'inactivation, conductance) et pharmacologiques (sensibilité aux agents pharmacologiques) mais cette classification a évolué en fonction de critères de biologie moléculaire de la sous-unité canal,  $\alpha 1$ , responsable de l'expression du courant calcique (Ertel et al., 2000). Parmi les canaux LVA, on trouve donc les canaux de type T ou canaux T (pour «transient»). La famille des ces canaux HVA comprend elle 4 types de canaux, L, N, P/Q et R (Catterall et al., 2005). La diversité pharmacologique et biophysique des CCVDs vient principalement de l'existence de différentes sous-unités  $\alpha 1$  (Hofmann, Biel & Flockerzi, 1994). Ainsi, chez les mammifères, 10 CCVDs ont été caractérisés sur la base de ces critères et classés en 3 sous familles en fonction du gène codant les différents isoformes de la sous-unité  $\alpha 1$  qui est commun à tous les CCVDs ( $\text{Ca}_v 1.x$  et  $\text{Ca}_v 2.x$  pour les canaux HVA, et  $\text{Ca}_v 3.x$  pour les canaux LVA) (Lory & Nargeot, 2004)). La classification de ces types de canaux ainsi que leur expression tissulaire sont résumées dans le tableau suivant.

Seuil d'activation	Nom du canal	Type de courant	Nom du gène	Variants d'épissage	Localisations tissulaires principales	Implication dans des pathologies
<b>Haut (HVA)</b>	Ca <sub>v</sub> 1.1	L	CACNA1S		Muscle squelettique (tubules transverses)	Hypertension, angine de poitrine, arythmie cardiaque, Hyperthermie maligne, paralysie périodique hypokaliémique
	Ca <sub>v</sub> 1.2	L	CACNA1C	Ca <sub>v</sub> 1.2a	Cœur	
				Ca <sub>v</sub> 1.2b	Muscle lisse	
				Ca <sub>v</sub> 1.2c	Cerveau (corps cellulaires et dendrites des neurones), cœur, glande pituitaire, glande surrénale	
	Ca <sub>v</sub> 1.3	L	CACNA1D		Cerveau, pancréas, rein, ovaire, cochlée	
	Ca <sub>v</sub> 1.4	L	CACNA1F		Rétine	
	Ca <sub>v</sub> 2.1	P/Q	CACNA1A	Ca <sub>v</sub> 2.1a	Cerveau, cochlée, glande pituitaire	Migraine hémiplegique familiale, Épilepsie
				Ca <sub>v</sub> 2.1b		
	Ca <sub>v</sub> 2.2	N	CACNA1B	Ca <sub>v</sub> 2.2a	Cerveau, système nerveux	Douleur
				Ca <sub>v</sub> 2.2b		
Ca <sub>v</sub> 2.3	R	CACNA1E	Ca <sub>v</sub> 2.3a	Cerveau, cochlée, glande pituitaire, rétine, cœur	Diabète	
			Ca <sub>v</sub> 2.3b			Rétine, cerveau, cochlée,
<b>Bas (LVA)</b>	Ca <sub>v</sub> 3.1	T	CACNA1G	Ca <sub>v</sub> 3.1a	Cerveau, système nerveux	Arythmie cardiaque, épilepsie, fertilité
	Ca <sub>v</sub> 3.2	T	CACNA1H	Ca <sub>v</sub> 3.2a	Cerveau, rein, cœur, foie	
	Ca <sub>v</sub> 3.3	T	CACNA1I	Ca <sub>v</sub> 3.3a	Cerveau	

**Tableau I : Nomenclature des canaux calciums dépendants du voltage.**

D'après (Ertel et al., 2000) et Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction.

Dans cette nomenclature, le nom du canal se décompose ainsi : l'ion perméant (ici le calcium, Ca) suivi du régulateur physiologique principal indiqué en indice (ici le voltage, v) puis deux numéros d'identification correspondant respectivement à la famille du gène de la sous-unité  $\alpha 1$  du canal (de 1 à 3) et à l'ordre de découverte de cette sous-unité.

#### **1.4.1.1.1 Les CCVDs du muscle squelettique : Canaux de type L et T**

Le muscle squelettique de mammifère présente deux types de courants calciques associés à deux types de CCVDs : les courants de type L et ceux de type T. Les courants L (pour « Long Lasting ») sont appelés ainsi car ils se caractérisent par une cinétique d'activation et d'inactivation très lente. De ce fait, ces courants perdurent durant toute la durée d'un potentiel d'action. Les courants L furent décrits pour la première fois dans le muscle. Ils sont sensibles notamment aux

molécules de la famille des dihydropyridines (DHP) qui sont soit des agonistes (BayK) soit des antagonistes (nifédipine) des canaux L.

Les courants T présentent eux des cinétiques d'activation et d'inactivation rapides (pour revue sur les canaux T, voir(Perez-Reyes, 2003) et génèrent de ce fait des courants calciques transitoires. De plus, ces canaux sont exprimés de façon transitoire au cours du développement de la fibre musculaire squelettique. En effet, l'ARNm codant la sous-unité  $\alpha 1$  de ce canal est détectable à partir de E14 mais n'est plus exprimé deux semaines après la naissance (Berthier et al., 2002). Des études sur des fibres musculaires de rats ont montré que les courants T diminuent progressivement à partir de la naissance et disparaissent complètement au bout de trois semaines (Beam & Knudson, 1988). Ces résultats suggèrent une implication des canaux de type T dans le développement.

#### **1.4.1.2 Les canaux TRP et l'entrée capacitive de calcium**

Les canaux TRP (Transient Receptor Potential) constituent une superfamille composée de plus de 50 canaux perméables aux cations et exprimés au niveau de la membrane plasmique dans la plupart des types cellulaires des mammifères. L'activité de ces canaux est régulée par différents mécanismes dont la plupart sont encore discutés. De même, leurs fonctions physiologiques sont encore régulièrement débattues dans la littérature. La plupart des canaux TRP sont perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ , et notamment ceux de la sous-famille des TRPC (C pour Canonique car ils ont été découverts en premier). Plusieurs études ont montré que ces TRPC sont exprimés dans le muscle squelettique de mammifère (Kruger et al., 2008; Santillan et al., 2004; Vandebrouck et al., 2002).

Il existe une voie d'entrée du calcium externe activée par la déplétion des stocks internes en  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  participe principalement à la reconstitution des réserves du RS. Ce mécanisme est appelé « Entrée Capacitive de Calcium » (ECC) et est assurée par une catégorie de canaux spécifiques, les SOCs pour « Store-Operated Channels ». L'existence de cette voie dans les cellules musculaires squelettiques est connue depuis 1990, elle a été décrite pour la première fois dans des études sur la dystrophie musculaire de Duchenne (Fong et al., 1990) puis plus récemment dans des fibres musculaires adultes de souris (Kurebayashi & Ogawa, 2001). Au sein des fibres musculaires squelettiques, lors d'une activité soutenue, une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est nécessaire au maintien de la production de force (Zanou et al., 2010). Plusieurs travaux permettent de penser que les SOCs des fibres musculaires sont activés pendant la contraction (Baylor, Chandler & Marshall, 1983; Ducret et al., 2006; Gissel & Clausen, 1999). Il a été suggéré que l'activité de l'ensemble des TRPC pouvait être augmentée en réponse à une déplétion des stocks calciques intracellulaires et notamment celle de TRPC1 qui fait l'objet de nombreuses études (Vazquez et al., 2004). Cependant,

ce rôle des TRPCs ne fait pas encore l'unanimité au sein de la communauté scientifique et les études en électrophysiologie indiquent une forte diversité phénotypique des canaux responsables de l'ECC (Salido, Sage & Rosado, 2009). Les récents travaux de Zanou et al, (2010) montrent que les canaux TRPC1 modulent l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant des contractions répétées et aident le muscle à maintenir la production de force durant une stimulation soutenue. Néanmoins, ils démontrent que l'activité des canaux TRPC1 des fibres musculaires de souris n'est pas régulée par les stocks calciques (Zanou et al., 2010).

#### **1.4.1.3 Le Récepteur de la ryanodine (RyR)**

Je ferai une description détaillée du RyR dans le chapitre 2 consacré au CEC.

#### **1.4.1.4 Les Récepteurs de l'IP3 (IP3Rs)**

Les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) sont des canaux calciques présents majoritairement dans la membrane du RS des fibres musculaires. Ils présentent une forte homologie structurale avec les RyRs, mais des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes (Grunwald & Meissner, 1995). Au niveau de la membrane plasmique, un récepteur couplé à la phospholipase C (PLC) hydrolyse un phospholipide membranaire, le phosphatidyl-inositol-di-phosphate (PIP2) pour former un messenger intracellulaire l'inositol 1,4,5-triphosphate (l'IP3). L'IP3 ainsi produit, diffuse dans le cytosol et stimule le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RS via les IP3R. Trois isoformes IP3R I, II, et III exprimées dans le muscle squelettique ont été identifiées correspondant au produit de trois gènes distincts (De Smedt et al., 1997).

L'activité de l'IP3R est régulée par divers agents physiologiques et pharmacologiques parmi lesquels le  $\text{Ca}^{2+}$  lui-même qui joue un rôle particulier. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  régule les IP3Rs de façon isoforme dépendante. Il augmente la probabilité d'ouverture de l'IP3R de type I en présence d'IP3. Ceci suggère que l'IP3RI pourrait être spécifiquement activé lors de l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique et pourrait être partiellement responsable du phénomène d'amplification du relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par le  $\text{Ca}^{2+}$  appelé CICR ( $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release). Dans le muscle squelettique, le rôle physiologique de cette libération de calcium n'est pas clairement établi et ne semble pas être directement impliqué dans le processus du couplage excitation-contraction (Pape et al., 1988).

#### **1.4.2 Systèmes de régulation « OFF »**

Pour que les signaux calciques puissent être interprétés correctement par les cellules et notamment par la cellule musculaire lors de la contraction, les réactions « ON » résultant en l'augmentation de

la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  doivent être contrebalancées par des réactions « OFF » permettant le retour à la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  dite « de repos ». Ces dernières font intervenir diverses pompes et échangeurs qui permettent le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers le milieu extracellulaire ou vers la lumière du RS mais également des protéines qui fixent le  $\text{Ca}^{2+}$  et font baisser sa concentration locale. Ces différents éléments ont des localisations et des mécanismes d'actions différents. Ils ont aussi des seuils d'activités différents, ce qui permet une régulation fine en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans la fibre musculaire, l'essentiel de cette régulation « OFF » est réalisée au niveau du RS par les pompes SERCA.

#### **1.4.2.1 Recapture du $\text{Ca}^{2+}$ par le RS : les pompes calciques – SERCA-**

Comme je l'ai déjà évoqué dans un paragraphe précédent, le cycle contraction/relaxation nécessite un recapture rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique par le RS. Contrairement à sa libération, cette recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  se fait à l'encontre du nouveau gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  établi par la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS et requière donc un processus actif consommateur d'énergie. L'énergie utilisée pour ce transport provient de l'hydrolyse d'ATP. Ce transport est réalisé par une pompe calcique ATPasique membranaire appelée SERCA (pour Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) localisée dans la membrane du RS. Cette protéine de masse molaire 110 kDa présente une structure asymétrique en 3 domaines : (1) un grand domaine cytoplasmique contenant le site de catalyse ATPasique, (2) un domaine transmembranaire avec 10 hélices et enfin (3) un domaine situé au niveau de la lumière du RS. Ces protéines sont localisées essentiellement dans le RS longitudinal entre les jonctions triadiques, ce qui lui confère sa spécialisation dans le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Trois gènes distincts codent les SERCA. Des épissages alternatifs portent à 7, le nombre d'isoformes actuellement connus. Les isoformes spécifiquement et majoritairement exprimées dans le muscle squelettique sont les isoformes SERCA 1a et 1b. L'isoforme SERCA 2a est exprimée à la fois dans le muscle squelettique et dans le muscle cardiaque.

Le mécanisme de base des pompes SERCA implique l'exposition sur la face cytoplasmique de la protéine de sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (2 sites par molécule de SERCA) et de site de liaison de l'ATP-Mg. Le passage de la protéine à un état phosphorylé entraîne des modifications conformationnelles de la protéine permettant l'occlusion du  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la pompe. De nouveaux changements conformationnels induits par la déphosphorylation permettent la translocation du  $\text{Ca}^{2+}$ , puis sa libération dans la lumière du RS (MacLennan, Rice & Green, 1997). Le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  par les ATPases assure le retour de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  à sa valeur dite « de repos » et l'établissement d'un nouveau gradient de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  de 1000

entre la lumière du RS et le cytoplasme. La cinétique de transport du  $\text{Ca}^{2+}$  par une molécule de SERCA est  $10^5$  fois plus lente que celle de son relâchement passif via un canal récepteur de la ryanodine. Ce déséquilibre est compensé dans la fibre musculaire par le nombre beaucoup plus élevé de molécules d'ATPase que de canaux calciques présents sur la membrane du RS. Il a été évalué que le nombre de molécules de SERCA est à peu près égal au nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  libérés pour générer la contraction d'une fibre musculaire. Le retour à la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique « de repos » associé à la relaxation nécessite donc que chaque molécule de SERCA effectue un cycle complet de transport du  $\text{Ca}^{2+}$  couplé à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Stokes & Wagenknecht, 2000). Les pompes SERCA présentent une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique ( $\leq 1\mu\text{M}$ ), ce qui signifie qu'elles pourront répondre à de faibles élévations de la concentration et maintenir le taux basal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Différents outils pharmacologiques permettent de bloquer les SERCA. Le plus utilisé, et le plus sélectif, est la thapsigargine. L'utilisation de thapsigargine empêche l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS et donc une vidange progressive du RS et une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique (Sagara, Wade & Inesi, 1992). La thapsigargine est particulièrement utilisée pour l'étude des entrées de  $\text{Ca}^{2+}$  activées par la vidange des stocks intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  dont le remplissage dépend d'ATPases de type SERCA.

#### **1.4.2.2 Les systèmes d'extrusion du $\text{Ca}^{2+}$ cytoplasmique : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et pompes calciques de la membrane plasmique.**

Bien que le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS représente la principale voie de diminution de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$ , une deuxième voie existe qui permet le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers le milieu extracellulaire. Au niveau du sarcolemme des fibres musculaires squelettiques, différentes études ont montré la présence d'échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX, pour  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  eXchanger) et de pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) dans la membrane des tubules T (Mickelson, Beaudry & Louis, 1985; Sacchetto et al., 1996).

##### **1.4.2.2.1 Les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)**

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  permet le transport d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme vers le milieu extérieur en échange de trois ions  $\text{Na}^+$  entrants (mode « forward »). Ce transport est donc électrogénique car il crée un flux net de charges positives. Cet échangeur peut aussi fonctionner dans le sens inverse suivant les gradients électrochimiques du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Ca}^{2+}$  (mode « reverse »). Cependant, la stœchiométrie normale de l'échange privilégie le mode « forward ». Il existe trois gènes différents (NCX1, NCX2 et NCX3) dont les transcrits donnent naissance par épissage

alternatif à plusieurs isoformes. Les NCX 2 et 3 sont exclusivement exprimés dans le muscle squelettique et les neurones alors que l'NCX1 est exprimé de façon ubiquitaire (Lytton, 2007).

Le rôle de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  a été largement étudié dans le muscle cardiaque où il permet la relaxation musculaire (Philipson, Nicoll & Li, 1993). Il est décrit que le niveau d'expression des NCX dans la fibre musculaire squelettique est environ 100 fois inférieur à celui observé dans les cellules cardiaques (Kofuji et al., 1992). Les données dont nous disposons concernant la cellule musculaire squelettique sont beaucoup moins précises et encore sujettes à discussion. De plus, l'impact des NCX sur l'homéostasie calcique y semble moins important. Certains auteurs suggèrent malgré tout une implication des NCX dans l'activité contractile (Leoty, 1984; Zavec, Anderson & Adams, 1991). L'analyse de l'expression des protéines et des ARNm des isoformes NCX1, NCX2 et NCX3 dans différents types de muscles squelettiques de rats adultes démontre des différences importantes dans l'expression de NCX1 et NCX3. L'expression de chaque isoforme diffère selon le type de fibres et la localisation intracellulaire, NCX1 étant préférentiellement localisé dans les tubules T (Frayssé et al., 2001). Cette régulation différentielle de l'expression permet de spéculer sur un rôle éventuel de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (notamment NCX1) dans le contrôle de la relaxation musculaire, en particulier durant une activité musculaire intense, lorsque la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  devient trop élevée (Balnave & Allen, 1998).

#### **1.4.2.2 Les pompes $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA)**

La baisse de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire peut être due également à une augmentation de l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  par stimulation d'ATPases calciques situées dans la membrane plasmique (PMCA). Les PMCA participent à l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique vers le milieu extracellulaire contre son gradient électrochimique. Comme pour les SERCA du RS, ce transport actif nécessite de l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP. Ces ATPases membranaires ont une masse moléculaire d'environ 130 kDa et sont codées par une famille de 4 gènes (PMCA 1-4). L'épissage alternatif de ces gènes produit de nombreuses isoformes qui présentent une large distribution tissulaire (Strehler & Zacharias, 2001). Les PMCA sont régulées en particulier par la calmoduline pour laquelle elles possèdent un site de fixation. La calmoduline est une protéine capable de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$ , présente dans toutes les cellules eucaryotes et régulant de nombreuses autres protéines. L'affinité des PMCA pour le  $\text{Ca}^{2+}$  dépend de la présence de cette protéine. Lorsqu'elles sont complexées à la calmoduline, les PMCA présentent une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$

( $K_m < 0.5\mu\text{M}$ ) et inversement en l'absence de calmoduline. Ces pompes sont donc activées par la calmoduline.

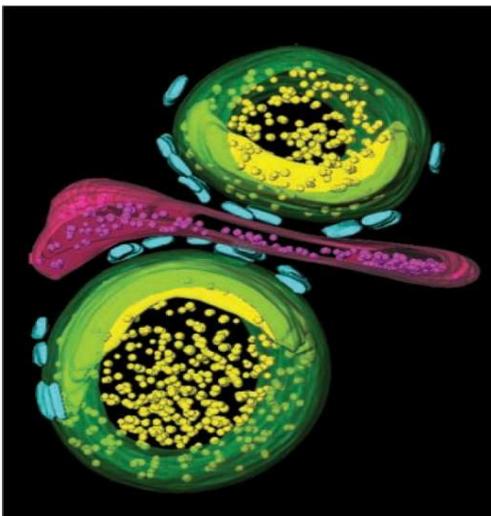
### **1.4.2.3 Les protéines tampons liant le $\text{Ca}^{2+}$**

La présence de  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytoplasmique en forte concentration est néfaste pour la cellule. En effet, les liaisons entre les groupements phosphate de l'ATP servent de source d'énergie pour la cellule. Or, en présence d'une trop forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , ces phosphates participent à la formation d'un composé insoluble qui précipite, le phosphate de calcium. En plus des différents systèmes permettant la diminution de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  décrits ci-dessus, différentes protéines capables de lier le  $\text{Ca}^{2+}$ , les " calcium-binding proteins " (CBPs), participent au contrôle de l'homéostasie calcique. Certaines CBPs sont présentes dans le cytoplasme ou en plus de leur « effet tampon » elles sont impliquées dans différents processus de régulation de l'activité d'autres protéines auxquelles elles confèrent une dépendance vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$ . C'est le cas de la calmoduline, impliquée notamment dans le contrôle du métabolisme énergétique en se liant à la phosphorylase kinase afin d'activer la glycogénolyse. La structure de la calmoduline est similaire à celle de la troponine C (70% d'homologie) qui intervient lors de la contraction.

D'autres CBPs sont localisées dans la lumière du réticulum comme la calséquestrine (CSQ) et la calréticuline (Beard, Laver & Dulhunty, 2004; Berridge et al., 2000). Dans le lumen du RS des muscles striés, la fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres est essentiellement réalisée par la CSQ (63 kDa) (figure 12), la calréticuline est quant à elle présente dans le réticulum endoplasmique des cellules non musculaires. La CSQ 1 est l'isoforme squelettique de la CSQ. La CSQ lie le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une affinité modérée ( $K_D \approx 100\mu\text{M}$ ) mais possède une grande capacité de fixation de l'ordre de 40 à 50 molécules de  $\text{Ca}^{2+}$ / molécule de CSQ (Franzini-Armstrong, Kenney & Varriano-Marston, 1987). Sous l'effet de l'augmentation de la concentration  $\text{Ca}^{2+}$ , la CSQ polymérise et forme un réseau quasi cristallin dans la lumière du RS. Par le contrôle de la concentration luminale de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, elle permet donc une régulation fine des RyRs et des SERCAs dont l'activation dépend de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  luminale. De plus, un couplage fonctionnel direct de la CSQ et du RyR a été proposé (Beard et al., 2002). Lorsque le RyR est activé, le  $\text{Ca}^{2+}$  se dissocie de la CSQ puis il est relâché dans le cytosol. Ce mécanisme met en jeu plusieurs protéines. En effet, la CSQ interagit directement et indirectement avec deux protéines membranaires (la triadine et la junctine) qui se fixent sur le RyR en formant un complexe quaternaire parfois appelé « machinerie de transduction du  $\text{Ca}^{2+}$  luminale ». (Guo & Campbell, 1995; Jones et al., 1995) (pour revue voir (Beard, Wei & Dulhunty, 2009b)). La CSQ joue ainsi le rôle de détecteur du  $\text{Ca}^{2+}$  luminale et communique

indirectement avec le RyR via ces interactions avec la triadine et la junctine. Elle permet aussi une augmentation de la concentration locale en  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de son site de relâchement. Dans le processus du couplage excitation – contraction, la CSQ joue donc un double rôle en modulant l'activité du RyR et en augmentant les capacités de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS.

Dans une étude récente, une équipe a créé et caractérisé le premier modèle murin n'exprimant pas CSQ1 (Paolini et al., 2007). Ces souris dites CSQ1-null sont viables et fertiles. La contraction musculaire y est donc préservée malgré une légère atrophie des muscles squelettiques observée en comparaison avec les souris contrôles. Cette préservation des capacités contractiles est possible grâce à des changements adaptatifs majeurs dans la structure et la composition protéique des fibres musculaires. Cependant, les cinétiques de contraction sont anormales, des changements significatifs sont observés dans des fibres isolées de muscle long fléchisseur des orteils. En effet, la durée nécessaire à l'obtention de la contraction maximale de la fibre est plus longue, et il en est de même pour la relaxation. Ces observations sont corrélées avec des résultats d'imageries calciques qui montrent que la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  relâchée par le RS est largement réduite. Au niveau du RS les changements ultrastructuraux incluent une augmentation massive du nombre de triades, une diminution du volume des citernes terminales, et une augmentation de la densité de RyRs à sa surface. Le nombre de mitochondries est aussi augmenté. La CSQ1 est donc essentielle à un développement normal du RS et joue un rôle majeur dans l'homéostasie calcique de la fibre musculaire ainsi que dans la régulation du RyR.



**Figure 12: Visualisation de calséquestrine dans des citernes terminales d'une triade hydratée puis congelée (« frozen hydrated »).**

Représentation « surface rendered » d'une triade isolée

D'après (Wagenknecht et al., 2002)

Les citernes terminales du RS et les tubules transverses sont représentés en vert et en rouge respectivement. Les sphères jaunes dans la lumière du RS représentent la calséquestrine et les zones jaunes continues près des surfaces jonctionnelles du RS représentent la calséquestrine condensée. Cette dernière est séparée de la membrane par une zone moins dense de 5 nm qui pourrait contenir les domaines luminaux des RyRs, la triadine, la junctine et les autres protéines associées au complexe. Les structures bleues correspondent aux RyRs. Les particules magenta dans le lumen des tubules transverses ne sont pas identifiées.

### **1.4.3 Conclusion**

Il existe donc un grand nombre de pompes et de canaux qui régulent finement l'amplitude et la cinétique des signaux calciques cellulaires. Au sein des cellules, tous ces systèmes de régulation de la concentration calcique fonctionnent de manière intégrée et interdépendante. Leur assemblage et leur exploitation complète dépendent de la transcription différentielle de multiples gènes. Dans ce contexte il est intéressant de noter que le calcium est un puissant activateur de la transcription génique (Greenberg, Ziff & Greene, 1986), et que certains gènes, régulés par le calcium, codent des éléments participant à l'homéostasie calcique (pompes, canaux, etc.) (Barbado et al., 2009; Mellstrom & Naranjo, 2001). Cette capacité du  $\text{Ca}^{2+}$  à réguler ses propres voies de signalisations pourrait expliquer la capacité du système à compenser des changements intervenant dans l'activité individuelle de certains de ces composants. Par exemple, l'effet de la surexpression des PMCA et des SERCA dans des cellules CHO provoque respectivement une réduction et une augmentation de la concentration en calcium dans le réticulum mais n'entraîne aucun changement de la concentration cytoplasmique de calcium, suggérant l'existence de mécanismes de compensation et/ou de contrôles chargés d'assurer le maintien de l'homéostasie calcique dans des limites tolérables par la cellule (Brini et al., 2000). Comme nous venons de le voir, dans la cellule musculaire le RS est le principal organe de stockage du calcium. Nonobstant, il semblerait que lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre devient trop élevée, les mitochondries interviennent dans la diminution de sa concentration (Parekh, 2003) via un uniport calcique dont l'activité augmente sous l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Bien que l'ensemble des cellules utilise le  $\text{Ca}^{2+}$  pour leur fonctionnement et la régulation de nombreux processus, la fibre musculaire est un cas particulier. En effet, comme nous l'avons vu, son fonctionnement requiert des signaux calciques massifs et répétitifs. Les différents isoformes des protéines formant le système de régulation de l'homéostasie calcique musculaire (canaux, pompes) lui sont donc souvent spécifiquement dédiés. Dans ce système, le RS joue un rôle fondamental, comme site majeur de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. La régulation calcique via le RS se fait selon 3 mécanismes principaux : (1) le pompage du  $\text{Ca}^{2+}$  par les SERCAs, (2) le relâchement via le récepteur à la ryanodine et (3) le stockage par les protéines tampons dans la lumière du RS.

Notons aussi que plusieurs pathologies musculaires sont associées à des dysfonctionnements de la signalisation calcique, notamment dues à des mutations sur les gènes codants pour les différentes protéines décrites dans ce chapitre (MacLennan, 2000).

## CHAPITRE 2

### LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

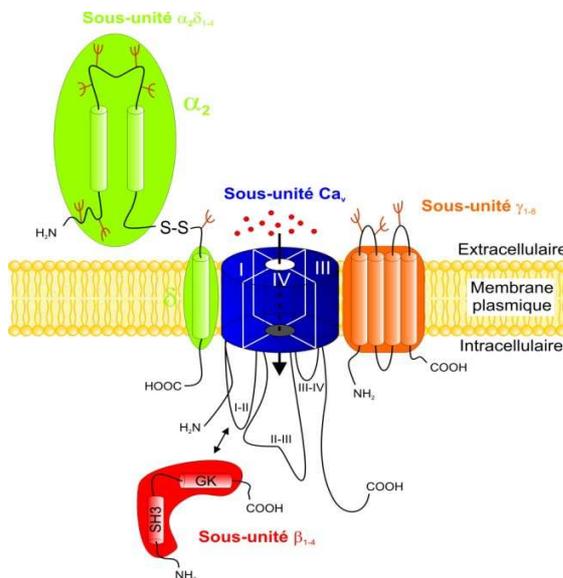
Pendant longtemps, le terme « couplage excitation-contraction » (CEC) a désigné l'ensemble des événements aboutissant à la contraction musculaire à partir de l'arrivée d'un potentiel d'action sur la fibre musculaire. Avec la mise en évidence du rôle fondamental du calcium dans ce processus et de la complexité des mécanismes mis en jeu, la définition du terme CEC est devenue plus restrictive et il désigne aujourd'hui le processus par lequel la dépolarisation de la membrane plasmique entraîne le relâchement du calcium stocké dans les citernes terminales du RS. Le CEC correspond donc au passage d'une information entre deux systèmes membranaires distincts, la membrane plasmique et le RS. Comme nous l'avons vu précédemment, le CEC repose sur l'existence de structures particulières dans la cellule musculaire, les triades, au niveau desquelles ces deux systèmes membranaires se retrouvent à proximité l'un de l'autre. Au niveau des triades, le CEC fait principalement intervenir deux protéines qui sont des canaux calciques, le récepteur aux dihydropyridines (DHPR) et le récepteur à la ryanodine (RyR). Ces canaux forment un complexe macromoléculaire de mobilisation du calcium localisé au niveau de la triade aussi appelé « unité de relâchement du calcium » ou « complexe de mobilisation calcique » par certains auteurs. La dépolarisation de la membrane plasmique entraîne l'activation du DHPR qui, à son tour, déclenche l'activation du RyR et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmique indépendamment de la concentration en calcium extérieure à la cellule. Pour expliquer ce phénomène, il est aujourd'hui largement admis que des interactions physiques directes et indirectes ont lieu entre ces deux protéines permettant un couplage conformationnel entre elles (Dulhunty et al., 1999; el-Hayek et al., 1995; Marty et al., 1994; Tanabe et al., 1990a). Plusieurs autres protéines sont fonctionnellement et structurellement impliquées dans le mécanisme de CEC, notamment dans la régulation et l'expression fonctionnelle du RyR et/ou du DHPR. Cependant, les interactions directes entre le DHPR et le RyR sont considérées comme étant à la base de ce processus

## 2.1 Les protéines responsables du CEC

### 2.1.1 Le récepteur des dihydropyridines (DHPR)

Le DHPR appartient à la famille des canaux calciques dépendants du voltage de type L précédemment décrits (tableau I). Le DHPR (ou canal  $Ca_v1.1$ , du nom de sa sous-unité principale) est un large complexe protéique transmembranaire de 435 kDa et tient son nom de sa sensibilité aux dihydropyridines, une classe de molécules qui peuvent être soit antagonistes (ex. : nifédipine) soit agonistes du récepteur (ex. : Bay K 8644). Les dihydropyridines antagonistes du DHPR sont notamment utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et de l'angine de poitrine. Le DHPR est localisé sur les tubules T et plus particulièrement au niveau des jonctions triadiques où il fait face aux récepteurs de la ryanodine ancrés dans la membrane du RS. La présence de DHPR dans les cavéoles a également été décrite (Jorgensen et al., 1989).

Comme tous les CCVDs, le DHPR est un hétérotétramère constitué d'une sous-unité principale formant le pore sélectif aux ions  $Ca^{2+}$ ,  $\alpha_1$  (transmembranaire), et de trois sous-unités dites régulatrices ou auxiliaires, car elles régulent l'adressage à la membrane plasmique et les propriétés canal de la sous-unité  $\alpha_1$  (Flucher et al., 2005): la sous-unité  $\alpha_2\delta$  qui présente un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire, la sous-unité  $\gamma$  transmembranaire et la sous-unité  $\beta$  entièrement cytoplasmique. Ces sous-unités sont associées de manière non covalente. (Figure 13).



**Figure 13: Représentation schématique de la structure moléculaire d'un canal calcique voltage dépendant.** Tiré de (Weiss, 2006)

Les CCVDs sont formés d'une sous-unité principale  $\alpha_1$ , responsable entre autres de la perméabilité ionique, centrée autour de sous-unités auxiliaires  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  et  $\gamma$ .

La sous-unité  $\alpha_1$  formant le canal est principalement responsable des caractéristiques biophysiques et pharmacologiques du DHPR. Quelques-unes de ces propriétés sont résumées dans le tableau ci-dessous.

<b>Nom du Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 1.1
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	$\alpha_{1S}$ , canal calcique de type L du muscle squelettique, récepteur aux dihydropyridines du muscle squelettique
<b>Informations moléculaires</b>	Homme : 1873aa, L33798, chr.1q31-q32, <i>CACNA1S</i> Rat : 1146aa (séquence partielle), L04684, chr.13, <i>Cacna1s</i> Souris : 1861aa, L06234, chr.1, <i>Cacna1s</i> (voir "Commentaires")
<b>Sous-unités associées</b>	$\alpha_2\delta$ , $\beta$ , $\gamma$
<b>Études fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique, mouvements de charges, contraction du muscle squelettique
<b>Courant</b>	I <sub>Ca,L</sub>
<b>Conductance</b>	13-17 pS (90-110 mM Ba <sup>2+</sup> )
<b>Sélectivité ionique</b>	Ca <sup>2+</sup> > Sr <sup>2+</sup> > Mg <sup>2+</sup> > Ba <sup>2+</sup>
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = 8-14 mV, $\tau_a$ > 50 ms à 10 mV (10 mM Ca <sup>2+</sup> )
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = -8 mV, 40% du courant inactif après 5 secs à -5 mV
<b>Activateurs</b>	BayK8644, autres agonistes des dihydropyridines, FPL64176
<b>Modulateurs de gating</b>	Antagonistes des dihydropyridines (e.g., (+)- isradipine, IC <sub>50</sub> = 13 nM à -90 mV et 0.15 nM à -65 mV
<b>Bloqueurs</b>	Non sélectifs : cadmium (IC <sub>50</sub> = 0.5 mM) Sélectifs de Ca <sub>v</sub> 1.x: verapamil, devapamil (IC <sub>50</sub> < 1 $\mu$ M) et autres phénylalkylamines, (+)- <i>cis</i> -diltiazem (IC <sub>50</sub> < 80 $\mu$ M)
<b>Radioligands</b>	(+)-[ <sup>3</sup> H]isradipine (K <sub>d</sub> = 0.2-0.7 nM) et autres dihydropyridines ; (-)-[ <sup>3</sup> H]devapamil (K <sub>d</sub> = 2.5 nM), (+)- <i>cis</i> -[ <sup>3</sup> H]diltiazem (K <sub>d</sub> = 50 nM)
<b>Fonctions physiologiques</b>	Couplage excitation contraction et homéostasie calcique dans le muscle squelettique (par mobilisation des stocks calciques via le RyR)
<b>Distribution du canal</b>	Tubules transverses des muscles squelettiques (sous forme de tétramères)
<b>Commentaires</b>	Le gène codant la sous-unité Ca <sub>v</sub> 1.1 a été isolé et caractérisé pour la première fois chez le lapin (1873aa, M23919, X05921)

**Tableau II : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques du DHPR.**

Tiré et adapté de (Catterall et al., 2005).

### 2.1.1.1 Rôles du DHPR

Les DHPRs ont une double fonction, de pore ionique perméable au calcium et de détecteur du changement de potentiel de membrane (« voltage sensor » ou « détecteur de potentiel »). Ces deux fonctions sont portées par la sous-unité  $\alpha_1$ .

#### Rôle de canal calcique

Sous l'effet d'une dépolarisation membranaire, le canal s'ouvre et le Ca<sup>2+</sup> entre par diffusion passive créant un courant de type L (tableau II). Le courant de type L est caractérisé par une cinétique d'activation et d'inactivation lente et perdure pendant toute la durée du potentiel d'action

(PA). Cependant, Armstrong montra dès 1972 que le  $\text{Ca}^{2+}$  extra cellulaire ne jouait de rôle essentiel ni dans la propagation du PA ni dans le déclenchement de la contraction de la fibre musculaire squelettique (Armstrong, Bezanilla & Horowicz, 1972). Le rôle physiologique de ce courant dans le muscle squelettique reste encore aujourd'hui à éclaircir. En revanche l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via le DHPR, induit par la dépolarisation de la cellule musculaire cardiaque, est indispensable au déclenchement de la contraction cardiaque.

### **Rôle de détecteur du potentiel**

La persistance de la contraction de la cellule musculaire squelettique en absence de calcium extracellulaire a mis en évidence une deuxième propriété du DHPR, celle de détecteur de potentiel ou « senseur de voltage ». Dès les années 50, le mécanisme possible de détection et de réponse aux changements de potentiel membranaire a été décrit comme pouvant être le résultat d'un déplacement de dipôles au sein de la membrane en réponse à une modification du champ électrique de la membrane. Ces dipôles étant piégés au sein de la membrane plasmique et ne diffusant pas, leurs mouvements donnent naissance à un courant dit de « mouvement de charges » en réponse aux changements de potentiel membranaire. Ces mouvements de charges ont par la suite été identifiés et décrits comme l'élément clé de la détection du voltage au cours du CEC dans le muscle squelettique (Schneider & Chandler, 1973). Les mouvements de charges ont été beaucoup étudiés depuis et leur rôle fondamental dans le CEC est aujourd'hui largement admis.

### **Rôle dans l'entrée de $\text{Ca}^{2+}$ activée par la dépolarisation ?**

Plus récemment, différentes études utilisant des myotubes ou des fibres musculaires adultes ont montré l'existence d'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule musculaire squelettique en réponse aux dépolarisations prolongées ou à des trains de potentiels d'action. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , différente de celle véhiculée par le DHPR, est appelée ECCE (pour Excitation-Coupled  $\text{Ca}^{2+}$  Entry) (Cherednichenko et al., 2004; Cherednichenko et al., 2008). Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  présente une cinétique beaucoup plus lente que celle résultant de l'activation du DHPR et ne se traduit pas par l'enregistrement de courant calcique entrant associé. Le rôle de l'ECCE dans le maintien du transitoire calcique en réponse à une dépolarisation prolongée a cependant été proposé. Cela suggère qu'une modification de cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait être impliquée dans les mécanismes de fatigue musculaire (Gach et al., 2008). L'implication des courants  $\text{Ca}^{2+}$  portés par le DHPR dans la formation de l'ECCE est sujette à controverse, certains travaux ayant montré qu'ils pourraient y contribuer largement, notamment en réponse à des dépolarisations répétées ou prolongées (Bannister & Beam, 2009a; Bannister, Pessah & Beam, 2009b) alors que d'autres éléments suggèrent

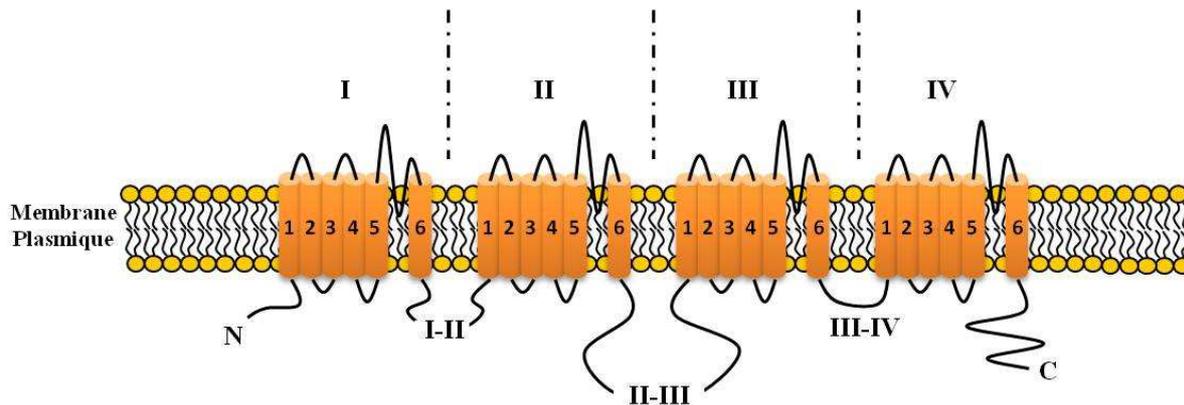
l'existence d'une autre voie d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  encore non identifiée, mais qui pourrait être contrôlée par le couplage conformationnel du DHPR avec le RyR (Cherednichenko et al., 2004; Hurne et al., 2005). La nature de la ou des protéines responsables de cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  reste donc encore à établir.

### **2.1.1.2 Structure moléculaire du DHPR: les différentes sous-unités**

#### **La sous-unité $\alpha 1$**

La nomenclature des CCVDs reposant sur la sous-unité  $\alpha 1$ , les différentes isoformes de la sous-unité  $\alpha$  sont décrites dans le tableau I. L'isoforme squelettique,  $\alpha 1S$  existe sous deux formes dans la membrane des tubules T : une forme longue minoritaire de 212 kDa ( $\alpha 1S_{212}$ ) et une forme tronquée majoritairement présente dans le muscle squelettique, de 175 kDa ( $\alpha 1S_{175}$ ).  $\alpha 1S_{175}$  proviendrait d'un clivage post traductionnel en C-ter de la forme  $\alpha 1S_{212}$  (De Jongh, Merrick & Catterall, 1989; De Jongh et al., 1991). L'expression de chacune de ces deux isoformes dans des myotubes obtenus à partir de souris déficientes pour l'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  a permis de montrer que la forme longue comme la forme courte est capable de générer à la fois un courant calcique de type L et d'induire le déclenchement de la contraction (Beam et al., 1992).

La sous-unité  $\alpha 1S$  s'organise en quatre domaines transmembranaires (domaines I à IV) comportant chacun six segments transmembranaires en hélice  $\alpha$  (S1 à S6). Ces segments transmembranaires sont reliés entre eux par des séquences intra ou extra-cytoplasmiques alors que les domaines I à IV sont reliés par des séquences exclusivement cytoplasmiques appelées boucles I-II, II-III, et III-IV. (Figure 14). Au sein de la boucle I-II, un domaine de 18 acides aminés a été identifié appelé AID (*Alpha Interaction Domain*) qui correspond au principal site d'interaction de la sous-unité  $\alpha 1$  avec la sous-unité  $\beta$  (Chen et al., 2004) (figure 13)



**Figure 14: Organisation structurale de la sous-unité  $\alpha 1S$**

La sous-unité  $\alpha 1$  s'organise en quatre domaines transmembranaires (domaines I à IV), constitués chacun de six segments transmembranaires (segments S1 à S6). Les boucles cytoplasmiques I-II, II-III et III-IV relient respectivement les domaines membranaires I et II, II et III, et III et IV. Les extrémités amino-terminale et carboxy-terminale sont également cytoplasmiques. Les segments S4 de chaque domaine membranaire, riches en résidus basiques, arginines et lysines, constituent le senseur de voltage.

Il a été proposé que les segments S5 et S6 ainsi que la boucle S5-S6 les reliant dans chaque domaine forment le pore ionique du canal en raison de la présence de 4 résidus glutamates (1 par domaine) (figure 14) impliqués dans la perméabilité et la sélectivité du canal pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Dirksen et al., 1997).

Les segments S4 contiennent chacun 4 à 8 acides aminés chargés positivement. L'analogie structurale avec les segments S4 des canaux sodiques et potassiques activés par le voltage pour lesquels il a été montré que ces acides aminés jouaient le rôle de détecteur de potentiel fait que ces segments sont communément considérés comme les sites responsables de la fonction de détection du potentiel au niveau d' $\alpha 1S$  (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996). La dépolarisation de la membrane plasmique provoque donc un déplacement des résidus chargés des segments S4 qui entraîne un changement de conformation de la sous-unité  $\alpha 1S$  et l'ouverture du canal calcique (Bezanilla, 2000). L'étude de la cinétique des mouvements de charges et du courant de type L d'une part et du relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS d'autre part a montré que ce dernier peut être corrélé aux mouvements de charges et non aux courants calciques. Ces résultats confortent le rôle déterminant de ces mouvements de charges dans le CEC. De ce fait, l'amplitude des mouvements de charges est considérée comme l'index quantitatif et qualitatif de la présence de sous-unités  $\alpha 1$  fonctionnelles à la membrane plasmique des cellules.

Cependant, bien que la sous-unités  $\alpha 1$  porte les caractéristiques fonctionnelles et pharmacologiques principales du DHPR, il a été montré que l'ensemble des sous-unités sont

nécessaires à un fonctionnement optimal du DHPR ainsi qu'à la mise en place et au bon fonctionnement du CEC (pour revue voir (Catterall, 2000; McDonald et al., 1994)).

### **Un modèle de souris déficientes pour la sous-unité $\alpha 1S$ : les souris dysgéniques**

Depuis la fin des années 1980, un modèle animal est largement utilisé dans l'étude du rôle physiologique du DHPR dans le CEC au niveau du muscle squelettique : il s'agit des souris dysgéniques ou mdg (pour *muscular dysgenesis*). Ces souris présentent une mutation récessive autosomale dans le gène codant la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR. Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture et une absence complète d'expression de la sous-unité  $\alpha 1S$ . Les animaux homozygotes pour cette mutation présentent un phénotype léthal à la naissance due à une paralysie des muscles respiratoires et du diaphragme. Des myoblastes peuvent être prélevés sur les embryons homozygotes de ces souris puis mis en cultures et différenciés en myotubes. Des études sur ces myotubes montrent une absence totale des courants calciques de type L et des mouvements de charges associés, ainsi qu'une désorganisation des DHPRs dans la membrane plasmique au niveau des triades (Beam, Knudson & Powell, 1986; Knudson et al., 1989; Takekura et al., 1994). On observe également chez ces myotubes une absence totale de CEC, la dépolarisation du sarcolemme ne permettant plus l'activation du relâchement de calcium par le RS (Klaus et al., 1983). La transfection de ces myotubes avec l'ADNc codant la sous-unité  $\alpha 1S$  entraîne la restauration de courants calciques de type L, de mouvements de charges et de la contraction traduisant le rétablissement d'un CEC fonctionnel (Tanabe et al., 1988). Ce modèle a souvent été utilisé pour l'étude des déterminants moléculaires du CEC, et a notamment permis de démontrer le rôle respectif de différents domaines de la sous-unité  $\alpha 1S$  dans le CEC (voir chapitre 3).

### **La sous-unité $\beta$ ou $Ca_v\beta$**

La sous-unité  $\beta$  a la particularité d'être la seule sous-unité du DHPR entièrement cytoplasmique. Il existe plusieurs isoformes de la sous-unité  $\beta$  et plusieurs variants d'épissage pour certains d'entre eux (voir tableau III). Chacuns de ces isoformes présentent un profil d'expression tissulaire qui lui est propre mais tous présentent une structure tridimensionnelle commune composée de deux domaines centraux conservés (les domaines D2 et D4 correspondant respectivement aux domaines SH3 et GK) séparés par un domaine non conservé (domaine D3) et des domaines N-et C-terminaux non conservés (domaines D1 et D5) (figure 15 A.). Dans le muscle squelettique, c'est l'isoforme  $\beta 1a$  correspondant à une protéine de 58 kDa qui est majoritairement présente. Comme tous les isoformes de  $\beta$ ,  $\beta 1a$  interagit avec une forte affinité avec la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1$

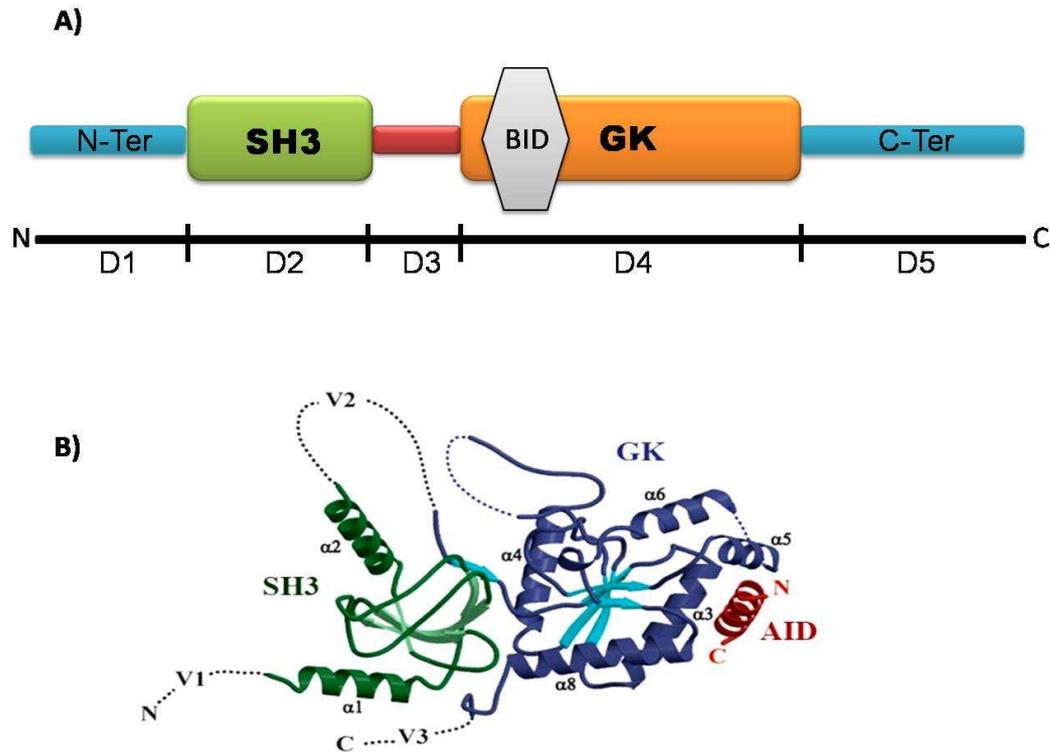
(Richards, Butcher & Dolphin, 2004). Depuis 1994, il était admis que cette interaction faisait intervenir deux motifs conservés, le domaine AID de la boucle I-II et un domaine de 30 acides aminés sur la sous-unité  $\beta$  appelé BID (*Beta Interaction Domain*) (De Waard, Pragnell & Campbell, 1994; De Waard et al., 1996; Pragnell et al., 1994). La co-cristallisation de la sous-unité  $\beta$ 2a et d'un peptide correspondant au domaine AID a cependant amené à la redéfinition du domaine BID. En effet, ce dernier a été remplacé par la notion d'ABP (AID - Binding - Pocket). Le domaine AID dont l'interaction avec la sous-unité  $\beta$  stabilise la structure en hélice  $\alpha$  interagit avec  $\beta$  au niveau d'une région conservée hydrophobe nommée ABP (Van Petegem et al., 2004), la séquence correspondant au domaine BID n'étant pas disponible pour des interactions protéines/protéines.

Isoforme	Nom du gène	Localisation tissulaire principale
$\beta$ 1	CACNB1	$\beta$ 1 a : muscle squelettique, $\beta$ 1b : cerveau, $\beta$ 1c : cœur
$\beta$ 2	CACNB2	cœur, poumon, trachée, aorte, cerveau
$\beta$ 3	CACNB3	Muscle lisse, trachée, aorte poumon, cerveau
$\beta$ 4	CACNB4	cerveau

**Tableau III : Classification et distribution tissulaire des différents isoformes de la sous-unité  $\beta$**

D'après (Karunasekara, Dulhunty & Casarotto, 2009)

Les études cristallographiques ont confirmé la présence sur  $\beta$  d'un domaine guanylate kinase like (domaine GK) et d'un domaine d'interaction protéine/protéine SH3 (Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegem et al., 2004). Ces études ont permis d'obtenir la structure cristalline de la sous-unité  $\beta$ 2a seule et en complexe avec AID (figure 15 B.). Bien que le domaine GK de la sous-unité  $\beta$  soit enzymatiquement inactif en raison de l'absence de site de fixation pour l'ATP (Kistner, Garner & Linial, 1995), il interagit avec le domaine SH3 pour former un cœur structurellement stable. Ces données structurales font de  $\beta$  une nouvelle protéine appartenant à la famille des protéines MAGUK (*membrane associated guanylate kinase*) (Richards et al., 2004)).



**Figure 15: Structure tridimensionnelle de la sous-unité β**

(A). Représentation schématique des différents domaines de la sous-unité β. La sous-unité β consiste en un domaine SH3 (pour Src Homology-3) et un domaine GK (pour Guanylate Kinase). Ces domaines SH3 et GK sont très conservés dans tous les isoformes de β, alors que les régions N et C terminales ainsi que le domaine D3 présente une plus grande variabilité de séquence. (B). Structure cristallographique du complexe sous-unité β<sub>2a</sub> / AID (Van Petegem et al., 2004). Les domaines V1, V2 et V3, non structurés, correspondent aux domaines hypervariables D1, D3 et D5 respectivement. Le domaine AID (en rouge) interagit via une poche électrostatique ou ABP (pour AID Binding Pocket) formée au sein du domaine GK de la sous-unité β.

### Modèles d'animaux déficients pour la sous-unité β1a

L'inactivation du gène codant la sous-unité β1a chez la souris (β1a<sup>-/-</sup> ou β1-null) entraîne la paralysie du diaphragme et des muscles respiratoires conduisant à la mort des embryons dès la naissance. Ce phénotype est identique à celui observé chez les souris dysgéniques, les embryons de souris β1a<sup>-/-</sup> se développent presque normalement jusqu'à la naissance. L'absence de β1a altère l'expression de la sous-unité α1S à la membrane plasmique ce qui participe à la perte du CEC (Gregg et al., 1996). Cette altération de l'adressage membranaire rend difficile l'utilisation de ce modèle pour l'étude directe du rôle de β1a dans le fonctionnement du CEC mais a néanmoins permis de montrer le rôle important de l'interaction de la sous-unité β1a avec le complexe DHPR/RyR dans le contrôle et la régulation du CEC (voir chapitre 3)

Un autre modèle animal présentant une absence d'expression de la sous-unité  $\beta 1a$  a récemment été identifié. Il s'agit d'un mutant naturel de poisson-zèbre dont les larves sont incapables de se déplacer en raison d'une absence de contraction des muscles responsables de la nage. L'étude de ce mutant appelé « zebrafish mutant relaxed » a permis de caractériser les effets de l'absence de  $\beta 1a$  à plusieurs niveaux : (1) la réduction de l'adressage membranaire d' $\alpha 1S$  corrélée à une forte réduction des mouvements de charges membranaires, et (2) une absence complète de l'arrangement caractéristique des DHPRs en tétrades alignées dans la membrane des tubules T (Schredelseker et al., 2005). La ré-expression de  $\beta 1a$  dans des myotubes cultivés à partir de larves de ces mutants restaure l'ensemble des paramètres structuraux et fonctionnels nécessaires à l'établissement d'un CEC efficace (formation de tétrades de DHPR à la triade, mouvements de charges, relâchement transitoire de  $Ca^{2+}$  du RS). De même, l'injection d'ARN codant  $\beta 1a$  directement dans les larves permet une récupération totale de la mobilité (Schredelseker et al., 2009; Schredelseker et al., 2005). Il est intéressant de noter que le muscle squelettique du poisson zèbre non muté présente une absence totale de courant calcique de type L, le DHPR fonctionnant dans ce cas uniquement comme détecteur de potentiel. Cette observation pourrait cependant traduire des différences mécanistiques de CEC entre ce modèle et le modèle murin.

### **Rôles de la sous-unité $\beta$**

Différents rôles des sous-unités  $\beta$  dans les fonctions des CCVDs ont été mis en évidence (Dolphin, 2009).

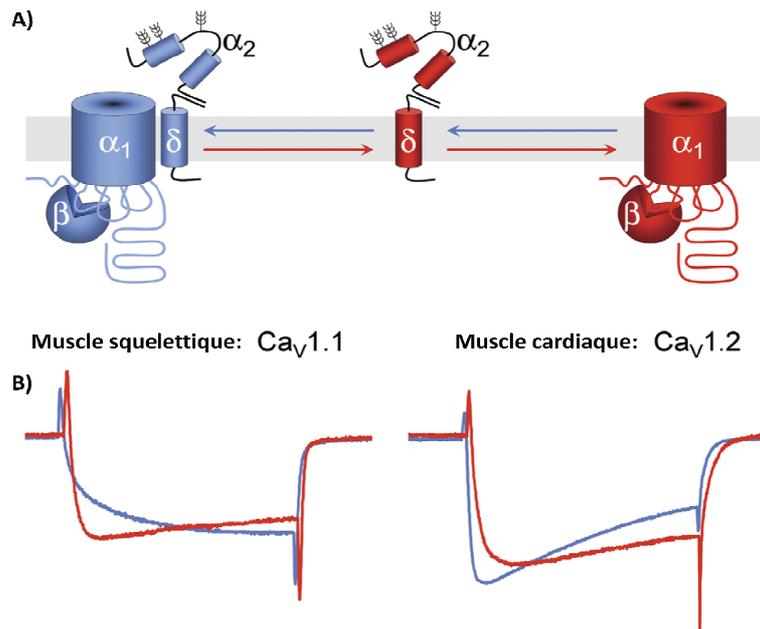
- 1) La sous-unité  $\beta$  régule l'adressage de la sous-unité  $\alpha 1$  à la membrane plasmique et agirait comme une protéine chaperonne de la sous-unité  $\alpha 1$  (Chien et al., 1995). L'hypothèse d'un signal de rétention au réticulum présent sur  $\alpha 1$  et masqué par l'interaction avec  $\beta$  a été proposée pour expliquer le rôle de  $\beta$  dans l'adressage d' $\alpha 1$  à la membrane (Bichet et al., 2000). Néanmoins, bien que la surexpression de  $\beta 1a$  dans des myotubes  $\beta 1a^{-/-}$  permette le recrutement de canaux additionnels à la membrane (Neuhuber et al., 1998), des travaux utilisant le poisson zèbre suggèrent que le rôle dominant de  $\beta 1a$ , dans la cellule musculaire squelettique, ne serait pas l'adressage membranaire d' $\alpha 1S$  dans les triades, mais plutôt l'organisation correcte des DHPRs en tétrades dans la membrane jonctionnelle des tubules T (Schredelseker et al., 2005).
- 2) La sous-unité  $\beta 1a$  est un puissant régulateur du courant calcique de type L porté par le DHPR. Des études électrophysiologiques de myotubes issues de souris  $\beta 1a^{-/-}$  montrent une diminution

de l'amplitude des courants de type L supérieure à celle des mouvements de charges (Strube et al., 1996). Cette étude suggère une action directe de  $\beta$  sur les propriétés biophysiques du DHPR. D'autres travaux ont montré l'importance de la sous-unité  $\beta$ , d'une part dans le contrôle des cinétiques d'activation et d'inactivation du courant calcique et d'autre part dans la dépendance de ce courant vis-à-vis du potentiel de membrane.

- 3) L'utilisation de myotubes obtenus à partir d'embryons  $\beta$  1-/- a également permis de montrer que la sous-unité  $\beta$  du DHPR est nécessaire au déclenchement du relâchement du calcium hors du RS suggérant un rôle plus direct de  $\beta$  dans le couplage fonctionnel entre le DHPR et le RyR1 (Beurg et al., 1999; Sheridan et al., 2003). Plus récemment, une interaction directe entre la sous-unité  $\beta$ 1a et RyR1 a été mise en évidence. L'inhibition de cette dernière entraîne une forte diminution d'efficacité du CEC (Cheng et al., 2005). L'étude des déterminants moléculaire de cette interaction représente une partie de mon travail de thèse et sera décrit au chapitre résultats et discussion.

### **La sous-unité $\alpha$ 2 / $\delta$**

La sous-unité  $\alpha$ 2 $\delta$  est issue d'un seul gène. La protéine produite est clivée après traduction, en deux protéines,  $\alpha$ 2 (cytoplasmique) et  $\delta$  (membranaire). Ces deux protéines restent associées de manière covalente par un pont disulfure pour former une protéine de 143 kDa. Quatre gènes codants les différents isoformes de sous-unités  $\alpha$ 2 $\delta$  ( $\alpha$ 2 $\delta$ -1 à 4) ont été identifiés. Ces différents isoformes présentent un profil d'expression tissulaire spécifique.  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 est l'isoforme majoritaire dans le muscle squelettique. Des expériences de co-expression d' $\alpha$ 2 $\delta$ -1 avec  $\alpha$ 1S ont montré que l'association préalable de ces deux sous-unités ne modifie ni l'expression fonctionnelle ni l'adressage du canal au niveau de la triade (Obermair et al., 2005). La même étude a cependant montré que la sous-unité  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 avait un effet différent sur les cinétiques d'activation des courants de type L dans les muscles squelettique et cardiaque (figure 16). Récemment, l'utilisation de siRNA spécifique d' $\alpha$ 2 $\delta$ -1 dans des myotubes a permis à l'équipe de Paul D. Allen de montrer l'implication de cette sous-unité dans l'entrée de calcium associée à des dépolarisations prolongées, ECCE. Cette étude démontre également que la sous-unité  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 n'est pas indispensable à l'organisation des DHPRs en tétrades au sein de la membrane plasmique (Gach et al., 2008).



**Figure 16: Modulation des CCVDs squelettique et cardiaque par la sous-unité auxiliaire  $\alpha 2\delta$ .**

Tiré de (Obermair, Tuluc & Flucher, 2008)

(A). Dans la membrane plasmique, les complexes macromoléculaires  $\alpha 1/\beta$  peuvent être associés ou non à la sous-unité  $\alpha 2\delta$ . (B). Au niveau du canal  $Ca_v1.1$  du muscle squelettique (traces de gauche), l'absence de sous-unité  $\alpha 2\delta$  -1 provoque une accélération de l'activation et de l'inactivation du courant de type L (trace rouge versus trace bleue). Au contraire, au niveau du canal  $Ca_v1.2$  du muscle cardiaque (traces de droite), l'absence de sous-unité  $\alpha 2\delta$  (tracé rouge) entraîne un ralentissement des cinétiques d'activation et d'inactivation du courant calcium (tracé bleu). Ainsi, la dissociation et l'association des sous-unités  $\alpha 2\delta$  et  $\alpha 1$  pourraient représenter un mécanisme de régulation des cinétiques des courants des CCVDs.

### Un modèle de souris déficientes pour la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 ?

L'obtention de souris dont le gène codant la sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 est invalidé a rencontré beaucoup de difficultés. En effet, les embryons homozygotes mourant dès les premières étapes du développement embryonnaire. La sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 étant aussi exprimée au niveau du système cardiovasculaire et le système nerveux, la mort des embryons est probablement due à un dysfonctionnement cardiovasculaire. Ces difficultés démontrent l'importance du rôle joué par  $\alpha 2\delta$ -1 dans le développement. Une équipe a cependant récemment réussi à obtenir une souris viable déficiente en sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1. Cette souris présente un phénotype cardiaque de diminution de la contractilité basale et de réduction des courants de type L (Fuller-Bicer et al., 2009) . Ce modèle représente un outil pour de futures études sur l'importance fonctionnelle de cette sous-unité dans le CEC.

### La sous-unité $\gamma$

La sous-unité  $\gamma$  est composée de 222 acides aminés pour un poids moléculaire de 30 kDa. Elle possède 4 segments transmembranaires. Plusieurs isoformes de cette sous-unité ont été clonés

( $\gamma 1$  à 8). Dans le muscle squelettique, c'est l'isoforme  $\gamma 1$  qui est exclusivement exprimée. Il existe un modèle de souris dont le gène codant la sous-unité  $\gamma 1$  est invalidé (les souris  $\gamma 1$ -null). Ces souris sont viables et ne présentent pas de phénotype particulier (Freise et al., 2000). Des expériences de ré-expression de la sous-unité  $\gamma 1$  dans des myotubes de souris  $\gamma 1$ -null ont montré que cette sous-unité n'était impliquée ni dans l'expression fonctionnelle ni dans l'association des différentes sous-unités du canal. Ces travaux montrent également que l'association de la sous-unité  $\gamma 1$  au complexe formant le DHPR nécessite la présence de la sous-unité  $\alpha 1S$  (Arikkath & Campbell, 2003). Il a aussi été montré que l'absence de  $\gamma 1$  entraîne un ralentissement de la cinétique d'activation du DHPR tout en augmentant l'amplitude des courants calciques de type L dans les myotubes (Freise et al., 2000). Cependant, d'autres études fonctionnelles réalisées sur des myotubes de souris  $\gamma 1$  null et sur des fibres adultes présentent des résultats contradictoires notamment concernant l'effet de cette sous-unité sur le relâchement de calcium hors du RS induit par l'activation du DHPR (Ahern et al., 2001c; Ursu et al., 2004). Le rôle exact de cette sous-unité reste donc controversé.

## **2.1.2 Le récepteur de la ryanodine, canal calcique du réticulum sarcoplasmique**

### **2.1.2.1 Généralités**

Le RyR1 fut la première protéine identifiée comme un composant moléculaire des triades. Ce récepteur est un homotétramère formé de 4 sous-unités. Chacune de ses sous-unités possède 5035 acides aminés et a un poids moléculaire de 565 kDa. Cette protéine est le plus grand canal ionique connu à ce jour. Dans la fibre musculaire squelettique, le RyR est ancré dans la membrane du RS, sur la face jonctionnelle des citernes terminales où il contrôle la libération du  $Ca^{2+}$  hors du RS. Le récepteur à la ryanodine est le principal canal calcique responsable du relâchement du  $Ca^{2+}$  hors du RS induit par la dépolarisation. Comme cela a été décrit au chapitre précédent, dans le muscle squelettique, le  $Ca^{2+}$  relâché par le RS est responsable du déclenchement de la contraction des fibres musculaires. En raison de l'activation des différents processus décrits au paragraphe 1.4.2.1, l'élévation rapide de la concentration calcique cytosolique qui résulte de la libération de  $Ca^{2+}$  hors du RS est transitoire. Le signal calcique correspondant à l'activation du RyR est de ce fait appelé « transitoire calcique ». Le nom de « récepteur à la ryanodine » provient de la capacité de ce dernier à fixer un alcaloïde d'origine végétale, la ryanodine. La ryanodine est extraite d'arbres et d'arbustes tropicaux du genre *Ryania* et fut utilisée comme insecticide naturel au début des années 50.

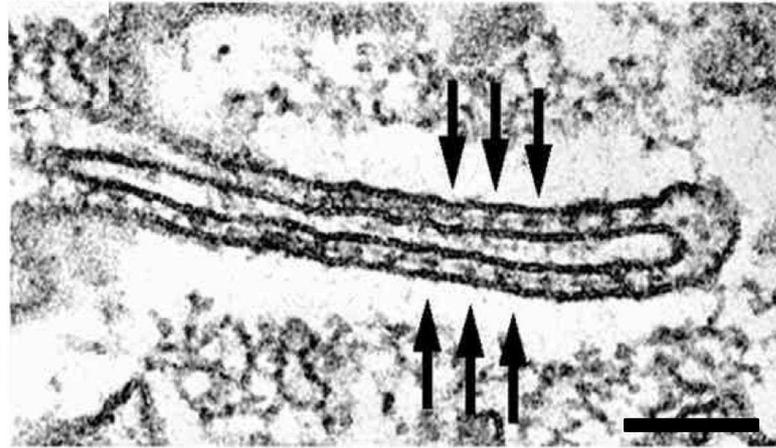
Le RyR de muscle squelettique (RyR1) fut le premier récepteur cloné et séquencé (Takeshima et al., 1989; Zorzato et al., 1990). Depuis deux autres isoformes (RyR2 et RyR3) correspondant à l'expression de deux autres gènes ont été identifiés et clonés chez les mammifères (Hakamata et al., 1992; Nakai et al., 1990; Otsu et al., 1990). Bien que distincts génétiquement, ces trois isoformes présentent près de 70 % d'homologie de séquence entre eux. RyR1 est principalement exprimé dans le muscle squelettique, RyR2, principalement exprimé dans le muscle cardiaque et RyR3, initialement identifié dans le cerveau, est exprimé de façon plus ubiquitaire dans différents tissus, notamment dans les muscles squelettiques, les muscles lisses et le cerveau (Sorrentino & Volpe, 1993) (tableau IV). Les études menées sur l'expression du RyR3 chez des mammifères montrent cependant que ce dernier se situe préférentiellement dans les zones non jonctionnelles de la citerne terminale et n'est donc pas directement couplé avec les DHPR (Felder & Franzini-Armstrong, 2002). Il a aussi été montré que son expression diminuait plus ou moins rapidement suivant le type de muscles pendant le développement (Flucher et al., 1999). Le rôle fonctionnel exact du RyR3 dans la physiologie du muscle squelettique reste à définir.

Physiologiques et pharmacologiques.	Principale localisation tissulaire	Nombre d'acides aminés (Homme)	Facteur d'activation
RyR 1	Muscle squelettique	5038	DHPR (détecteur de potentiel), Ca <sup>2+</sup> cytosolique
RyR 2	Muscle cardiaque, cerveau, muscle lisse	4967	Ca <sup>2+</sup> cytosolique
RyR 3	Cerveau, diaphragme, muscle squelettique, muscle lisse, poumon, testicules	4870	Ca <sup>2+</sup> cytosolique

**Tableau IV: Caractéristiques des différents isoformes du RyR.**

### 2.1.2.2 Structure tridimensionnelle

Sur les images de fibres musculaires et/ou de préparation membranaire de RS obtenues en microscopie électronique, on observe au niveau des triades de larges structures cytoplasmiques électroniquement denses occupant l'espace inter-membranaire étroit (environ 12 nM) entre la membrane des tubules T et la membrane du RS (Franzini-Armstrong, Protasi & Ramesh, 1999). Ces structures furent à l'origine appelées « pieds » ou « pieds jonctionnels » (Franzini-Armstrong, 1970) (figure 10 et 17). L'obtention des premières images du RyR squelettique purifié montra des objets de taille et de forme correspondant à celles des « pieds » (Lai et al., 1988) qui furent identifiés comme correspondant aux domaines cytosoliques des RyRs.

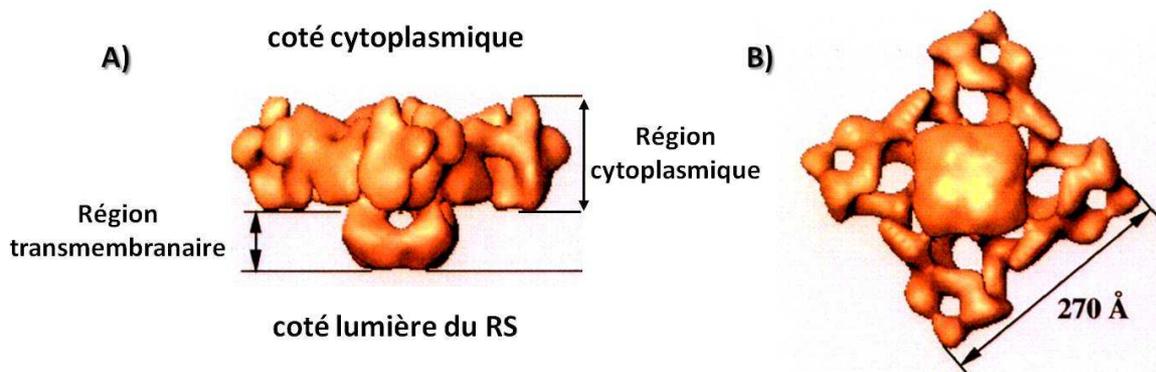


**Figure 17: Image d'une triade observée en microscopie électronique.**

Tirée de (Protasi, 2002) image de Clara Franzini-Armstrong.

Image d'une triade du muscle de la vessie natatoire de poisson. Les flèches indiquent les zones de forte densité électronique régulièrement espacées le long de la jonction triadique qui furent appelées « pieds » avant d'être identifiées comme étant les parties cytoplasmiques des RyRs. Barre, 0,1 µm.

Le domaine hydrophobe du RyR formant la partie canal est inséré dans la membrane du RS, laissant la partie hydrophile plus grande (le pied jonctionnel) exposée au cytosol (figure 18). Cette partie canal est composée des acides aminés C-terminaux (Bhat et al., 1997). Les acides aminés restants (N-terminaux) forment le pied jonctionnel et représentent environ 80 % du poids de la molécule. Les quatre sous-unités du RyR s'assemblent via leur partie C-terminale pour former un complexe RyR tétramérique fonctionnel. Le RyR forme un parallélépipède de base carré d'environ 27nm de côté et de 12 nm d'épaisseur (Samso & Wagenknecht, 1998).



**Figure 18: Représentation de la structure 3D du RyR**

Adapté de (Serysheva et al., 1995).

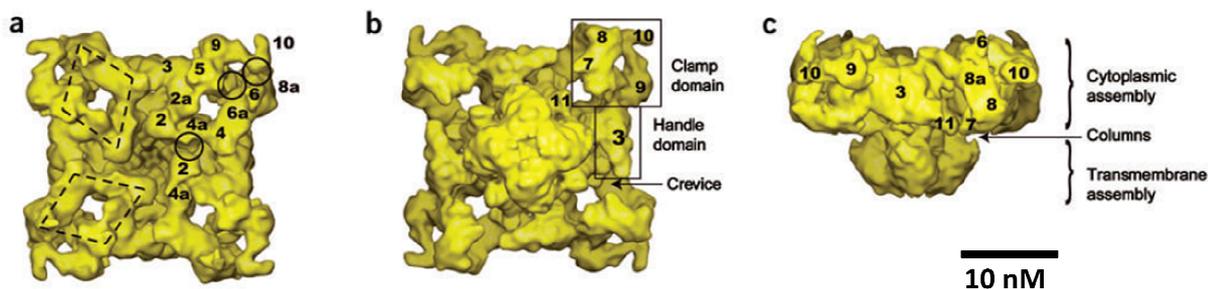
Représentation tridimensionnelle du RyR1 modélisée à partir d'images, obtenues par cryomicroscopie électronique, de particules du RyR1s purifiées. Ici le RyR est en configuration fermée. (A) Vue de côté, on distingue les deux régions transmembranaires et cytoplasmiques. (B) Vue de la face luminale, la partie cytoplasmique forme un parallélépipède d'environ 270 Å de côté.

La taille et la nature membranaire du RyR en font une protéine dont il est encore aujourd'hui difficile d'étudier la structure. Aucun cristal du RyR n'a pu être obtenu à ce jour hormis des arrangements pseudo cristallins en deux dimensions (Yin & Lai, 2000). Les cristaux ne permettent pas de déterminer la structure par cristallographie aux rayons X. Les données sur sa structure tridimensionnelle proviennent donc de modélisation réalisée à partir d'images du RyR isolées obtenues par cryomicroscopie électronique (cryo-EM) (Serysheva et al., 2007). Les molécules du RyR purifiées sont rapidement congelées puis observées par microscope électronique à transmission. Grâce aux immenses progrès réalisés non seulement dans l'obtention des images de microscopie électronique à différents angles, mais également dans les techniques d'analyses d'images et de modélisation, cette approche permet aujourd'hui de produire des structures d'une résolution de l'ordre de 5 à 10 Angströms (Å) pour certains domaines du RyR. Les connaissances acquises par des méthodes cristallographiques sur la structure d'autres canaux ioniques tels que les canaux potassiques (Doyle et al., 1998) sont également utilisées pour affiner la modélisation de la partie canal du RyR (Samso, Wagenknecht & Allen, 2005).

Cependant, malgré les avancées techniques, les études structurales du RyR restent loin de la résolution atomique et ne permettent qu'une localisation imparfaite de ses différents domaines fonctionnels.

Les modèles obtenus à ce jour proposent des structures tridimensionnelles très proches pour les trois isoformes du RyR. Globalement le RyR possède une structure en forme de champignon formé par la superposition de deux parallélépipèdes correspondant respectivement à la partie cytoplasmique et transmembranaire de la molécule. Ces deux domaines sont reliés par des zones en forme de colonnes (Adachi et al., 2004; Serysheva et al., 1995; Wagenknecht & Radermacher, 1995) (figure 19C). Deux régions ont pu être définies dans la partie cytoplasmique, des régions dites « *clamp* » formant une sorte de pince à chaque extrémité de la molécule connectée par des régions en forme de manche (appelé « *handle* »). Les RyRs interagissent entre eux au niveau des régions « *clamp* » (Serysheva et al., 1999) (figure 19B). L'analyse d'image du RyR purifié stabilisé en position ouverte ou fermé montre que cette région du « *clamp* » subit des changements de conformation significatifs durant l'ouverture du RyR (Orlova et al., 1996; Yin, Blayney & Lai, 2005). L'identification de séquences du RyR impliquées dans la liaison de grosses molécules (anticorps ou protéines partenaires), combinées à l'obtention d'images de microscopie électronique de RyRs en interaction avec ces molécules, a permis de positionner ces séquences d'acides aminés dans le modèle de structures tridimensionnelles du RyR (Ludtke et al., 2005; Samso et al., 2005)

(figure 19). Ainsi, ces données ont permis de mettre à jour une corrélation entre des éléments de structures secondaires et de nouveaux détails structuraux.



**Figure 19: Représentation tridimensionnelle du RyR1 dans différentes vues**

Tirée de (Samso et al., 2005)

(a) Vue de la face cytoplasmique, les cercles représentent les zones de contact entre des domaines proches 2-4a, 5-6, et 10-8a, (b) Vue de la face luminale du RS, (c) vue de côté. Les numéros indiquent les différentes régions caractérisées: Les régions 2, 4, 5, 6 font face aux tubules T, et pourraient représenter des zones d'interaction avec le DHPR (traits pointillés en a).

### 2.1.2.3 Propriétés électrophysiologiques et biophysiques du canal calcique RyR

La cinétique extrêmement rapide du relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire au déclenchement de la contraction musculaire orienta très tôt les recherches vers l'identification d'un canal calcique dans la membrane du RS. L'existence d'un tel canal fut démontrée par la mesure d'un courant calcique à partir d'une préparation de membrane du RS reconstituée en membrane lipidique artificielle (Coronado et al., 1992). L'étude des propriétés électrophysiologiques, par la technique de reconstitution en membrane lipidique artificielle, du RyR purifié a permis de démontrer que le RyR représente le canal calcique du RS responsable du relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par la dépolarisation de membrane plasmique (Lai et al., 1988). Le RyR est un canal perméable à différents ions monovalents et divalents avec une forte sélectivité pour les cations par rapport aux anions (Coronado et al., 1994). Il présente une conductance élevée pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (100 pS en 50 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , (Smith et al., 1988)) mais une faible sélectivité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  par rapport aux cations monovalents avec des rapports de perméabilité de 5 avec l'ion sodium ( $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^+} = 5$ ) et 6 avec le potassium ( $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{K}^+} = 6$ ).

### 2.1.2.4 Pharmacologie : régulation par des facteurs exogènes

Peu de molécules ont montré un effet spécifique sur le RyR. Le cas des toxines actives sur le RyR sera abordé dans un paragraphe spécifique.

### Ryanodine

La ryanodine est l'effecteur le plus puissant de ce canal calcique. Les mêmes effets sont observés sur les 3 isoformes du RyR. La fixation de ryanodine sur le RyR induit des modifications importantes et doses dépendantes de ces propriétés de canal calcique. De faibles concentrations de ryanodine (de l'ordre de 10 nM) induisent une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal sans changer sa conductance. Des concentrations intermédiaires ( $\approx 1$  à  $10 \mu\text{M}$ ) stabilisent l'état ouvert du canal RyR en le maintenant dans une conformation caractérisée par une valeur de conductance inférieure à la valeur maximale mesurée en absence de ryanodine. Enfin, une concentration élevée de ryanodine ( $\approx 100 \mu\text{M}$ ) bloque le RyR dans la conformation fermée. Plusieurs études portant sur RyR2 ont montré que la ryanodine se fixe dans la région canal de la protéine et en modifie le diamètre (Fill & Copello, 2002; Fill, 2002). La mesure de liaison de ryanodine tritiée sur le RyR purifié montre l'existence de quatre sites de liaison de ryanodine de haute affinité ( $K_d < 50 \text{ nM}$ ) par RyR fonctionnel (forme tétramérique). Ainsi, une coopération entre ces sites pourrait expliquer la diversité des effets de la ryanodine sur le RyR. Certaines études suggèrent cependant l'existence d'un site supplémentaire de faible affinité ( $K_D > 1 \mu\text{M}$ ) (Pessah & Zimanyi, 1991) responsable de l'effet bloqueur. La sensibilité de la liaison de ryanodine aux différents effecteurs du RyR (activateur ou inhibiteurs) suggère fortement que la fixation de ryanodine sur son site de haute affinité dépend de l'état d'activation du canal, la ryanodine se liant préférentiellement sur le RyR lorsque celui-ci est dans l'état « ouvert » (Chu et al., 1990). L'affinité apparente de la ryanodine pour le RyR et donc son taux de fixation sont devenus des indicateurs biochimiques de la probabilité d'ouverture du RyR. On a ainsi pu étudier l'état d'ouverture du canal en étudiant la liaison de ryanodine tritiée ( $[^3\text{H}]$  ryanodine) (Meissner, 1992). Ses caractéristiques font de la ryanodine, un composé largement utilisé comme outil pharmacologique dans l'étude du CEC.

### Caféine

Contrairement à la ryanodine, la caféine est un effecteur de faible affinité du RyR. Bien que les effets de la caféine puissent varier en fonction des concentrations utilisées, la présence de caféine entraîne systématiquement une augmentation de l'activité canal du RyR. Des concentrations de caféines inférieures à 2 mM augmentent la probabilité d'ouverture du canal uniquement en présence de concentration activatrice de calcium ( $\mu\text{M}$ ). En présence de concentrations supérieures à 5 mM, l'activation du canal est observée même en absence de calcium (Csernoch, Szentesi & Kovacs, 1999). La caféine est couramment utilisée pour induire l'activation du RyR et le relâchement de

$\text{Ca}^{2+}$  hors du RS. Un effet de la caféine sur la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  témoigne de la présence de RyR.

Très peu de molécules inhibitrices spécifiques du RyR ont été identifiées. La tétracaine, un anesthésique local de la famille des amino-esters, et le rouge de ruthénium, un colorant inorganique, sont les seules molécules inhibitrices de l'activité canal du RyR mais leurs spécificités restent débattues.

#### **2.1.2.5 Un modèle de souris déficientes pour RyR1 : les souris dyspédiques**

Contrairement aux souris dysgéniques qui proviennent d'une mutation spontanée du gène codant la sous-unité  $\alpha 1$  du DHPR, les souris RyR-*null*, ou souris dyspédiques, furent obtenues par l'inactivation du gène codant RyR1. Comme les souris dysgéniques, les souris dyspédiques homozygotes (deux allèles du RyR1 invalidés) meurent dès la naissance par asphyxie due à une paralysie des muscles respiratoires. Les myotubes obtenus à partir d'embryons RyR-/- présentent une absence totale de CEC (Takeshima et al., 1994). L'expression du RyR1 dans ce type de myotubes obtenue par transfection d'ADNc correspondant au gène codant RyR1 entraîne la restauration d'un relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS induit par dépolarisation de la membrane plasmique (Nakai et al., 1996). En revanche, l'expression exogène du RyR2 ou du RyR3 dans ces myotubes de souris dyspédiques ne permet pas le rétablissement du CEC de type squelettique. L'expression du RyR2 dans ces myotubes permet l'établissement d'un couplage de type cardiaque, le relâchement de calcium du RS étant induit par l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (Fessenden et al., 2000; Nakai et al., 1997). Une observation particulièrement intéressante faite sur les myotubes d'embryons RyR *null* a été l'absence quasi totale de courant calcique de type L malgré une densité de mouvements de charges peu modifiées traduisant une expression normale du DHPR à la membrane plasmique. Ces résultats ont montré pour la première fois que la présence du RyR1 contrôle de façon extrêmement forte l'activité canal calcique du DHPR. Ce processus fut appelé « couplage rétrograde ».

Ce modèle a donc non seulement permis de confirmer le rôle primordial joué par le RyR dans le processus du CEC mais également de mettre en évidence un nouveau degré de complexité dans la relation fonctionnelle entre RyR et DHPR.

### **2.1.2.6 Contrôle de l'activité du RyR**

L'activation du RyR représente une étape clé du déclenchement de la contraction musculaire et plus généralement de la signalisation calcique dans de nombreuses cellules. Mais le contrôle de l'activité de ces canaux dit « au repos » c'est-à-dire en l'absence de toute stimulation de la cellule est également extrêmement important. En effet, en dehors de toute stimulation ces canaux présentent une activité « spontanée » qui doit être régulée de façon stricte. Il est cependant très difficile de différencier les mécanismes de contrôle de l'activation du RyR de ceux contrôlant l'activité « spontanée » du RyR.

La principale voie d'activation du RyR1 passe par l'activation du DHPR en réponse à la dépolarisation du sarcolemme. Cependant, le RyR forme un complexe macromoléculaire géant avec de nombreuses protéines présentes dans la membrane ou dans la lumière du RS ainsi qu'avec des protéines cytoplasmiques. Ces protéines interagissent directement ou indirectement avec le RyR et sont capables de moduler son fonctionnement. Certaines protéines interagissent à la fois avec le RyR et le DHPR (voir tableau V) (pour revue voir (Treves et al., 2009) et (Fill & Copello, 2002)). Des ligands de nature non protéique régulent aussi l'activité du RyR, c'est le cas des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ainsi que des petites molécules comme l'ATP et l'ADP (Laver, 2005). Le potentiel d'oxydo-réduction de la cellule joue également un rôle important dans le contrôle de l'activité du RyR (Eu et al., 2000; Hidalgo, 2005; Reid, 2001). De même, l'état de phosphorylation du RyR régule son activité. Ces facteurs influent de façon différente sur chacun des isoformes du RyR. Cette diversité d'action participe à la différence de régulation du CEC squelettique et cardiaque. De part ses multiples effecteurs, le RyR, et en particulier RyR1, se trouve donc au croisement de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Les principaux acteurs du contrôle de l'activité des RyRs sont présentés ci-dessous.

#### **2.1.2.6.1 Les protéines associées au RyR**

##### ✓ La calmoduline (CaM)

La CaM est une protéine cytoplasmique (17 kDa) capable de lier le calcium via 4 motifs de type EF-Hand. Elle est exprimée de façon ubiquitaire et participe à de nombreux processus biologiques dépendants du calcium dont le CEC en modulant l'activité du RyR via des interactions directes. Il existe deux formes de CaM selon qu'elle est complexée ou non au  $\text{Ca}^{2+}$ . L'apo-CaM représente la forme non liée au  $\text{Ca}^{2+}$ , la  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM celle liée au  $\text{Ca}^{2+}$ . L'obtention d'images de microscopie électronique de complexe RyR1/ $\text{Ca}^{2+}$ -CaM a permis de localiser des sites de fixation de la  $\text{Ca}^{2+}$ -

CaM. Elle se fixe sur des sites situés sur la partie cytoplasmique de la molécule dans une région proche du pore ionique et en liaison directe avec les segments transmembranaires (Samso & Wagenknecht, 2002; Wagenknecht et al., 1997). Le nombre exact de sites de fixation de l'apo-CaM et de la  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM sur le RyR ainsi que le rôle fonctionnel exact de chacun de ces sites reste controversé (pour revue voir Fill & Copello, 2002). L'équipe de Tripathy a montré qu'à de faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  (nM), l'apo-CaM active le RyR1 alors qu'à des concentrations plus fortes (50 à 100  $\mu\text{M}$ ), la  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM inhibe l'activité du canal (Tripathy et al., 1995). Les deux protéines se fixent sur le RyR1 avec une affinité comprise entre 5 et 50 nM. La régulation du RyR1 par la CaM est modifiée par d'autres facteurs de régulation du RyR1 tels que son état d'oxydation (Hamilton & Reid, 2000).

Il a également été montré que la CaM interagit avec le DHPR et en régule l'activité. En absence de CaM, le site de fixation de la CaM sur le DHPR pourrait interagir avec un des sites de fixation de la CaM sur RyR1 (Sencer et al., 2001). Une participation de la CaM à la régulation de l'interaction RyR1/DHPR lors du CEC n'est donc pas à écarter même si son rôle précis n'a pas encore été défini (pour revue, voir (Hamilton, Serysheva & Strasburg, 2000)).

✓ Les FK506 binding proteins (FKBP) : la FKBP12

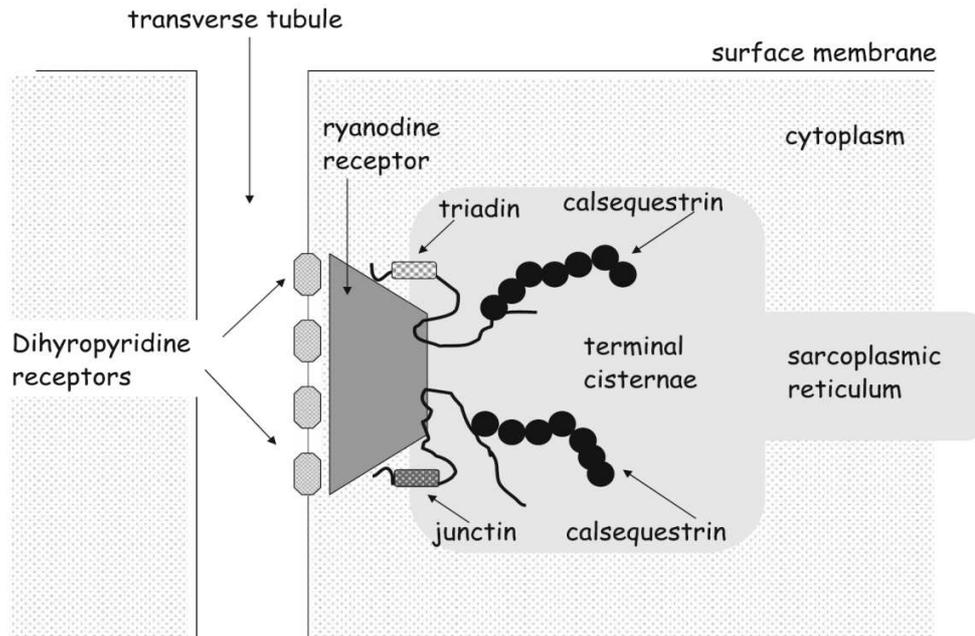
La protéine FKBP12 (aussi appelée calstabin) appartient à la famille des immunophilines, récepteurs cytosoliques des molécules immunosuppressives que sont la rapamycine et la FK506. De façon inattendue, la FKBP12 fut identifiée comme un partenaire constitutif du RyR1 dans le muscle squelettique. Le RyR est encore à ce jour une des rares protéines identifiées comme interagissant avec la FKBP12. Dans le muscle cardiaque, RyR2 s'associe avec l'isoforme FKBP12.6. Ces protéines s'associent au RyR dans des proportions stœchiométriques, on trouve donc 4 FKBP12 fixés sur chaque canal RyR. En présence de FK506 ou de rapamycine, la FKBP12 se dissocie du RyR. La comparaison d'images de cryoME du RyR1 en présence de FKBP12 ou après traitement avec la FK506 ou la rapamycine, montre la fixation de FKBP12 dans une région proche du site de fixation de la CaM (Wagenknecht et al., 1997). Ce positionnement a récemment été confirmé par la technique du transfert d'énergie de fluorescence (FRET) (Cornea et al., 2010). Les FKBP sont considérées comme des protéines de type chaperonnes c'est-à-dire capable de modifier et/ou stabiliser l'état conformationnel des protéines auxquelles elles s'associent, en particulier via leur activité prolyl isomérase. Les FKBP agissent comme des sous-unités régulatrices du RyR en stabilisant le complexe macromoléculaire formé par le RyR et permettent l'ouverture et la fermeture coordonnées de ces 4 sous-unités (Fill, 2002). En effet, plusieurs travaux ont montré que la

dissociation du complexe RyR1/FKBP12 entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture du RyR1 avec l'apparition de quatre niveaux de sous-conductance. Ces états de sous conductance pourraient correspondre à l'activité de chacun des monomères du RyR formant le canal calcique qui en absence de FKBP12 seraient activés indépendamment les uns des autres. Le rôle de FKBP12.6 dans le contrôle de l'activité du RyR2 reste moins bien compris. De plus, il a été proposé que, dans la membrane du RS, des RyRs adjacents fonctionnent de façon coordonnée (ouverture et fermeture simultanées). Ce phénomène de couplage appelé « coupled gating » permettrait le contrôle de l'activité des RyRs non couplés au DHPRs par les RyRs couplés aux DHPR (Marx et al., 2001; Marx, Ondrias & Marks, 1998). Ces travaux suggèrent un rôle crucial de la FKBP12 dans la synchronisation des RyRs au sein de la triade. De même, une étude sur des fibres musculaires squelettiques pelées montre un rôle direct de la FKBP12 dans le CEC. L'absence de FKBP12 entraîne une diminution de l'amplitude du relâchement de  $Ca^{2+}$  induit par la dépolarisation (Lamb & Stephenson, 1996). Enfin, il a été montré que la formation du complexe RyR1/FKBP12 favorise l'interaction du RyR1 avec un domaine de la boucle II-III du DHPR (O'Reilly et al., 2002). Cependant, l'inactivation du gène codant la FKBP12 chez la souris n'entraîne que très peu de modifications physiologiques des muscles squelettiques, probablement due à la surexpression d'une autre isoforme de FKBP (Shou et al., 1998).

- ✓ Les protéines du réticulum sarcoplasmique : triadine, junctine, et calséquestrine (CSQ) (voir aussi paragraphe 1.4.2.3)

La Triadine et la junctine sont deux protéines transmembranaires de la membrane des citernes terminales du RS des muscles squelettiques et cardiaques. Ces deux protéines sont formées d'une courte queue N-terminale cytoplasmique, d'un seul segment transmembranaire et d'une partie C-terminale hautement chargée située dans la lumière du RS. Différents isoformes de la triadine, résultant d'épissage alternatif d'un seul gène, sont exprimés dans le muscle squelettique et cardiaque. La principale forme présente au niveau de la triade est la forme la plus longue de 95 kDa. Triadine et junctine sont capables d'interagir à la fois avec RyR1 et la calséquestrine de type 1 dans le muscle squelettique (CSQ1) (figure 20). Les mesures de l'activité canal du RyR1 reconstitué dans une bicouche lipidique artificielle en présence ou en absence de CSQ, de triadine et/ou de junctine ont montré une relation étroite entre ces protéines dans la régulation de l'activité du RyR1 (Beard et al., 2002; Szegedi et al., 1999). Plus récemment, une diminution significative de l'amplitude du transitoire calcique induite par la dépolarisation, traduisant une diminution d'efficacité du CEC, a été associée à l'absence de triadine. (Goonasekera et al., 2007). La même étude montre également

que la triadine et la junctine se fixent sur des sites différents du RyR1 suggérant une régulation indépendante du RyR1 par ces deux protéines. De plus, le domaine cytoplasmique de la triadine interagit avec le domaine cytoplasmique du RyR1 et un anticorps dirigé contre ce domaine modifie l'activité canal du RyR1 et le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS (Groh et al., 1999) . La junctine jouerait plutôt un rôle dans le maintien des stocks calciques (Beard, Wei & Dulhunty, 2009a; Wang et al., 2009).



**Figure 20: Représentation schématique de l'arrangement RyR/[triadine/Junctine/CSQ] au sein d'une triade**

Tirée de (Beard et al., 2009a)

La triadine et la junctine forment avec la CSQ, un complexe multiprotéique dans la lumière du RS capable de s'associer avec le RyR, de le réguler, et jouer un rôle de détecteur du  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. La CSQ permet de concentrer le  $\text{Ca}^{2+}$  luminal au niveau de son site de relâchement.

Nom de la Protéine	Description / Propriétés	Taille / Localisation principale	Zones d'interaction(s) sur le RyR	Rôle / Effet	Références bibliographiques
mitsugumin-29 (ou MG29)	- 4 domaines transmembranaires - forme des hexamères	29 kDa / membrane des tubules transverses (fibres adultes)	?	-augmente la probabilité d'ouverture du RyR (en bicouche lipidique) -l'absence de MG29 : modification ultrastructurale de la triade et dysfonctionnement des flux calciques	(Pan et al., 2004; Pan et al., 2002; Treves et al., 2009)
CLIC2 (Chloride Intracellular Channel 2)	-nouvelle protéine associée à RyR1 - relative à la famille des glutathione transférase (homologie de séquence)	27 kDa/ muscle squelettique et cardiaque (cytoplasme)	Région comprise entre les domaines 5 et 6 dans la région « clamp »	- augmente la liaison de la ryanodine sur RyR1 (en augmentant l'affinité de la ryanodine pour RyR1) - diminue le relâchement de Ca <sup>2+</sup> - Stabilise RyR1 dans son état fermé (en bicouche lipidique) - modifie la conformation 3D du RyR1	(Meng et al., 2009)
protéine S100A1	-homodimère -famille des protéines liant le Ca <sup>2+</sup> -Interaction sur RyR1 dépendante du Ca <sup>2+</sup>	20 kDa/ membrane du RS	-Résidus 3616-3627 (région conservée sur RyR1 et 2 humains) -même domaine d'interaction que la CaM	-augmente la probabilité d'ouverture du RyR1 -stimule le relâchement de Ca <sup>2+</sup> induit par le Ca <sup>2+</sup>	(Divet et al., 2005; Wright et al., 2008)
Annexine VI	protéine liant les phospholipides de manière dépendante du Ca <sup>2+</sup> .	67 kDa / lumière du RS		modulateur physiologique du RyR : activation par des concentrations nM en bicouche lipidique	(Diaz-Munoz et al., 1990; MacKrell, 1999)
<b>Homer</b> (ou ves1)	-famille multigénique avec variants d'épissage - cytoplasmique ou membranaire -multimérisation - rôles dans signalisation calcique	22 kDa /cerveau, muscle squelettique et cardiaque (cytoplasme), poumon	région riche en proline : domaine PPXXF (RyR1) ou PPXXΦ via un domaine EHV1 sur Homer	-effet d'Homer1 sur le CEC remarque : Interaction possible avec les sous-unités β1a et α1S du DHPR car ces deux sous-unités contiennent des séquences correspondant au site de liaison d' Homer	(Feng et al., 2002; Pouliquin & Dulhunty, 2009)
<b>JP45</b>	-1 seul segment transmembranaire -interagit avec la CSQ, la sous-unité α1S et β1a du DHPR-phosphorylation possible in vitro par une kinase AMPc dépendante	45 kDa / face jonctionnelle de la citerne terminale du RS	interaction indirecte avec RyR1 via la CSQ	- L'absence de JP45 entraîne une diminution du relâchement de Ca <sup>2+</sup> pendant le CEC et une diminution de l'expression membranaire de la sous-unité α1S	(Anderson et al., 2006; Divet et al., 2005; Treves et al., 2009; Zorzato et al., 2000)
SRP 27	- 3 segments transmembranaires - forme un canal ionique perméable au K <sup>+</sup> - forme des dimères et des trimères -Famille multigénique avec variants d'épissage - cytoplasmique ou membranaire	27 kDa / membrane du RS Cerveau, muscle squelettique et cardiaque, poumon	?	- crée un courant potassique qui contre balance le mouvement de charges associé au courant généré par le relâchement de Ca <sup>2+</sup> via RyR1 et empêche une polarisation de la membrane du RS lors du CEC	(Bleuven et al., 2008; Pouliquin & Dulhunty, 2009; Treves et al., 2009)
<b>Cav-3</b>	Voir paragraphe 1.3.1.2 de ce manuscrit				

**Tableau V: Protéines interagissant avec le RyR**

Les protéines surlignées en jaunes interagissent ou peuvent interagir à la fois avec RyR1 et le DHPR

### **2.1.2.6.2 Régulation par des ligands non protéiques ( $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, $\text{Mg}^{2+}$ )**

Bien que les RyRs soient régulés par une large gamme de molécules, les ligands de nature non protéiques que sont l'ATP, le  $\text{Mg}^{2+}$  et le  $\text{Ca}^{2+}$  sont reconnus comme étant des régulateurs clés du RyR (Meissner, 1994). Ils régulent différemment les RyRs cardiaques (RyR2) et squelettiques (RyR1). Cette différence expliquerait en partie les différences de mécanisme de couplage excitation-contraction entre muscles cardiaque et squelettique (Laver, Lenz & Lamb, 2001).

La sensibilité du RyR à la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  varie d'un isoforme à un autre, mais suit dans tous les cas une courbe de Gauss. En absence de  $\text{Mg}^{2+}$  et d'ATP, l'activité canal est activée par des concentrations de l'ordre du micromolaire (1 à 10  $\mu\text{M}$ ) et inhibée par l'exposition de sa face cytoplasmique à des concentrations millimolaires (1 à 10  $\text{mM}$ ) (Meissner, 1994). Cette régulation met donc en jeu plusieurs sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la face cytoplasmique du RyR. L'activation se fait via un site de forte affinité (site A, pour activation), tandis que l'inhibition se fait via un site de faible affinité (site I, pour inhibition) qui est non sélectif pour les différents cations divalents (Laver, 2005). La concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  varie dans la cellule musculaire de 100-150  $\text{nM}$  pour la fibre musculaire au repos à environ 20  $\mu\text{M}$  lors de la contraction.

Une régulation de l'activité du RyR par le  $\text{Ca}^{2+}$  présent dans la lumière du RS a également été démontrée (Tripathy & Meissner, 1996). Cette régulation met en jeu les protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$  et associées au canal comme la CSQ ou la junctine, mais également, des sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  qui sont localisés au sein du domaine cytoplasmique du RyR. Ces sites sont accessibles via la lumière du RS (Fill & Copello, 2002).

L'ATP libre cytosolique peut directement activer le RyR. Comme pour le  $\text{Ca}^{2+}$  l'effet de l'ATP varie d'un isoforme à un autre, RyR1 présentant une sensibilité plus forte à l'ATP que RyR2. Dans le cytosol d'une fibre musculaire, la concentration en ATP est d'environ 8  $\text{mM}$ . La majorité de cet ATP est sous une forme complexée au  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{ATM-Mg}^{2+}$ , qui n'a pas d'effet sur le RyR. Le rapport des concentrations respectives d'ATP et de  $\text{Mg}^{2+}$  représente donc un élément important de l'activité du RyR. Lorsque la concentration d'ATP totale augmente, la concentration d'ATP libre augmente favorisant ainsi l'activation du RyR. L'élévation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique provoquée par l'ATP peut à son tour renforcer l'activation du RyR par le mécanisme de « relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par le  $\text{Ca}^{2+}$  » («  $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release » ou CICR) (Laver, 2005).

Le  $Mg^{2+}$  cytoplasmique est lui-même un antagoniste puissant du RyR. Parmi les différents isoformes, RyR1 est le plus sensible à l'action du  $Mg^{2+}$  (Laver, 2005) et (Fill, 2002)). Dans la fibre musculaire au repos, l'effet inhibiteur du  $Mg^{2+}$  participe de façon importante à l'inactivation des RyRs. L'essentiel du  $Mg^{2+}$  cytoplasmique est présent sous forme complexée à l'ATP, et la concentration en  $Mg^{2+}$  libre dans la cellule au repos est donc de l'ordre du 1 mM. Les expériences menées par Lamb et Stephenson sur fibres musculaires pelées de rat ont montré qu'une réduction d'un facteur cinq de la concentration cytoplasmique de  $Mg^{2+}$  libre (0.2 mM) suffit à déclencher un relâchement de  $Ca^{2+}$  hors du RS (Lamb & Stephenson, 1994). L'hypothèse actuellement retenue pour expliquer l'inhibition du RyR1 par le  $Mg^{2+}$  fait intervenir deux mécanismes (Laver, Baynes & Dulhunty, 1997) : a) le  $Mg^{2+}$  peut inhiber l'activation du RyR par le  $Ca^{2+}$  par compétition pour la fixation sur les sites d'activation (sites A) lorsque le muscle est au repos et que la concentration cytoplasmique en  $Ca^{2+}$  est faible (moins de  $1\mu M$ ) ; b) le  $Mg^{2+}$  peut inhiber le RyR en se fixant sur les sites de faibles affinités qui contrôlent l'inhibition par le  $Ca^{2+}$  (sites I). Le  $Mg^{2+}$  régulerait donc RyR1 en se fixant sur les mêmes sites que le  $Ca^{2+}$ .

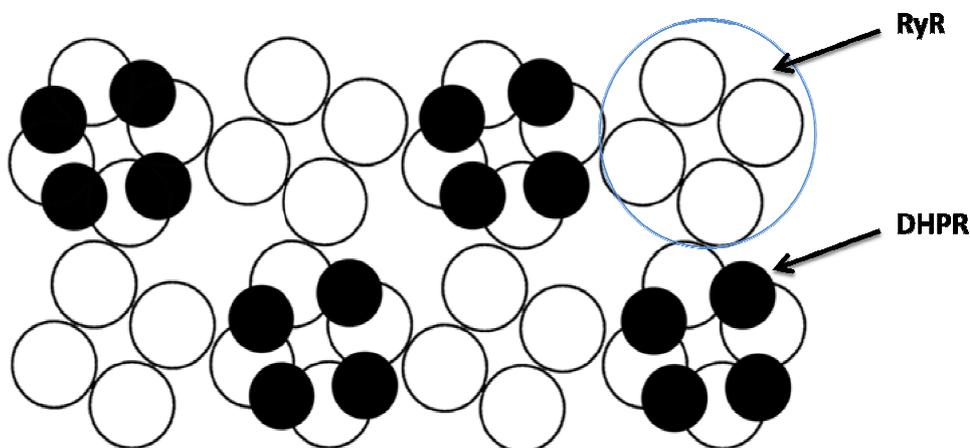
La régulation des RyRs par l'ATP, le  $Mg^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$  met donc en jeu plusieurs mécanismes interconnectés qui dépendent des variations de concentration respectives de ces différents ligands. Les mécanismes de variation de la concentration de chacun de ces ligands intervenant notamment lors de la contraction musculaire ne sont pas complètement connus à ce jour.

### **2.1.3 Organisation spatiale du DHPR et du RyR au sein de la triade**

#### **2.1.3.1 Dans le muscle squelettique**

Depuis les années 80, l'équipe dirigée par Clara Franzini-Armstrong a joué un rôle prépondérant dans la description de l'organisation spatiale et de l'ultrastructure des protéines impliquées dans le CEC en étudiant par cryomicroscopie électronique l'organisation de ces dernières dans la triade (Serysheva, 2004). Le couplage conformationnel s'appuie sur une organisation très particulière des deux canaux dans leur membrane respective au sein de la triade. Les interactions protéiques qui ont lieu lors du CEC nécessitent un arrangement géométrique strict entre ces deux protéines. Les premières images obtenues par microscopie électronique montrent que les DHPRs s'organisent par groupes de quatre régulièrement espacés le long de la membrane des tubules T pour former des structures appelées tétrades (Block et al., 1988; Takekura et al., 1994) (figure 21). Cette organisation des DHPRs en tétrades régulièrement alignées semble nécessaire au CEC comme le montrent les

récentes études réalisées sur le modèle poisson zèbre déficient en  $\beta 1a$  (Schredelseker et al., 2005) (voir chapitre 3). En effet dans ce modèle animal le seul défaut structural associé à la perte du CEC semble être la perte de l'organisation du DHPRs en tétrades. Les images de la membrane des tubules T et de la membrane du RS lui faisant face, obtenues par cryomicroscopie électronique, montrent une correspondance entre l'organisation du DHPR en tétrade et l'organisation du RyR1, chaque tétrade correspondant à la position d'un RyR1 (Block et al., 1988; Kim et al., 2003). Ces images montrent également que seul un RyR sur deux est en correspondance avec une tétrade, la moitié des RyRs seulement pouvant être directement activée par les DHPRs (figure 21). Une hypothèse toujours en débat à l'heure actuelle voudrait que les RyR non connectés au DHPR soient activés par le mécanisme de «  $Ca^{2+}$  induced  $Ca^{2+}$  release » grâce au  $Ca^{2+}$  relâchés par les RyR couplés, contribuant ainsi au relâchement total de  $Ca^{2+}$  (Endo, 2009). Les raisons de cette association en alternance des RyRs ne sont pas clairement établies. Néanmoins, il a été suggéré que la différence de taille entre tétrades et RyR, pouvait en partie expliquer cette organisation (Franzini-Armstrong & Kish, 1995). Cette hypothèse est soutenue par les surfaces cytoplasmiques respectives du DHPR et du RyR déduits des modèles de structure tridimensionnelle de ces deux protéines.



**Figure 21: Représentation schématique de l'organisation des RyRs et des DHPRs au niveau des triades dans la fibre musculaire squelettique**

Adapté de (Franzini-Armstrong, 2004)

Sur la face jonctionnelle de la membrane du RS, les RyRs (cercles blancs, chaque cercle représente une sous-unité du RyR1, quatre cercles représentant une unité canal RyR) forment des alignements réguliers. Les RyRs interagissent entre eux via leurs domaines cytoplasmiques. Les DHPRs (cercle noir, chaque cercle représente un DHPR) sont organisés en tétrades, chaque tétrade se trouve en correspondance avec une unité canal RyR1. Seul un RyR sur deux se trouve juxtaposé à une tétrade de DHPRs.

Malgré l'importance structurale et fonctionnelle de cette organisation, ni le DHPR ni le RyRs ne sont impliqués dans la formation de la jonction triadique en elle-même ni dans leur adressage respectif dans les structures membranaires qui la composent (Flucher & Franzini-Armstrong, 1996). De plus, l'observation de diaphragmes d'embryons de souris dysgéniques montre la présence de triades et de cluster de RyRs organisés en lignes (Franzini-Armstrong, Pincon-Raymond & Rieger, 1991). De même, l'observation de fibres musculaires issues d'embryons de souris dyspédiques a permis de conclure à la non-implication du RyR dans la formation des triades (Takekura et al., 1995). Cependant, les travaux menés par Franzini-Armstrong et ses collaborateurs ont amené plusieurs précisions. Alors que les RyR1s n'ont pas besoin des DHPRs pour s'organiser en réseaux ordonnés, les DHPRs dépendent des RyR1s pour leur organisation en tétrades au sein des triades (Takekura et al., 1995). En effet, sur des myotubes dérivés de cellules de la lignée 1B5 on n'observe pas la formation de tétrades ordonnées de DHPRs. Seule l'organisation de clusters de DHPRs similaires à ceux observés dans le muscle cardiaque est visible. La lignée cellulaire 1B5 est une lignée murine myoblastique n'exprimant aucun des isoformes du RyR. Cette lignée est souvent utilisée comme système d'expression homologue dans l'étude des RyRs (Moore et al., 1998). L'expression du RyR1 dans ces myotubes 1B5 entraîne une restauration de l'organisation des DHPRs en tétrades et leur alignement orthogonal représentatif d'un lien avec les RyRs (Protasi, Franzini-Armstrong & Allen, 1998; Protasi et al., 2000)

Parallèlement à ces études morphologiques, des expériences de co-immunoprécipitation et de co-purification à partir de préparation membranaire de triade ont montré l'existence d'un complexe macromoléculaire réunissant DHPR et RyR1 (Marty et al., 1994). Plus tard, des travaux associant la cryofracture et la pharmacologie du RyR ont confirmé ces données biochimiques en démontrant l'existence d'un lien étroit entre l'orientation spatiale de DHPRs et l'état conformationnel du RyR1 (Paolini et al., 2004a). Cette étude démontre clairement que la distance moyenne entre les centres de chaque DHPRs adjacent dans une tétrade, 19.5 nm, est réduite à 2 nm lors de l'ajout de ryanodine à une concentration de 500  $\mu$ M induisant la stabilisation du RyR1 dans un état fermé. Ainsi, l'état fonctionnel du RyR1 influe sur l'orientation spatiale des DHPRs dans une tétrade. Ce phénomène ne peut être que le résultat d'un couplage physique direct entre le RyR1 et le DHPR.

### **2.1.3.2 Dans le muscle cardiaque**

Le strict alignement des DHPRs et des RyRs observé dans le muscle squelettique n'existe pas dans le muscle cardiaque bien que l'organisation du RyR2 dans la membrane du RS soit

similaire à celle du RyR1 (Jorgensen et al., 1993). Les DHPRs cardiaques ne sont pas organisés en tétrades, et ne montrent pas d'association spécifique avec les RyRs malgré leur localisation très proche dans des domaines jonctionnels (Sun et al., 1995). Ces données sont confirmées par des mesures de stœchiométrie RyR/DHPR dans la cellule musculaire cardiaque indiquant la présence d'un grand excès du RyR2 par rapport aux DHPRs (environ 4 à 10 fois plus de RyRs que de DHPRs suivant les espèces ; (Bers & Stiffel, 1993).

## 2.2 Mécanismes du couplage excitation-contraction (CEC)

Le terme « couplage excitation-contraction » est aujourd'hui utilisé principalement pour décrire le mécanisme par lequel l'information électrique perçue par le DHPR est transmise au RyR. Ce processus aboutit à la libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$ , hors du RS et est donc responsable du déclenchement de la contraction. Le contrôle de l'activité du RyR par le DHPR a été appelé « couplage orthograde » et son importance dans la physiologie du muscle est clairement établie. Plus récemment, l'absence totale de courant calcique porté par le DHPR dans des cellules musculaires squelettiques n'exprimant pas RyR1, a mis en évidence l'existence d'un mécanisme de contrôle de l'activité du DHPR par le RyR. Ce phénomène fut nommé « couplage rétrograde ». Le rôle de ce processus, comme celui du courant calcique porté par le DHPR, dans le CEC est beaucoup moins clair et ses bases moléculaires encore mal connues.

### **2.2.1 Le couplage orthograde DHPR/RyR**

#### **2.2.1.1 Identification du DHPR comme détecteur du voltage : un mouvement de charges intramembranaire déclencheur du relâchement de $\text{Ca}^{2+}$ hors de la RS**

Dans les années 70, la triade et les « pieds jonctionnels » sont déjà considérés comme des sites essentiels aux processus initiant la contraction musculaire suite à un PA. La nature de la transmission de l'information « à travers » la jonction triadique a donné lieu à différentes hypothèses. L'existence d'un courant calcique activé par la dépolarisation fait notamment penser que le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la cellule pourrait être le facteur déclenchant de la contraction ou le facteur déclenchant du relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS. Cependant, le décalage cinétique entre l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que l'observation d'une persistance de contraction en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire fit abandonner cette hypothèse. Au début des années 80, un modèle de transmission mécanique fut proposé, mettant en jeu un détecteur du voltage localisé dans la membrane des tubules T et connecté via un « levier moléculaire » à la protéine de la membrane du

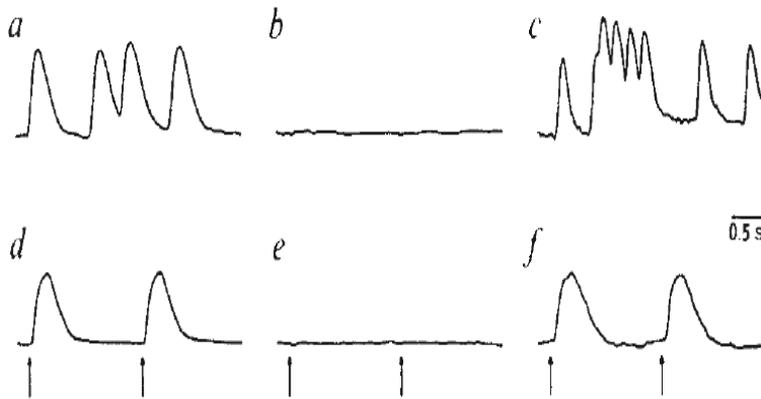
RS responsable du relâchement du  $\text{Ca}^{2+}$ . En 1973, Schneider et Chandler montrent l'existence d'un mouvement de charges intramembranaire induit par la dépolarisation de la membrane plasmique et qui précède la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmique. Ce mouvement de charges est aboli par un traitement au glycérol qui entraîne une dissociation du tubule T de la membrane plasmique (Schneider & Chandler, 1973). Ce phénomène est alors vu comme le reflet de la réponse membranaire à la dépolarisation qui initie le CEC.

Au même moment, on découvre la sensibilité du CEC aux dihydropyridines et certains de ses dérivés qui sont aussi des antagonistes ou des agonistes du DHPR (Dulhunty & Gage, 1988; Eisenberg, McCarthy & Milton, 1983). Ainsi, les travaux de Rios et Brum (1987) montrent que de faibles concentrations de dihydropyridines inhibent à la fois les mouvements de charges et le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS (Rios & Brum, 1987). Enfin, l'identification des souris dysgéniques en 1986 (Beam et al., 1986), ainsi que les travaux d'expression d'ADNc codant le DHPR dans des myotubes dysgéniques permirent d'établir de façon définitive que les DHPRs présents dans la membrane des tubules T jouent le rôle de « détecteur de potentiel » et génèrent le mouvement de charges véritable déclencheur du relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  et donc du CEC (Adams et al., 1990; Tanabe et al., 1988).

### **2.2.1.2 Interactions DHPR/RyR : la sous-unité $\alpha 1S$ du DHPR au centre du CEC**

Vers la fin des années 80, l'équipe de Shosaku Numa s'associe avec celle de Kurt Beam venant d'identifier les souris dysgéniques. Ensemble, ils vont considérablement faire avancer la compréhension des mécanismes moléculaires du CEC, notamment en montrant le rôle primordial joué par la sous-unité  $\alpha 1$  du DHPR. En injectant de l'ADNc codant la sous-unité  $\alpha 1$  dans des myotubes de souris dysgéniques, ils restaurent à la fois les mouvements de charges et le CEC (Adams et al., 1990; Tanabe et al., 1988) (figure 22). Ils notent cependant qu'un CEC de type squelettique, c'est-à-dire indépendant de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire, ne peut être rétabli que par l'expression de l'isoforme squelettique de la sous-unité  $\alpha 1$  ( $\alpha 1S$ ) et non par l'expression de l'isoforme cardiaque ( $\alpha 1C$ ) (Tanabe et al., 1990b). L'expression de l'isoforme cardiaque de la sous-unité  $\alpha 1$  entraîne la mise en place d'un CEC de type cardiaque c'est-à-dire strictement dépendant de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. L'expression dans des myotubes d'embryons dysgéniques de sous-unités  $\alpha 1$  chimériques, correspondant à une sous-unité  $\alpha 1S$  dans laquelle différents domaines sont remplacés par le domaine correspondant de la sous-unité  $\alpha 1C$  (ou vice versa), a permis l'identification de la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha 1S$  comme un domaine essentiel au CEC (Tanabe et al., 1990a). Ces résultats sont les premiers à suggérer que la

boucle II-III puisse transmettre le changement conformationnel du DHPR au RyR et être responsable du couplage mécanique permettant le CEC.



**Figure 22: Comparaison de l'activité contractile dans des cultures primaires de myotubes**

Tirée de (Tanabe et al., 1988)  
(a,b,c) activité contractile spontanée.  
(d,e,f) activité contractile en réponse à un stimulus électrique. Les flèches indiquent le moment de la stimulation électrique.

Les mesures ont été effectuées sur des myotubes normaux (a,d), des myotubes dysgéniques (b,e) et des myotubes dysgéniques transfectés avec l'ADNc codant la sous-unité  $\alpha 1S$  (c, f).

### **2.2.1.3 Identification du RyR comme canal calcique responsable du relâchement du calcium hors du RS**

Dans les années 60, l'implication dans le processus de la contraction d'une protéine sensible à la ryanodine encore non identifiée est suggérée grâce à des études montrant que la ryanodine pouvait provoquer la contraction des muscles et la paralysie (Jenden & Fairhurst, 1969). Plus tard, il a été montré que la ryanodine se fixe avec une forte affinité sur une protéine présente sur la face jonctionnelle du RS et responsable du relâchement de  $Ca^{2+}$  hors du RS (Pessah et al., 1986; Pessah, Waterhouse & Casida, 1985). Il fut alors montré que la ryanodine bloquait son récepteur dans une conformation ouverte expliquant ainsi son effet sur la contraction musculaire (Fleischer et al., 1985).

Parallèlement, dans les années 1980 la fonction de canal calcium de ce récepteur a été mise en évidence et caractérisée. La purification du RyR et son incorporation dans des bicouches lipidiques artificielles ont permis sa caractérisation électrophysiologique et son identification comme le canal responsable du relâchement de  $Ca^{2+}$  du RS (Campbell et al., 1987; Campbell & MacLennan, 1981; Smith, Coronado & Meissner, 1986; Smith et al., 1988).

Dans le but d'étudier les changements conformationnels de la région cytoplasmique du RyR1, Kang et al. (1992) développent une technique de marquage spécifique par une sonde fluorescente. L'activation du RyR par le  $Ca^{2+}$  ou la liaison de ryanodine entraîne respectivement une augmentation et une diminution de l'intensité de fluorescence de la sonde. Ce type de marquage fut alors utilisé sur des préparations de triades et l'intensité de fluorescence de la sonde mesurée pendant la dépolarisation des tubules T. Ces travaux mettent en évidence un changement de

conformation du RyR1 induit par la dépolarisation et précédent le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS (Yano, el-Hayek & Ikemoto, 1995)

Enfin, de la même façon que la restauration d'un CEC de type squelettique nécessite la présence de l'isoforme squelettique de la sous-unité  $\alpha 1$ , l'expression des différentes isoformes de RyRs dans des embryons de souris dyspédiques a permis de montrer que seul l'isoforme squelettique de RyR permet le rétablissement d'un CEC de type squelettique (Takeshima et al., 1994).

### **2.2.2 Existence d'un couplage rétrograde**

Une autre étape importante dans l'étude du couplage DHPR/RyR fut la mise en évidence d'un contrôle de l'activité du DHPR par RyR1 dans la cellule musculaire squelettique. Ce mécanisme fut appelé « couplage rétrograde ». Le couplage fonctionnel entre le DHPR et RyR1 est donc bidirectionnel, le DHPR contrôle l'activité du RyR1 et RyR1 contrôle l'activité du DHPR. Ce couplage « rétrograde » se traduit par une disparition quasi totale (un facteur 30) du courant  $\text{Ca}^{2+}$  porté par le DHPR dans des myotubes n'exprimant pas RyR1. Ce couplage ne semble concerner que la fonction canal calcique du DHPR puisque l'amplitude des mouvements de charges dans ces myotubes restent proches de la normale. Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression dans des myotubes dyspédiques d'ADNc codant RyR1 restaure le CEC, mais également une densité de courants de type L (porté par le DHPR) proches de la normale (Nakai et al., 1996). Ce couplage « rétrograde » est spécifique de la cellule musculaire squelettique et l'expression d'ADNc codant RyR2 dans des myotubes dyspédiques n'a pas d'effet sur la densité du courant de type L. Une étude plus récente et plus complète de l'influence du contrôle de l'activité du DHPR par RyR1 montre que RyR1 affecte les principales propriétés biophysiques du DHPR, cinétiques d'activation, modulation par les agonistes des dihydropyridines et conductance aux ions divalents (Avila & Dirksen, 2000). De même, il a été montré que l'exposition de myotubes de souris sauvages (non génétiquement modifiées) à des concentrations de ryanodine permettant de bloquer RyR1 dans un état inactivé provoque une augmentation de l'amplitude des courants de type L (Bannister & Beam, 2009b). Cet effet n'est plus observé sur des myotubes d'embryons dyspédiques (Bannister & Beam, 2009b). Une étude en microscopie électronique de l'organisation en tétrade du DHPR dans la membrane du tubule a également montré une modification des dimensions de la tétrade après traitement des myotubes en présence de concentrations élevées de ryanodine, indiquant que les changements de conformation du RyR1 induit par la ryanodine entraîne un changement de conformation du

DHPR (Paolini, Protasi & Franzini-Armstrong, 2004b). L'ensemble de ces résultats confirme donc que par ce couplage rétrograde, l'état fonctionnel du RyR1 contrôle les changements conformationnels du DHPR, à la base de l'activation des courants L. De ce fait, les régulateurs physiologiques du RyR1 (protéines partenaires,  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, potentiel rédox) pourraient également moduler les propriétés des courants L.

Le mécanisme précis de ce couplage rétrograde n'est pas clairement établi aujourd'hui. Cependant, il semble impliquer une région de la sous-unité  $\alpha 1S$ , la boucle II-III, déjà impliquée dans le signal responsable du couplage orthograde. En effet, l'expression dans des myotubes dysgéniques d'une sous-unité  $\alpha 1S$  chimérique dans laquelle la séquence correspondant à la boucle II-III a été remplacée par celle correspondant à la boucle II-III cardiaque ne permet de rétablir ni le CEC ni le courant calcique de type L alors que l'expression de la sous-unité  $\alpha 1S$  entraîne le rétablissement du CEC et du courant de type L (Grabner et al., 1999). Ce domaine de la sous-unité  $\alpha 1$  pourrait donc être impliqué à la fois dans le couplage orthograde et dans le couplage rétrograde. Il est cependant intéressant de noter que bien que le rôle du courant calcique de type L dans la physiologie de la cellule musculaire soit encore très mal compris, couplage orthograde et couplage rétrograde semblent intimement liés, la modification de l'un s'accompagnant automatiquement de la modification de l'autre. L'imbrication de ces deux mécanismes rend difficile l'identification des déterminants moléculaires spécifiques de l'un ou de l'autre.

### **2.2.3 Le CEC dans la cellule musculaire cardiaque**

Bien que les composants moléculaires du complexe de mobilisation calcique soient globalement les mêmes dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique le processus de couplage entre DHPR et RyR2, en place dans le muscle cardiaque, est fondamentalement différent de celui en place dans le muscle squelettique. Cette différence repose sur les différences de propriétés des isoformes cardiaques des protéines impliquées dans le CEC et en particulier du RyR et du DHPR. Dans le muscle cardiaque, c'est le calcium entrant *via* le DHPR, suite à la dépolarisation, qui déclenche lui-même l'ouverture du RyR2 et la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS. Ce mécanisme, strictement dépendant du calcium extracellulaire, est appelé « relâchement de Calcium induit par le calcium », ou CICR (*Calcium-Induced Calcium Release*) et fut décrit par Fabiato en 1983 (Fabiato, 1983; Nabauer et al., 1989; Niggli & Lederer, 1990). L'influx calcique provoqué par le DHPR est donc la voie principale déclenchant la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS dans les cardiomyocytes (Nabauer et al., 1989; Niggli & Lederer, 1990). Il est donc possible de différencier le CEC de type squelettique du CEC de type cardiaque en étudiant la dépendance du CEC vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Dans

ce modèle de CEC cardiaque, le mouvement de charge au sein du DHPR, et le changement de conformation du DHPR qu'il traduit, ne semble pas jouer de rôle direct dans la transmission de l'information au RyR. Contrairement au CEC squelettique, le CEC de type cardiaque ne nécessite donc pas d'interaction « physique » du DHPR avec le RyR. Cette absence de contact physique entre ces deux protéines semble correspondre à une organisation spatiale du RyR et du DHPR dans leur membrane respective différente de celle observée dans le muscle squelettique (voir paragraphe 2.2.2)

### **Conclusion :**

Le CEC de type squelettique peut donc être divisé en 2 étapes clef : (1) un mouvement de charges, provoqués par la dépolarisation, impliquant vraisemblablement les segments S4 de la sous-unité  $\alpha 1$  du DHPR et traduisant un changement de conformation de la protéine (2) la transmission de ce signal au RyRs situé sur la membrane du RS provoquant son ouverture et le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol de la cellule musculaire. Un événement additionnel, dont le rôle physiologique est encore mal connu, est représenté par l'ouverture du canal calcique DHPR et d'apparition du courant de type L.

## CHAPITRE 3

# LES DOMAINES DU RYR ET DU DHPR IMPLIQUES DANS LE COUPLAGE-EXCITATION CONTRACTION DE TYPE SQUELETTIQUE

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, un outil important pour l'étude des interactions DHPR / RyR a été l'expression du DHPR et du RyR, présentant des domaines modifiés, dans des myotubes dysgéniques ou dyspédiques. Plusieurs domaines du DHPR et du RyR ont ainsi été identifiés comme étant des éléments importants directement impliqués dans le couplage fonctionnel RyR/DHPR. Encore peu de données ont cependant été obtenues quant aux séquences précises de chacune de ces deux protéines impliquées dans les interactions protéine-protéine qui sont à la base du CEC. Ceci est en partie dû au faible nombre de molécules dont on peut suivre la liaison sur le RyR soit en raison de leur faible affinité pour le RyR soit du fait de l'absence de technique permettant la mesure de leur liaison sur le RyR. La faible résolution des modèles tridimensionnels obtenus à ce jour ne permet pas l'identification d'acides aminés potentiellement impliqués dans de telles interactions.

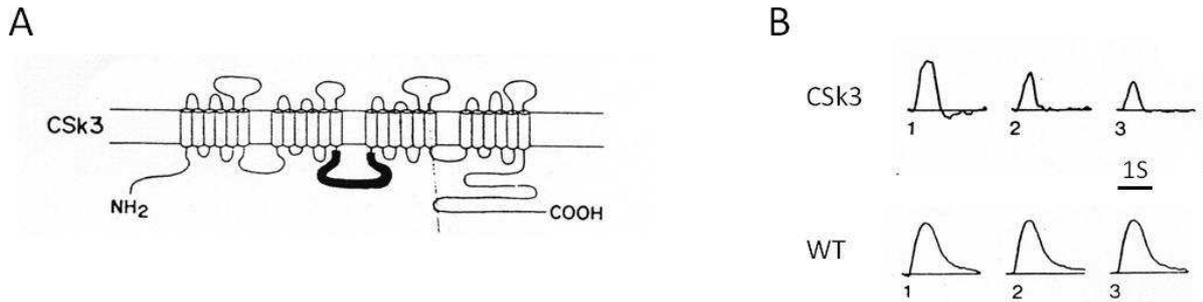
L'absence de modification importante du CEC dans les myotubes de souris, dont le gène codant la sous-unité  $\alpha 2\delta$ -1 ou  $\gamma$  du DHPR est invalidé, a fait que les recherches de domaines responsables du CEC ont plus particulièrement porté sur les sous-unités  $\alpha 1S$  et  $\beta 1a$ . Côté RyR1, la taille de cette protéine représente un obstacle à l'identification précise de domaines fonctionnels ainsi que des séquences impliquées dans une interaction directe ou indirecte avec le DHPR. L'existence de mutations du RyR1 associées à certaines pathologies musculaires a représenté une source d'information importante dans la définition de domaine potentiellement important pour le CEC.

### **3.1 La sous-unité $\alpha 1$ du DHP**

Depuis les travaux des équipes de Beam et Numa, (Tanabe et al., 1988; Tanabe et al., 1990b) la boucle cytoplasmique II-III de la sous-unité  $\alpha 1S$  est au centre du mécanisme de la transmission orthograde et rétrograde de l'information entre le DHP et le RyR. Une grande partie des travaux menés depuis a eu pour but d'identifier les domaines et/ou acides aminés de cette boucle directement impliqués dans le CEC. D'autres régions de la sous-unité  $\alpha 1$  (boucle I-II, boucle III-IV, région C-terminale) ont cependant été impliquées dans la régulation du CEC et ont notamment été identifiées comme interagissant avec RyR1. Ainsi, plusieurs domaines de la sous-unité  $\alpha 1$  apparaissent intervenir dans le mécanisme du CEC ce qui amène aujourd'hui à un modèle du CEC basé sur des interactions multipoints entre DHP et RyR1.

#### **3.1.1 La boucle II-III**

Les premiers travaux sur la sous-unité  $\alpha 1S$  ont consisté à étudier les propriétés fonctionnelles de diverses constructions chimériques associant des domaines cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  aux autres domaines de la sous-unité  $\alpha 1$  cardiaque ( $\alpha 1C$ ). Ces sous-unités chimériques sont alors exprimées dans des myotubes de souris dysgéniques. Cette approche a donc permis de montrer comme évoqué précédemment, que seule la construction contenant une boucle II-III de type squelettique (CSk 3, figure 23) permet la restauration d'un CEC de type squelettique comparable à celui obtenu avec l'expression de la sous-unité  $\alpha 1S$  non modifiée (Tanabe et al., 1990a). À l'inverse, le remplacement au sein de la sous-unité  $\alpha 1S$  de la boucle II-III par son équivalent issu de la sous-unité  $\alpha 1C$  (chimères  $\alpha 1S/C$ ) (Grabner et al., 1999) ou  $\alpha 1M$  (chimères  $\alpha 1S/M$ ) (Wilkens et al., 2001) provoque la disparition du couplage bidirectionnel. L'isoforme  $\alpha 1M$  est le produit de l'expression du gène homologue de la drosophile et présente une faible homologie de séquence avec  $\alpha 1S$ . Il a aussi été montré qu'un peptide correspondant à cette boucle se liait et activait RyR1 incorporé dans une bicouche lipidique et augmentait la liaison de ryanodine- $^3H$  tritiée sur des vésicules de RS isolées (Lu, Xu & Meissner, 1994).



**Figure 23: Contractions induites par dépolarisation de myotubes dysgéniques exprimant des constructions chimériques de la sous-unité  $\alpha 1S$ .**

D'après (Tanabe et al., 1990a)

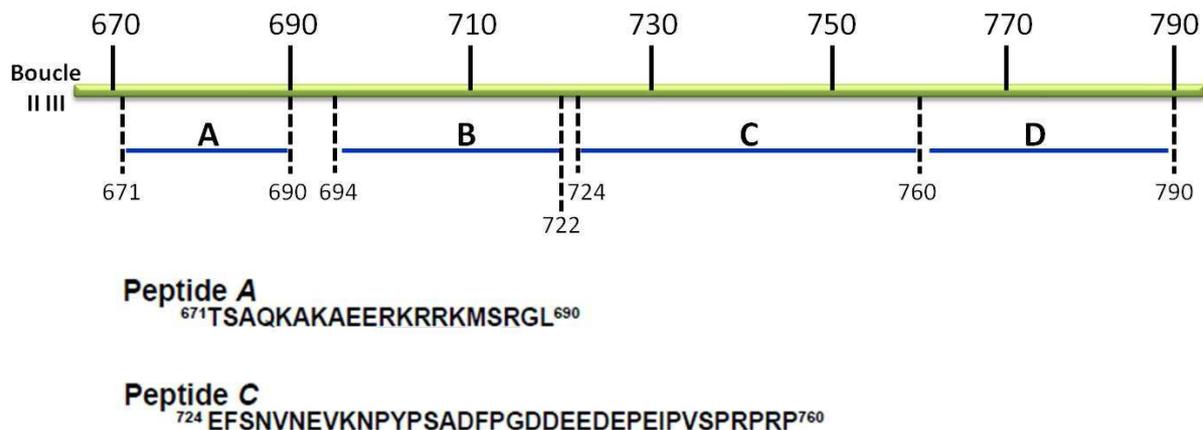
(A). Représentation schématique de la structure de la construction chimérique d'  $\alpha 1S/ \alpha 1C$  où seule la boucle II-III est d'origine squelettique, le reste de la sous-unité  $\alpha 1$  étant d'origine cardiaque.

(B). Comparaison des contractions induites par la stimulation électrique des myotubes exprimant la sous-unité  $\alpha 1S$  non modifiée (WT) ou la sous-unité  $\alpha 1$  chimérique CSk3. Les mesures sont réalisées en présence de calcium extracellulaire (1), en absence de calcium extracellulaire (2) ou en présence de 0,5 mM cadmium ( $Cd^{2+}$ , 0,5 mM) (3). Le cadmium est utilisé pour bloquer le courant calcique de type L via la sous-unité  $\alpha 1$  du DHPR. La stimulation dure 5 ms.

Par la suite, les recherches se sont largement concentrées sur l'identification des régions de la boucle II-III intervenants dans le couplage DHPR/RyR. En 1995, El-Hayek et ses collaborateurs ont divisé la boucle II-III en 4 domaines (A, B, C et D ; figure 24) et synthétisé des peptides correspondants à chacun de ces domaines. Des mesures de relâchement de  $Ca^{2+}$  et de liaison de ryanodine sur des vésicules de HSR ainsi que l'étude des propriétés canal du RyR1 reconstitué en bicouches lipidiques, ont permis d'identifier deux domaines importants de cette boucle : le domaine A (Thr<sup>671</sup>-Leu<sup>690</sup>) et le domaine C (Glu<sup>724</sup>-Pro<sup>760</sup>). Ces domaines exercent des effets opposés sur RyR1. Le peptide A a un effet activateur sur RyR1, il présente une forte affinité pour RyR1. Le peptide A augmente la fixation de ryanodine-<sup>3</sup>H sur RyR1 et active la libération de calcium hors de vésicules de RS. Le peptide C bien que beaucoup moins actif que le peptide A semble inhiber l'effet du peptide A et agir comme un antagoniste de l'activation du RyR (Dulhunty et al., 1999; el-Hayek et al., 1995; Ikemoto & el-Hayek, 1998; Lu, Xu & Meissner, 1995; O'Reilly et al., 2002). Le domaine A comprend un groupe de 5 acides aminés chargés positivement (Arg<sup>681</sup>-Lys<sup>685</sup>) qui semble être responsable de l'effet activateur du RyR (El-Hayek & Ikemoto, 1998).

Parallèlement, Leong et MacLennan (1998) identifient un site de fixation de la boucle II-III sur RYR1 sur les acides aminés 1076-1112. Un fragment du RyR1 correspondant à ce domaine et traduit in vitro est spécifiquement retenu par une colonne d'affinité sur laquelle est immobilisée la boucle II-III. Cette interaction est dépendante de la présence de deux acides aminés chargés positivement les Lysines 677 et 682, situées dans le domaine A de la boucle II-III (Leong & MacLennan, 1998a).

Ces études, essentiellement biochimiques, suggèrent que le domaine A de la boucle II-III pourrait représenter l'élément déclencheur du CEC dans le muscle squelettique. Certains auteurs allant même jusqu'à proposer un modèle d'activation /répression du CEC basé sur les effets activateurs et inhibiteurs des peptides A et C (Saiki, El-Hayek & Ikemoto, 1999).

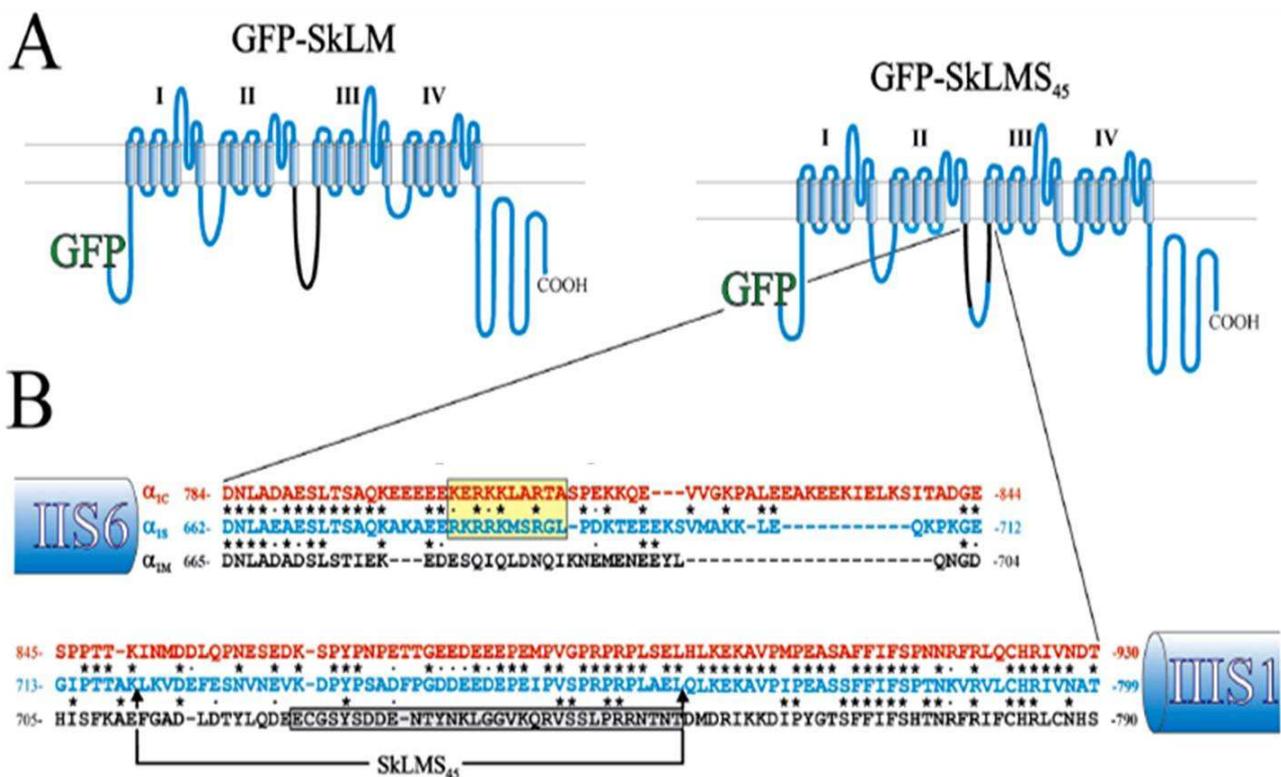


**Figure 24: Localisation des domaines définis par El-Hayek (1995) sur la boucle II-III.**

D'après (el-Hayek et al., 1995)

Cependant, cette hypothèse est fortement remise en cause par les résultats obtenus par expression dans les myotubes dysgéniques de sous-unités  $\alpha 1S$  comportant une boucle II-III modifiée. Cette approche a en effet montré qu'il était possible de a) déléter entièrement la séquence correspondant au domaine A (Ahern et al., 2001a; Ahern et al., 2001b), b) modifier profondément sa séquence (Proenza, Wilkens & Beam, 2000b), c) le remplacer par une protéine d'environ 60KDa (streptavidine ou tandem de protéines fluorescentes) (Bannister et al., 2009a; Lorenzon et al., 2004) ou d) le remplacer par la séquence correspondante de l'isoforme  $\alpha 1M$ , sans modifier profondément le processus du CEC. Cette approche a en revanche permis d'identifier une région, correspondant aux acides aminés 720-764 de la boucle II-III (Nakai et al., 1998b) et recouvrant le domaine C identifié par El-Hayek (1995), nécessaire au couplage bidirectionnel DHPR/RyR. Depuis, cette séquence a été également impliquée dans le processus du couplage rétrograde (Grabner et al., 1999). En effet, les couplages orthograde et rétrograde sont tous deux restaurés lorsque cette séquence est soit introduite dans une boucle II-III d'origine cardiaque au sein de la sous-unité  $\alpha 1S$  (construction SkLC<sub>46</sub>, figure 27) soit délétée entièrement (Ahern et al., 2001b) soit issue de la sous-unité  $\alpha 1M$  (construction SkLM<sub>45</sub>, (Wilkens et al., 2001)) (figure 25). Ces données ont conduit à la notion de « domaine critique » pour désigner cette séquence de la boucle II-III. À l'intérieur de ce domaine critique, deux sous-domaines ont été identifiés: (1) les acides aminés 734-744 correspondant à

l'épitope de l'anticorps monoclonal anti  $\alpha 1S$  (mAb 1A); cet anticorps fut utilisé pour corrélérer d'éventuels changements structuraux de cette région avec le CEC (Kugler et al., 2004a) et (2) un groupe d'acides aminés chargés négativement (résidus 744-751) (Kugler et al., 2004b). Le remplacement des acides aminés Ala<sup>739</sup>, Phe<sup>741</sup>, Pro<sup>742</sup> et Asp<sup>744</sup> par leur équivalent cardiaque (respectivement Pro<sup>870</sup>, Thr<sup>872</sup>, Thr<sup>873</sup>, et Glu<sup>875</sup>) provoque une réduction du CEC. De même, la structure secondaire de la région 744-751 semble importante pour le CEC (Kugler et al., 2004a; Kugler et al., 2004b). Les prédictions de structures réalisées par ces auteurs suggèrent que les acides aminés 744-751 adoptent une structure peu organisée de type « random coil » rendant possible une interaction avec RyR1 alors que la séquence cardiaque correspondante adopterait une structure en hélice  $\alpha$  défavorable à l'interaction avec RyR1.



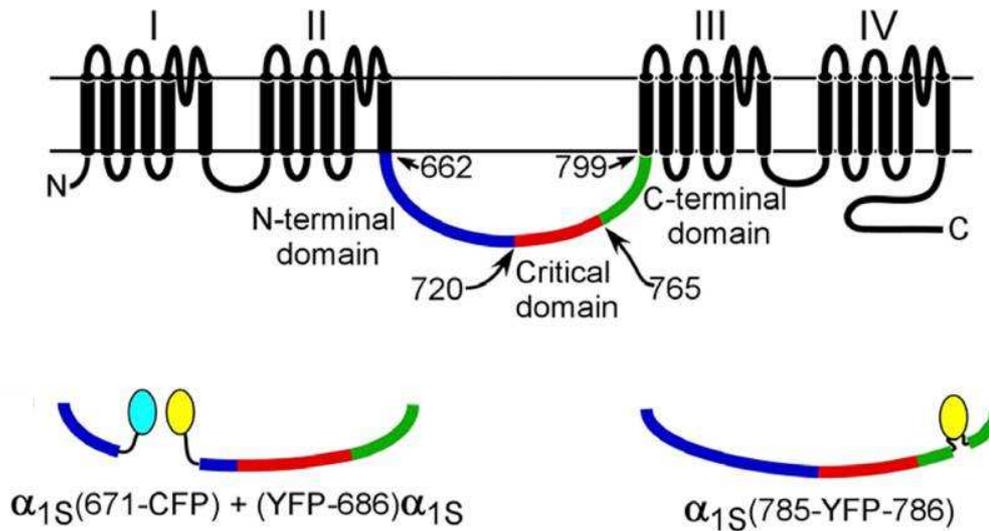
**Figure 25: Représentation schématique de sous-unité  $\alpha 1S$  chimérique présentant des boucles II-III d'origine différente ( $\alpha 1S/M$ ). Alignement des séquences en acides aminés des boucles II-III d'origine squelettique ( $\alpha 1S$ ), cardiaque ( $\alpha 1C$ ) et de muscle squelettique de drosophile ( $\alpha 1M$ ).**

D'après (Wilkins et al., 2001)

(A) Les domaines de la sous-unité  $\alpha 1S$  de lapin sont représentés en bleu. Les domaines correspondant à la sous-unité  $\alpha 1S$  de drosophile ( $\alpha 1M$ ) sont représentés en noir.

(B) Alignement des séquences en acides aminés de la boucle II-III squelettique ( $\alpha 1S$ ), cardiaque ( $\alpha 1C$ ) et du muscle squelettique de drosophile ( $\alpha 1M$ ). Les astérisques indiquent les acides aminés de  $\alpha 1C$  et  $\alpha 1M$  homologues de ceux de  $\alpha 1S$ . Les points indiquent les acides aminés ayant des charges identiques.

Les travaux utilisant des chimères ont apporté un grand nombre d'informations sur l'importance fonctionnelle de domaines précis du DHPR dans le couplage DHPR/RyR. Il est cependant nécessaire de nuancer les interprétations que l'on peut en faire. En effet, ces études sont limitées par le fait que les isoformes d' $\alpha 1$  utilisés possèdent des séquences conservées sur la boucle II-III (figure 25B). Le rôle fonctionnel de ces régions dans le couplage DHPR/RyR ainsi que leur influence sur les régions voisines n'a donc pas pu être étudié par cette approche. C'est notamment le cas de la région C-terminale de la boucle II-III (figure 25B). Afin de pallier ce problème et d'étudier le rôle de l'ensemble des régions de la boucle II-III, l'équipe de Kurt Beam (2009) a récemment étudié les effets sur le CEC de l'insertion d'une ou plusieurs protéines fluorescentes à différents sites de la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha 1S$  (figure 26). Cette étude confirme les résultats précédemment obtenus avec les sous-unités  $\alpha 1$  chimériques, indiquant la non-nécessité de l'intégrité du domaine A pour restaurer un couplage fonctionnel. Mais la principale information apportée par ces travaux est que le couplage bidirectionnel est empêché par l'insertion d'une protéine fluorescente dans la région conservée C-terminale de la boucle. Ce résultat suggère que le rôle majeur joué par le domaine critique de la boucle II-III pourrait être dépendant de son lien avec le domaine transmembranaire III de la sous-unité  $\alpha 1$  via la région conservée C-terminale de la boucle (Bannister et al., 2009a). Cette région pourrait transmettre au domaine critique des changements de conformation intervenant dans d'autres parties de la sous-unité  $\alpha 1$ , dans d'autres sous-unités du DHPR ou même dans certains domaines du RyR ou d'autres protéines du complexe.



**Figure 26: Représentation schématique des différentes insertions de protéines fluorescentes au sein de la sous-unité  $\alpha 1S$ .**

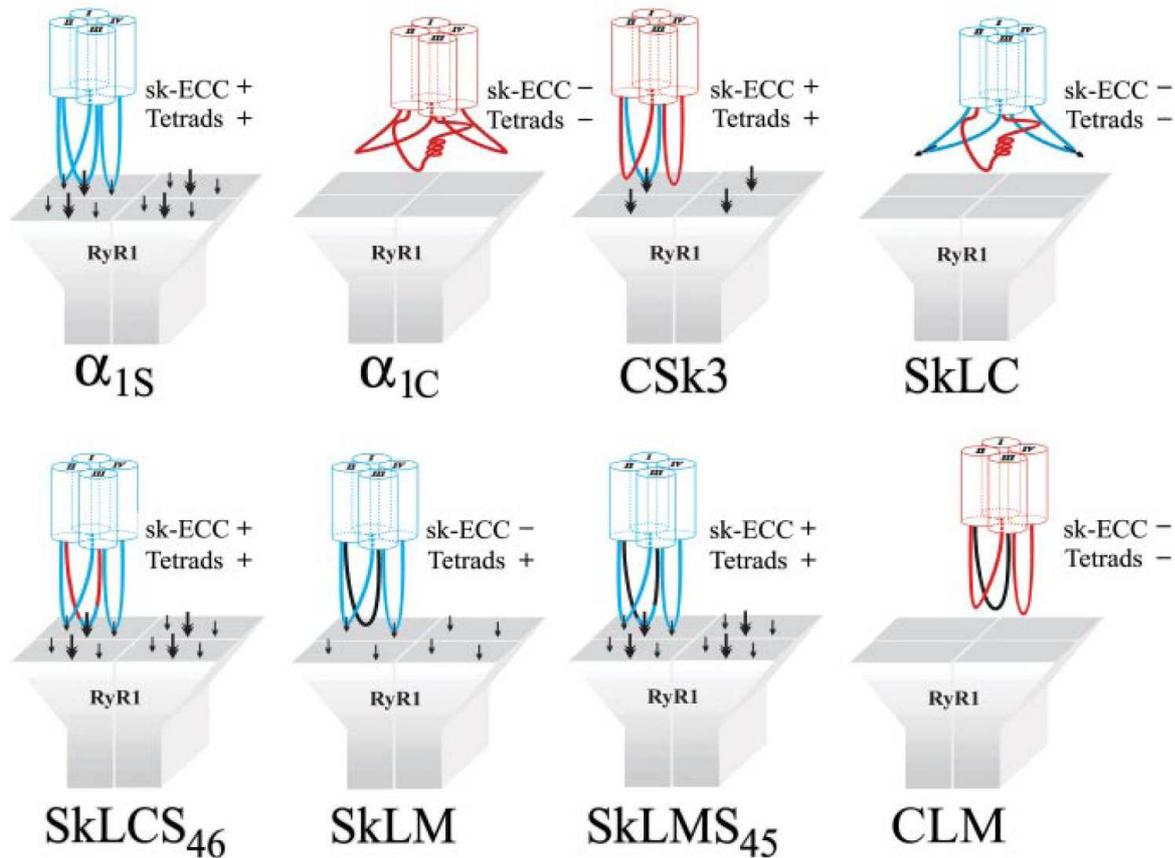
D'après (Bannister et al., 2009a)

Le segment rouge représente le domaine critique de la boucle II-III (résidus 720-765) défini par Nakai en 1998. La région N-terminale, comprenant le domaine A, est indiquée en bleu et la région conservée C-terminale est représentée en vert. Les protéines fluorescentes YFP (yellow fluorescent protein) et la CFP (cyan fluorescent protein), sont introduites soit dans la région C-terminale de la boucle II-III, avant le domaine transmembranaire III entre les acides aminés 785 et 786 ( $\alpha 1S$  (785-YFP-786)), soit en remplacement des acides aminés 672 à 685 dans le domaine A ( $\alpha 1S$  (671-CFP) + (YFP-686)  $\alpha 1S$ ).

La majorité des études réalisées in situ sur des myotubes exprimant des chimères d' $\alpha 1$  s'accordent sur le fait que le domaine A ne joue pas de rôle essentiel dans le déclenchement du CEC (Ahern et al., 2001a; Ahern et al., 2001b; Bannister & Beam, 2009a; Lorenzon et al., 2004; Proenza et al., 2000b). Il serait facile au vu de ces résultats, d'éliminer le domaine A comme composant impliqué dans le couplage bidirectionnel DHPR/RyR et de considérer le domaine critique comme seul déterminant essentiel de ces mécanismes. Certaines données apportent cependant une vision plus nuancée du rôle éventuellement joué par le domaine A, notamment dans le couplage rétrograde. L'expression dans des myotubes dysgéniques d'ADNc correspondant à deux moitiés de la sous-unité  $\alpha 1S$  et n'incluant pas la région 671-700 (comprenant le domaine A) entraîne la restauration du CEC, mais les courants L enregistrés sont réduits et leur dépendance vis-à-vis du voltage déplacé vers des potentiels plus positifs (Ahern et al., 2001a). De même, l'expression d'une sous-unité  $\alpha 1S$  dans laquelle à la fois le domaine A et le domaine critique sont délétés, a démontré l'existence d'un relâchement de  $Ca^{2+}$  induit par la dépolarisation. Ce dernier représente environ 17 % du transitoire calcique observé en présence d'une sous-unité  $\alpha 1S$  non modifiée, et ne nécessite pas la présence du

domaine critique. Bien que cette construction ne produise pas de couplage rétrograde, la restauration partielle du CEC suggère que d'autres régions de la sous-unité  $\alpha 1S$  sont impliquées dans le couplage fonctionnel avec RyR1. Cette hypothèse est soutenue par une étude quantitative de l'efficacité du CEC révélant que l'expression d'une sous-unité  $\alpha 1C$  chimérique incluant une boucle II-III d'origine squelettique permet de récupérer seulement 30% du CEC. L'expression d'une sous-unité  $\alpha 1C$  possédant toutes les boucles cytoplasmiques ainsi que les domaines N et C terminaux d' $\alpha 1S$  permet dans des conditions identiques le rétablissement de 100 % du couplage (Carbonneau et al., 2005). Ces résultats démontrent que les différentes boucles cytoplasmiques d' $\alpha 1S$  influencent également l'efficacité du couplage excitation-contraction. Dans ce contexte, une implication du domaine A dans la régulation de l'interaction de la boucle II-III avec le reste des boucles de la sous-unité  $\alpha 1S$  et/ou avec RyR1 n'est pas à exclure.

Enfin, d'un point de vue ultrastructural, les travaux de Takekura (2004) suggèrent que la boucle II-III n'est pas nécessaire à l'organisation des DHPRs en tétrades indispensables au CEC de type squelettique (figure 27). En effet, l'expression de la sous-unité  $\alpha 1S$  chimérique comportant la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha 1M$  permet la formation de tétrades (Takekura et al., 2004). Cette construction ne permet cependant pas le recouvrement du CEC, alors qu'elle restaure complètement les mouvements de charges (Wilkens et al., 2001). Il s'agit cependant du seul exemple où une construction chimérique d' $\alpha 1S$  permet la restauration de tétrades et de mouvements de charges sans restaurer aussi le CEC (figure 25 et 27). Ces résultats suggèrent donc que ni le domaine critique ni les autres régions de la boucle II-III ne sont requis pour l'organisation en tétrade des DHPRs. Ces résultats, tout en rappelant l'importance de la présence de la boucle II-III pour le CEC, démontrent que d'autres éléments doivent intervenir dans les interactions au sein du complexe DHPR/RyR, notamment dans l'aspect structural de l'interaction qui est essentielle au CEC de type squelettique. Nous verrons plus loin que la sous-unité  $\beta 1a$  et la boucle I-II semblent faire partie de ces éléments.



**Figure 27: Représentation schématique du rôle des différentes boucles cytoplasmiques d' $\alpha 1S$  dans l'interaction DHPR/RyR1 et la formation de tétrades.**

D'après (Takekura et al., 2004).

Les flèches en gras représentent l'interaction principale de la boucle II-III avec RyR1 et les flèches plus petites représentent les autres interactions connues entre les autres boucles de la sous-unité  $\alpha 1S$  et RyR1. Les séquences de type squelettique sont indiquées en bleu, les séquences de type cardiaque en rouge et celles correspondant à la sous-unité  $\alpha 1S$  de drosophile en noir.

Comme nous venons de le voir, les interactions entre la boucle II-III et le RyR jouent un rôle majeur dans la signalisation DHPR/RyR. De même, les changements conformationnels entre des régions de la boucle II-III sont importants pour le couplage bidirectionnel. Ces régions de la boucle II-III peuvent directement interagir avec le RyR, mais il est également possible que leur rôle soit de réguler positivement ou négativement ou de stabiliser d'autres interactions protéines /protéines au sein du complexe DHPR/RyR pour que l'ensemble des paramètres conformationnels et fonctionnels nécessaires à l'établissement d'un couplage bidirectionnel efficace et complet soit présent. Ce pourrait être notamment le rôle du domaine A. De même, les différents domaines fonctionnels évoqués ci-dessus pourraient être impliqués soit dans des interactions statiques liant le DHPR au RyR, soit intervenir de manière dynamique dans la transmission du signal lors des changements conformationnels qui ont lieu pendant le CEC ou le couplage rétrograde. Malheureusement, les

techniques d'analyse actuellement utilisées ne permettent pas de déterminer précisément le caractère statique ou dynamique des interactions mise en évidence. Il est donc important de comprendre comment ses interactions sont couplées entre elles et avec les autres régions du DHPR.

### **3.1.2 La boucle III-IV**

Dans le cas de la boucle III-IV (acides aminés 1066-1118), l'utilisation des chimères  $\alpha 1S/C$  n'a pu apporter d'information en raison de la forte conservation de séquence de cette boucle entre isoformes squelettique et cardiaque (46/53 acides aminés conservés). En comparaison de la boucle II-III, les recherches menées pour étudier l'implication de la boucle III-IV dans le CEC ont donc été peu nombreuses. Et cela, malgré son identification comme étant le seul site de mutation du DHPR (Arg1086His) associé une pathologie du relâchement de  $Ca^{2+}$  hors du RS, l'hyperthermie maligne (Monnier et al., 1997). L'hyperthermie maligne est une maladie du muscle squelettique de transmission autosomique dominante se manifestant sous forme de crise dont la principale manifestation est une élévation extrême et brutale de la température centrale corporelle pouvant aller jusqu'à la mort. La crise d'hyperthermie maligne est déclenchée par certains médicaments à tropisme musculaire, en particulier les anesthésiques halogénés. D'un point de vue fonctionnel, l'analyse de myotubes dysgéniques exprimant une sous-unité  $\alpha 1S$  avec une boucle III-IV porteuse de cette mutation a montré que le RyR1 devient plus sensible à la stimulation par la caféine ainsi qu'à la stimulation électrique. Cette altération de la dépendance au voltage suggère une contribution allostérique négative de la boucle III-IV dans le couplage avec RyR1 (Weiss et al., 2004). Un site d'interaction potentiel de la boucle III-IV sur le RyR1 a également été identifié. En effet, un fragment du RyR1 correspondant aux acides aminés 922-1112 est spécifiquement retenu par une colonne d'affinité sur laquelle est immobilisée la boucle III-IV (Leong & MacLennan, 1998b) (figure 29). Ces résultats suggèrent une implication probable de la boucle III-IV dans le processus de CEC.

L'équipe de Kurt Beam (2008) a récemment apporté des éléments nouveaux montrant que la boucle III-IV n'est pas directement impliquée dans le CEC mais qu'elle intervient plutôt dans l'adressage de la sous-unité  $\alpha 1S$  à la membrane ainsi que dans la régulation de ses propriétés canales (Bannister, Grabner & Beam, 2008). L'expression d'une sous-unité  $\alpha 1S$  possédant une boucle III-IV d'origine neuronale ( $\alpha 1A$ , voir tableau I) dans des myotubes dysgéniques montre en effet des mouvements de charges et des transitoires calciques réduits, suggérant que moins de canaux sont adressés à la membrane, mais que ceux qui y sont fonctionnent correctement lors du CEC. De plus,

une réduction des courants de type L de l'ordre de 40 % est observée indiquant un effet sur le couplage rétrograde.

### **3.1.3 Le domaine N-terminal**

Le domaine N-terminal de la sous-unité  $\alpha 1S$  (acides aminés 1-51) semble ne pas jouer de rôle déterminant dans le couplage DHPR/RyR. En effet, comme l'ont montrées les études utilisant des sous-unités chimériques ( $\alpha 1S/\alpha 1C$ ), les transitoires calciques, la formation de tétrades, et les capacités de contraction des myotubes ne sont pas modifiées par la substitution du domaine N-terminal squelettique par son équivalent cardiaque (Carbonneau et al., 2005; Takekura et al., 2004; Tanabe et al., 1990a). De plus, le remplacement de la séquence N-terminale squelettique par son équivalent neuronal ( $\alpha 1A$ ) n'affecte pas non plus l'adressage à la triade des DHPRs (Flucher, Kasielke & Grabner, 2000). Les conclusions de ces différentes études ont été confirmées une nouvelle fois par la démonstration que la délétion d'une grande partie du domaine N-terminal (acides aminés 2-37) n'affecte ni les courants de type L, ni les transitoires calciques (Bannister & Beam, 2005). Ces auteurs montrent cependant que la délétion supplémentaire de 10 acides aminés sur ce domaine (acides aminés 38-47) bloque l'adressage membranaire de la sous-unité  $\alpha 1S$ .

### **3.1.4 Le domaine C-terminal**

Le domaine C-terminal (C-ter) (acides aminés 1382-1873) joue un rôle plus déterminant dans le CEC. Comme nous l'avons déjà évoqué au chapitre 2, ce domaine subit un clivage protéolytique sur l'alanine 1664 (De Jongh, Merrick & Catterall, 1989; Hulme et al., 2005) mais ce clivage n'affecte pas la capacité de couplage entre DHPR et RyR1 (Beam et al., 1992). L'expression dans des myotubes dysgéniques de sous-unité  $\alpha 1$  délétées dans des régions plus proximales à ce site de clivage a cependant montré l'importance de ce domaine, et en particulier des acides aminés 1543 à 1647, pour le transport et l'adressage à la triade de la sous-unité  $\alpha 1S$  (Flucher et al., 2000; Proenza et al., 2000a). Le rôle du domaine C-ter dans l'adressage de la sous-unité  $\alpha 1S$  à la jonction triadique semble être conditionné par la présence des autres domaines cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1$ . En effet, une sous-unité  $\alpha 1S$  obtenue par co-expression de deux protéines correspondant respectivement à la moitié C-terminale et à la moitié N-terminale de la protéine est adressée à la membrane plasmique, mais pas à la triade (Flucher, Weiss & Grabner, 2002).

D'un point de vue biochimique, des interactions directes entre le domaine C-ter et RyR1 ont pu être montrées. Notamment, plusieurs peptides correspondant à des segments du domaine C-ter interagissent avec RyR1 et/ou induisent une inhibition de la liaison de ryanodine sur le RyR (Sencer et al., 2001; Slavik et al., 1997). Pour évaluer la pertinence de ces résultats dans un contexte plus physiologique, des études utilisant la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (CFP, YFP) par résonance (FRET) ont été réalisées. Papadopoulos et ses collaborateurs (2004) ont ainsi observé que l'absence du RyR entraîne une diminution de l'émission de fluorescence associée à l'expression d'une forme courte de la sous-unité  $\alpha 1$  (acides aminés 1-1667) à laquelle est fusionné le tandem CFP-YFP (Papadopoulos et al., 2004). Ce résultat indique que RyR1 influence l'environnement conformationnel du domaine C-ter. Ces observations sont confirmées par une étude parallèle où une biotine est incorporée au sein du domaine C-ter de  $\alpha 1S$ . Lorsque cette sous-unité modifiée est exprimée dans des myotubes dysgéniques, la biotine n'est pas accessible à une streptavidine fluorescente, alors que l'expression de cette sous-unité dans des myotubes dyspédiques, en absence du RyR1, permet la fixation de la streptavidine à la biotine (Lorenzon et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que le CEC pourrait être influencé par l'interaction du domaine C-ter de  $\alpha 1S$  avec RyR1.

Enfin, il faut noter que différentes études ont montré que le domaine C-ter (492 acides aminés) peut interagir avec plusieurs protéines régulatrices du RyR1 comme la calmoduline (Sencer et al., 2001), la JP45 (Anderson et al., 2006) ou encore la protéine Homer (Feng et al., 2002) et ainsi réguler directement son fonctionnement.

### 3.2 La sous-unité $\beta 1a$ .

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, deux rôles principaux sont attribués à la sous-unité  $\beta 1a$  : (1) un rôle dans l'adressage membranaire et la régulation des propriétés de canal calcique de la sous-unité  $\alpha 1S$ . Cette fonction est principalement liée à l'interaction de cette sous-unité avec la sous-unité  $\alpha 1$ , et (2) un rôle direct dans le CEC.

Les études fonctionnelles sur des myotubes de souris  $\beta 1$ -null ont démontré l'importance de cette sous-unité dans le CEC. Les phénotypes produits par les manipulations moléculaires de cette sous-unité dans des myotubes  $\beta 1$ -null de souris sont semblables à ceux décrits avec les manipulations moléculaires de la sous-unité  $\alpha 1S$  dans les myotubes dysgéniques (Ahern et al., 2003; Beurg et al., 1999; Beurg et al., 1997; Gregg et al., 1996; Strube et al., 1996). De telles similitudes phénotypiques suggèrent que tout comme la sous-unité  $\alpha 1S$ , la sous-unité  $\beta 1a$ , joue un rôle clé dans

la transmission du signal à RyR1. Mais, les raisons exactes de la perte de CEC chez les souris  $\beta 1$ -null restent non élucidées.

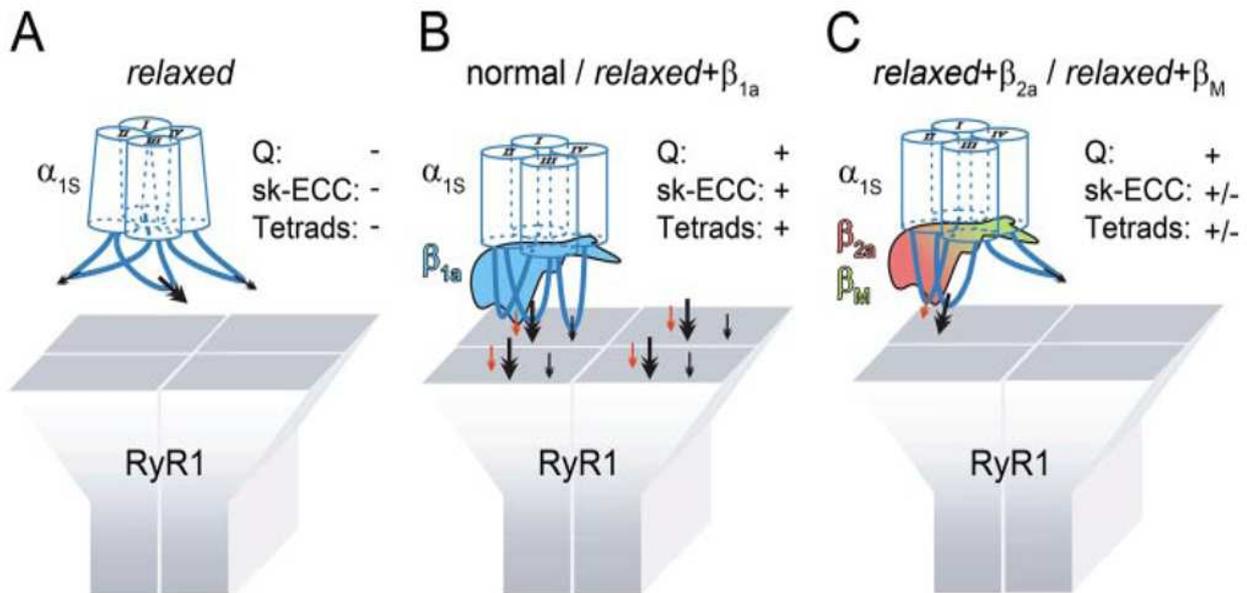
En effet, bien que les observations indiquent une diminution significative de l'amplitude des mouvements de charges et donc du nombre de DHPRs (détecteurs de voltage) dans les myotubes  $\beta 1$ -null, cette réduction du nombre de DHPRs à la membrane explique difficilement la perte totale de CEC observée dans ces myotubes. Plusieurs expériences ont montré un rôle direct de la sous-unité  $\beta$  dans la transmission du signal entre le DHPR et le RyR. En effet, la nature de l'isoforme de la sous-unité  $\beta$  modifie la nature du CEC observé. Des myotubes  $\beta 1$ -null transfectés avec l'isoforme cardiaque  $\beta 2a$  montrent un CEC de type cardiaque alors que l'adressage membranaire d' $\alpha 1S$  n'est pas altéré. L'expression de constructions chimériques ou délétées de sous-unités  $\beta 1a/\beta 2a$  a permis l'identification d'une région C-terminale sur  $\beta 1a$  (35 derniers acides aminés) qui permet la restauration d'un CEC squelettique (Beurg et al., 1999; Sheridan et al., 2003). Plus récemment une interaction directe de la sous-unité  $\beta 1a$  avec RyR1 a été mise en évidence et un groupe d'acides aminés chargés positivement du RyR1 (Lys<sup>3492</sup>-Arg<sup>3502</sup>) a été impliqué dans cette interaction. Les auteurs de cette étude ont également montré que la mutation, ou la délétion, de ce groupe d'acides aminés entraîne la perte de l'interaction RyR1- $\beta 1a$  et une forte diminution de l'efficacité du CEC (Cheng et al., 2005).

Cependant, le rôle précis de  $\beta 1a$  dans le processus de CEC reste aujourd'hui débattu, notamment depuis les études récemment menées sur le modèle de poisson mutant pour  $\beta 1a$ , le « zebrafish mutant relaxed ». L'analyse de myotubes  $\beta 1$ -null hautement différenciés issus de larves de ces poissons a montré une absence de CEC. En effet, les larves ne présentent aucun mouvement et aucun transitoire calcique n'est observé dans les myotubes en réponse à une dépolarisation. Des expériences d'immunocytochimie quantitative ont montré que cette perte du CEC était associée à une perturbation complète du réseau de tétrade formé par les DHPRs (Schredelseker et al., 2005). Cette étude démontre donc que dans ce modèle animal, la sous-unité  $\beta 1a$  n'est essentielle ni pour l'expression membranaire, ni pour l'adressage à la triade de la sous-unité  $\alpha 1S$ , mais suggère qu'elle pourrait agir comme une protéine d'assemblage stabilisant l'organisation ultrastructurale d' $\alpha 1S$  en tétrade au niveau de la triade. Ainsi, dans le muscle squelettique, le nombre restreint de canaux observés à la membrane pourrait résulter d'une diminution de la stabilisation du complexe DHPR/RyR par  $\beta 1a$  entraînant l'absence de formation des tétrades, plutôt qu'une diminution de l'adressage membranaire de la sous-unité  $\alpha 1S$ .

De plus, comme le montre les expériences de Takekura (2004) (figures 27), lors de l'expression d'  $\alpha 1C$  dans des myotubes de souris dysgéniques, la sous-unité  $\beta 1a$  endogène ne permet pas la restauration de l'organisation caractéristique des DHPRs squelettique en tétrades (Takekura et al., 2004). En outre, l'adressage à la triade de la sous-unité  $\beta 1a$  semble nécessiter une interaction avec  $\alpha 1S$  comme le suggère l'absence de colocalisation de la sous-unité  $\beta 1a$  avec RyR1 dans des myotubes dysgéniques (Leuranguer, Papadopoulos & Beam, 2006). Il semble donc que des composants de la sous-unité  $\alpha 1S$  soient essentiels à la fois à l'adressage triadique de  $\beta 1a$  et à la formation des tétrades en regard du RyR1. La boucle I-II est un des candidats probables étant donné l'interaction de forte affinité qu'il existe entre le domaine AID de la boucle I-II de cette sous-unité et  $\beta 1a$  (voir chapitre 2). Mais d'autres domaines d'  $\alpha 1S$  pourraient intervenir.

Le bilan des travaux présentés ci-dessus permet d'imaginer deux hypothèses pour expliquer l'intervention de la sous-unité  $\beta 1a$  dans le couplage RyR/DHPR (voir figure 28B). (1) D'après les travaux de Cheng (2005) et de Leuranguer (2006), le complexe  $\alpha 1S/\beta 1a$  pourrait être à l'origine d'interactions entre RyR1 et  $\beta 1a$  qui participeraient à la formation des tétrades et/ou à la transduction du signal entre le DHPR et RyR1. (2) La sous-unité  $\beta 1a$  agirait seulement comme un modulateur allostérique positif de la conformation de la sous-unité  $\alpha 1S$ , permettant ainsi la formation des tétrades et l'établissement du CEC.

En outre, l'expression de différents isoformes de la sous-unité  $\beta$  dans des myotubes  $\beta$ -null de poisson zèbre a permis de démontrer que les fonctions de restauration du relâchement de  $Ca^{2+}$  et d'organisation des DHPRs en tétrades sont essentiellement  $\beta 1a$  spécifiques. Alors que les fonctions d'adressage à la triade et de restauration des mouvements de charges semblent plus communes aux  $\beta$  (au moins pour  $\beta 1a$ ,  $\beta 2a$  et  $\beta M$  qui est l'isoforme  $\beta$  du muscle squelettique de drosophile) (Schredelseker et al., 2009) (figure 28 modèles B et C).



**Figure 28: Représentation schématique du rôle de la sous-unité  $\beta_{1a}$  dans le contrôle de l'interaction  $\alpha_{1S}$ /RyR.**

D'après (Schredelseker et al., 2009)

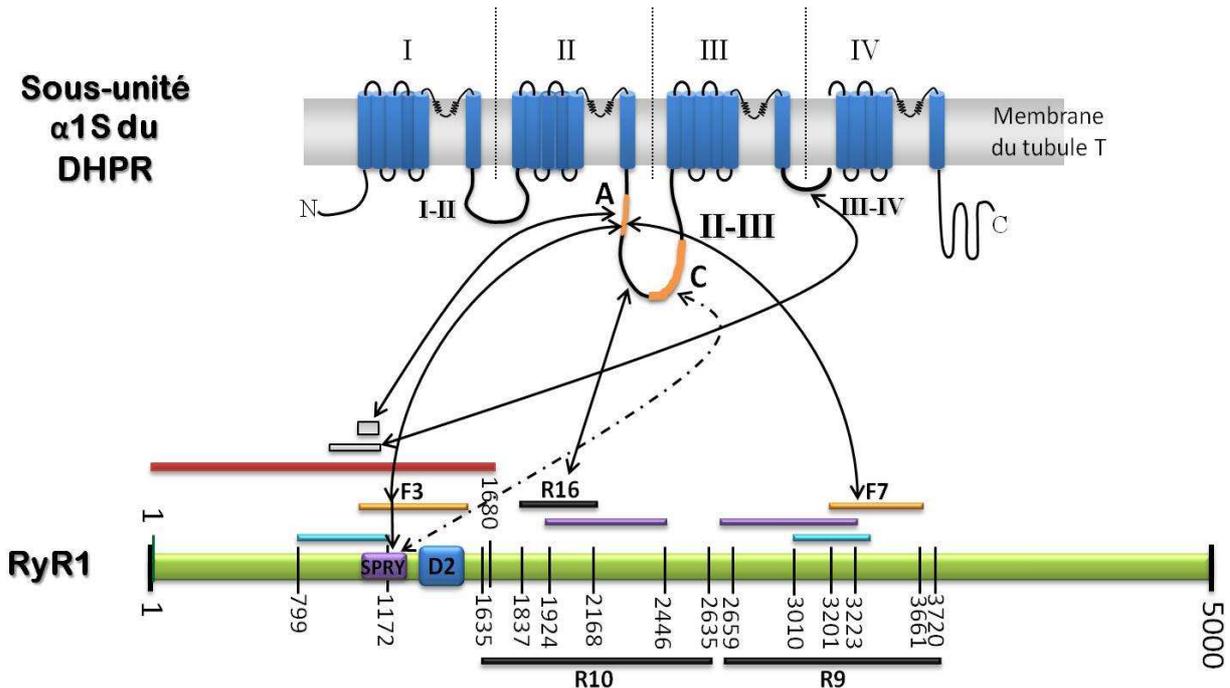
Les flèches en gras représentent l'interaction principale de la boucle II-III avec RyR1 et les flèches plus petites représentent d'autres interactions possibles entre les autres domaines de la sous-unité  $\alpha_{1S}$  et RyR1. Le modèle  $\beta_{1}$ -null utilisé est le myotube de poisson zèbre. « Q » = mouvements de charges au niveau d'  $\alpha_{1S}$  ; « Tetrads » = formation des tétrades ; « sk-ECC » = CEC de type squelettique.

- Situation dans les myotubes  $\beta_{1}$ -null : en l'absence de la sous-unité  $\beta_{1a}$ , la sous-unité  $\alpha_{1S}$  est dans une conformation non fonctionnelle dans laquelle ni les interactions  $\alpha_{1S}$ /RyR1 ni les mouvements de charges ni la formation de tétrades ne sont possibles. Aucun CEC n'est observé. .
- Situation « normale » (en présence de la  $\beta_{1a}$  endogène ou d'une  $\beta_{1a}$  exprimée dans les myotubes  $\beta_{1}$ -null) : La présence de  $\beta_{1a}$  permet à la sous-unité  $\alpha_{1S}$  d'être dans une conformation complètement fonctionnelle qui autorise les mouvements de charges, la formation de tétrades et par conséquent l'interaction DHPR/RyR. CEC normal. **Là deux hypothèses s'opposent** : (1) D'après les travaux de Cheng (2005) et de Leuranguer (2006), le complexe  $\alpha_{1S}/\beta_{1a}$  pourrait aussi être à l'origine d'interactions entre RyR1 et  $\beta_{1a}$  (flèches rouges) qui participeraient à la formation des tétrades et /ou à la transduction du signal entre le DHPR et RyR1. (2) La sous-unité  $\beta_{1a}$  agit seulement comme un modulateur allostérique positif de la conformation de la sous-unité  $\alpha_{1S}$ , permettant ainsi la formation des tétrades et l'établissement du CEC.
- Situation lors de l'expression de  $\beta$  hétérologues ( $\beta_{2a}$ ,  $\beta_M$  dans cet exemple). La restauration de la conformation de la sous-unité  $\alpha_{1S}$  est partielle. La conformation adoptée autorise des mouvements de charges normaux, mais la formation des tétrades et donc le CEC sont altérés.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle crucial de la sous-unité  $\beta_{1a}$  dans le processus de CEC autre que via la régulation de la fonction canal d'  $\alpha_{1S}$  ou de son expression à la membrane. L'interaction RyR1/ $\beta_{1a}$  est un élément à part entière du couplage physique entre DHPR et RyR1 lors du CEC.

### 3.3 Le récepteur de la ryanodine

Comme cela a déjà été mentionné, les liens fonctionnels entre RyR1 et DHPR sont de deux types: (1) le couplage orthograde, qui représente le contrôle de l'activité canal du RyR1 par le DHPR et (2) le couplage rétrograde, qui représente le contrôle de l'activité canal de la sous-unité  $\alpha 1S$  par RyR1. Les différentes interactions directes entre la sous-unité  $\alpha 1S$  et le RyR1, ainsi que les différents domaines fonctionnels identifiés sur RyR1 sont résumés dans la figure 29.



**Figure 29 : Schéma résumant les différentes interactions et sites impliqués dans le couplage entre la sous-unité  $\alpha 1S$  et le RyR1**

Les régions A et C de la boucle du DHPR reliant les domaines II et III ont été définies par El-Hayek (1995). Les régions R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub> et R<sub>16</sub> (en noire) du RyR1 ont été définies par Nakai (1998) et Proenza (2002). R<sub>10</sub> (acides aminés 1635-2635) est une séquence indispensable au CEC. R<sub>9</sub> (acides aminés 2659-3720) et R<sub>10</sub> sont nécessaires au couplage rétrograde et la région R<sub>16</sub> (acides aminés 1837-2168) interagit avec la boucle II-III (Nakai et al., 1998a; Proenza et al., 2002).

Le domaine SPRY représenté est le domaine SPRY2 et correspond aux acides aminés 1085-1208. In vitro ce domaine SPRY montre aussi une interaction avec le domaine C (flèche pointillée) (Cui et al, 2009)

Les domaines F3 et F7 (en orange) ont été identifiés par Altafaj (2005) comme interagissant avec le domaine A de la boucle II-III. Ils correspondent respectivement aux acides aminés 1021-1631 et 3201-3661 (Altafaj et al., 2005).

Les expériences menées sur des chimères RyR1/RyR3 ont permis d'identifier des séquences fonctionnelles importantes pour le CEC : les domaines comprenant les acides aminés 1924-2446 (en violet) et 2644-3223 (en violet), et surtout la région correspondant aux acides aminés 1-1680 de la partie N-ter du RyR1 (en rouge). Cette région contient le domaine D2 correspondant aux acides aminés 1727-1455 qui joue un rôle particulièrement important dans le CEC (Perez, Mukherjee & Allen, 2003a; Perez et al., 2003b).

Les régions représentées en bleu turquoise correspondent aux domaines identifiés par Zorzato (1996) comme pouvant interagir entre elles au sein du RyR1 (acides aminés 799-1172 et 3010-3225) (Zorzato et al., 1996).

Les domaines identifiés par Leong et MacLennan (1998) sont représentés en gris. Ils correspondent aux acides aminés 922-1112 et 1076-1112. Ils interagissent respectivement avec la boucle III-IV et II-III (Leong & MacLennan, 1998b).

Les flèches indiquent les interactions entre des régions du DHPR et du RyR.

La détermination du rôle des différentes régions cytoplasmiques du RyR1 dans le couplage DHPR/RyR a, comme pour la sous-unité  $\alpha 1S$ , bénéficié de l'existence d'un modèle animal (souris dyspédiques) et d'une lignée de cellules myogéniques (lignée 1B5) déficientes pour l'expression du RyR1 permettant l'expression et l'étude fonctionnelle de RyR chimériques composés de domaines de RyR1 et de domaines du RyR2. Cette approche a permis de définir plusieurs régions du RyR1 impliquées dans le couplage fonctionnel avec le DHPR. La grande taille du RyR est cependant un facteur de difficulté pour l'identification de domaines fonctionnels de petite taille. Ainsi, la région 1635-2635 du RyR (R10) est impliquée dans le couplage orthograde du RyR avec le DHPR, alors que la séquence R9 (2659-3720) participe à la régulation rétrograde du DHPR (Nakai et al., 1998a). De plus, des petites régions ont été identifiées en utilisant la technique du double hybride qui permet de démontrer une interaction spécifique entre les acides aminés 1837-2168 (R16) et le domaine critique de la boucle II-III (acides aminés 720-765) (Proenza et al., 2002). Les mêmes auteurs montrent cependant que cette séquence R16 ne permet à elle seule ni d'assurer un CEC squelettique normale, ni un couplage rétrograde, et que d'autres régions du RyR1 sont nécessaires à ces mécanismes. Les expériences utilisant des chimères RyR1/RyR3 ont permis d'identifier de nouvelles séquences fonctionnelles importantes pour le CEC, telles que les domaines comprenant les acides aminés 1924-2446 et 2644-3223, et surtout la région correspondant aux acides aminés 1-1680 de la partie N-ter du RyR1. Cette région comporte un domaine dit divergent (D2, acides aminés 1272-1455) qui joue un rôle particulièrement important dans le CEC (Perez et al., 2003a; Perez et al., 2003b). Ces résultats ainsi que ceux d'autres études portant sur l'organisation spatiale des DHPRs induite par l'expression de ces RyRs chimériques indiquent clairement que (1) plusieurs régions du RyR1 sont impliquées dans le couplage fonctionnel RyR1/DHPR responsable du CEC, (2) les régions du RyR1 impliquées dans la formation des tétrades ne correspondent pas strictement à celles impliquées dans les interactions fonctionnelles DHPR/RyR1 et (3) le domaine D2 joue un rôle clef dans la stabilisation de ces interactions (Protasi, 2002; Sheridan et al., 2006) (figure 29).

Les différentes protéines associées à RyR1 décrites au chapitre 2 peuvent également être nécessaires à ces interactions ou en moduler l'affinité. C'est par exemple le cas de la FKBP12 qui facilite l'interaction entre la boucle II-III et RyR1 (Oreilly, 2002).

Parallèlement, l'existence d'interactions intramoléculaires entre différentes régions du RyR1 régulant l'activité du RyR1 ainsi que le CEC a été proposée sur la base de l'étude de l'effet de peptides correspondants à différentes régions du RyR1 portant des sites de mutations à l'origine de myopathies (hyperthermie maligne et myopathie à cores centraux). L'utilisation d'anticorps dirigés contre un domaine proche de la glycine 341 a permis de mettre en évidence une interaction de ce

domaine avec deux domaines du RyR1 comprenant les acides aminés 3010-3225 et 799-1172 respectivement (Zorzato et al., 1996) (figure 29). Une interaction entre la région N-terminale et la région centrale du RyR1, toutes deux particulièrement riches en sites de mutation a été mise en évidence (Ikemoto & Yamamoto, 2000; Yamamoto, El-Hayek & Ikemoto, 2000).

Enfin, plus récemment, des études axées sur l'identification des domaines du RyR1 impliqués dans l'interaction avec la boucle II-III ont permis de montrer que plusieurs sites du RyR1 pouvaient participer à cette interaction. En utilisant différents fragments du RyR1, deux sites ont montré une interaction avec le domaine A de la boucle II-III (acides aminés 1021-1631 et 3201-3661, nommés domaine F3 et F7 respectivement) (Altafaj et al., 2005). L'équipe de Marco Casarotto a aussi suggéré que l'interaction de la boucle II-III sur le RyR se faisait via un domaine SPRY (Casarotto et al., 2006; Cui et al., 2009). Les domaines SPRY sont reconnus comme des régions privilégiées d'interactions protéines/protéines et sont nommés ainsi en raison de leurs identifications à la fois dans une kinase sp1A de *Dictyostelium discoideum* et chez les RyRs de mammifères (Ponting, Schultz & Bork, 1997). On retrouve trois domaines SPRY (1 à 3) structurellement distincts sur chaque isoforme du RyR. Les travaux de Cui et Tae (2009) ont montré in vitro que la boucle II-III interagissait sur le domaine SPRY2 du RyR1 principalement via le domaine A (acides aminés 1085-1208) (Cui et al., 2009; Tae et al., 2009) (figure 29).

Les différentes études fonctionnelles basées sur l'utilisation de RyRs chimériques se heurtent cependant à la difficulté de prendre en compte l'importance de l'environnement de tel ou tel domaine dans sa fonction propre. Il est ainsi apparu que l'importance fonctionnelle d'un domaine particulier peut varier selon que le reste de la séquence est de nature squelettique ou cardiaque. De plus, certaines différences sont observées entre l'identification de domaines fonctionnels et l'identification de domaines interagissant avec les protéines du complexe de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à définir les sites d'interaction entre domaines de la sous-unité  $\alpha 1S$  ainsi que la séquence et la structure tridimensionnelle d'un des sites d'interaction  $\alpha 1S/\text{RyR1}$ .

### 3.4 La maurocalcine, un outil pour l'étude du CEC

Au cours des multiples travaux qui ont été menés pour étudier les bases moléculaires du CEC et établir le rôle des différents composants du complexe de mobilisation calcique, l'identification de molécules pharmacologiquement actives sur les protéines impliquées a été un atout majeur, en particulier la ryanodine et les dihydropyridines.

Les toxines obtenues à partir de venins sont depuis longtemps une source de composés biologiquement actifs sur les canaux ioniques. Des peptides de haute affinité et spécifiquement actifs sur certains canaux ioniques ont pu être isolés à partir de ces venins (Catterall, 1980; Garcia et al., 1997). Parmi les toxines actives sur le RyR, la maurocalcine (MCA) est, avec l'Impératoxine A, la mieux caractérisée. Elle a été initialement isolée à partir du venin d'un scorpion tunisien *Scorpio maurus palmatus*. Il s'agit d'un peptide de 33 acides aminés dont la structure tridimensionnelle fut obtenue par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Mosbah et al., 2000). Cette structure est caractérisée par un motif appelé « Inhibitor Cystine Knot » préalablement décrit pour différentes toxines peptidiques et inhibiteurs de protéases (Zhu et al., 2003). Ce type de structure n'avait cependant jamais été observée pour des toxines de scorpion (figure 30) (Mosbah et al., 2000). Ce peptide a pu être produit par synthèse chimique sans perte d'activité ni altération structurale (Fajloun et al., 2000). La structure de la MCA met en évidence une partie compacte stabilisée par trois ponts disulfures dont émergent plusieurs boucles et le domaine N-terminal. De façon intéressante cette structure fait apparaître une forte anisotropie caractérisée par deux faces, l'une comprenant principalement les acides aminés chargés positivement et l'autre les acides aminés chargés négativement.

Les principaux effets de la MCA sur RyR1 peuvent être résumés ainsi ;

(1) La MCA augmente fortement la liaison de ryanodine sur des vésicules de réticulum sarcoplasmique ainsi que sur RyR1 purifié. Cette augmentation traduit la transformation de sites de liaison de la ryanodine de faible affinité en sites de forte affinité (Esteve et al., 2003).

(2) La MCA induit un relâchement de calcium mesuré à partir de vésicules de membrane de RS.

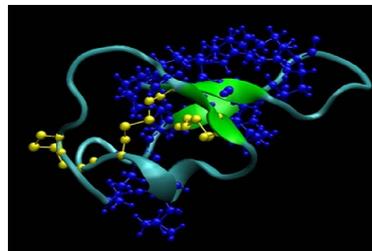
(3) La fixation de MCA sur RyR1 entraîne une importante modification de ses propriétés de canal calcique qui se traduit par une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal et surtout l'apparition de longues périodes pendant lesquelles le canal reste ouvert dans un état caractérisé par une conductance inférieure à la conductance maximale de RyR1 mesurée en absence de MCA (Chen et al., 2003; Esteve et al., 2003; Fajloun et al., 2000).

En plus de son intérêt comme puissant effecteur du RyR1, la MCa présente également l'intérêt d'une forte homologie de séquence avec le domaine A de la sous-unité  $\alpha 1$  du DHPR (figure 30). Comme nous l'avons vu précédemment, bien qu'il soit établi que ce domaine interagit, *in vitro*, avec RyR1 et modifie son activité de canal calcium, son rôle précis dans le processus de CEC est toujours débattu. Un examen précis des effets de la MCa sur RyR1 et sur le CEC a donc été réalisé et se poursuit à l'heure actuelle dans le but d'apporter des indications sur les liens physiques et fonctionnels entre le DHPR et le RyR et notamment avec le domaine A.

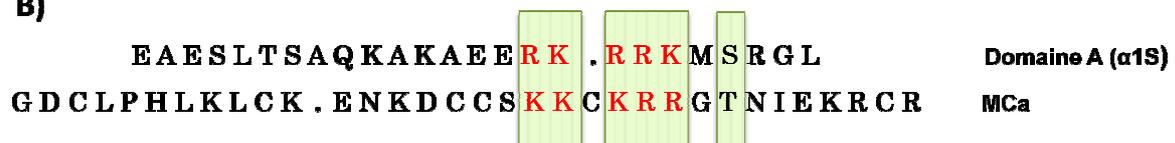
L'étude de l'effet de la MCa sur les signaux calciques spontanés enregistrés dans des fibres musculaires en culture a permis de montrer que dans ces cellules la MCa ne peut interagir avec RyR1 que lorsque celui-ci est « découplé » du DHPR (Szappanos et al., 2005). L'étude de l'effet de la MCa sur le CEC dans des fibres musculaires adultes a par ailleurs permis de proposer que l'interaction du domaine A avec RyR1 joue un rôle important dans le contrôle de la fermeture du RyR1 lors de la repolarisation de la membrane plasmique (Pouvreau et al., 2006).

Deux sites de fixations communs à la MCa et au domaine A ont été identifiés sur RyR1 (Altafaj et al., 2005).

A)



B)



**Figure 30: La maurocalcine et le domaine A du DHPR**

(A). Structure 3D de la MCa. En bleu sont représentés les acides aminés basiques (chargé positivement à pH physiologique). ; en jaunes, les ponts disulfures impliquant les différentes cystéines de la molécule ; et en vert, les feuillets  $\beta$ .

(B). Alignement des séquences de la MCa et du domaine A de la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR. Les acides aminés conservés sont encadrés en vert. En rouge sont représentés les acides aminés basiques.

Enfin, en plus de ces propriétés d'effecteur du RyR1, cette toxine possède la capacité de traverser passivement les membranes biologiques et ainsi de pénétrer dans différents types cellulaires (Esteve et al., 2005; Ram et al., 2008a).

Ces différentes propriétés ont fait de la MCa un outil unique pour l'étude du couplage fonctionnel DHPR-RyR. Une partie de mon travail de thèse a consisté à identifier de façon plus précise un de ces domaines du RyR1 afin de permettre la définition de sa structure tridimensionnelle par RMN. J'ai également rédigé une revue détaillée sur l'utilisation de la MCa dans l'étude du CEC, publiée sous la forme d'un chapitre du livre « Animal Toxins : State of the Art » (Bichraoui et al., 2009) (annexe 1)



## MATERIELS ET METHODES



# MATERIELS ET METHODES

## 1. Analyse des protéines

J'ai utilisé deux techniques classiques de biochimie pour analyser les protéines lors de leur purification ainsi que pour identifier les protéines dans les expériences de co-précipitation.

### 1.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide

**Principe :** Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les protéines migrent sous l'influence d'un champ électrique à travers un gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) (SDS-PAGE) Le SDS, détergent anionique, dénature les protéines et les recouvre avec des charges négatives. La vitesse de migration des protéines sera donc proportionnelle à leur taille et non plus à leur charge. La concentration du gel en acrylamide qui peut varier de 7 à 20 % est choisie en fonction du poids moléculaire des protéines à analyser.

**Protocole :** Les échantillons protéiques sont solubilisés dans un tampon dénaturant (tampon 6X contenant 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 ; SDS 12 %, glycérol 60 %, bleu de bromophénol 0,06 %, et DTT 120 mM) et dénaturés par chauffage à 100°C pendant 3 min. Les échantillons sont déposés sur le gel et soumis à l'électrophorèse sur un appareil « mini protéan III » (BioRad) pendant environ 1 heure à une intensité de 0.04 A. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Biorad) pendant 30 min pour marquer les protéines présentes.

### 1.2 Immunodétection des protéines par western blot

**Principe :** Cette technique permet le marquage et la détection des protéines immobilisées sur une membrane grâce à des anticorps spécifiques. L'immunodétection est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et d'un anticorps secondaire spécifique de l'espèce de l'anticorps primaire. La liste des anticorps utilisés est présentée dans le tableau VI. La présence de l'anticorps primaire et donc de la protéine d'intérêt sera mise en évidence grâce à une enzyme, la « Horse Radish Peroxidase » (HRP), liée de manière covalente à l'anticorps secondaire. Cet enzyme catalyse une réaction chimioluminescente en présence de son substrat. La détection se fait à l'aide d'un luminomètre permettant l'acquisition et l'analyse d'image à partir des membranes de western blot (Imager G Box, Ozyme ; logiciel GeneSnap, Syngen).

**Protocole :** Après migration des protéines sur gel dénaturant (SDS-PAGE), celles-ci sont transférées sur une membrane en PVDF (polyfluorure de vinylidène) (Immobilon P), par électrotransfert. Le gel et la membrane ainsi que les autres éléments qui composent la cassette de transfert (figure 31) sont d'abord plongés quelques minutes dans un bain contenant le tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glycine 192 mM, méthanol 20% et SDS 0,025 %). Ils sont ensuite placés en contact direct, entre deux papiers Whatmann 3mm dans la cassette de transfert (figure 31). Le transfert est réalisé par électrophorèse à 0.4 A pendant environ 1 heure (la durée peut être augmentée en fonction de la taille de la protéine analysée) dans le tampon de transfert. La membrane est ensuite incubée dans un tampon de saturation (PBS 1X contenant 0.1% de tween 20 et 10% de lait) pour empêcher la liaison non spécifique des anticorps sur la membrane. Après une heure de saturation, la membrane est incubée à température ambiante avec l'anticorps primaire pendant 1h30, puis avec l'anticorps secondaire pendant 45 minutes. La membrane est lavée avec un tampon de lavage (PBS1X, Tween 0,1% = PBS-T) après chaque incubation avec les anticorps. Les complexes formés entre les anticorps primaires et secondaires sont révélés par réaction chimiluminescente, en incubant la membrane en présence d'un substrat chimiluminescent (ECL Western Blotting Substrate, Pierce).

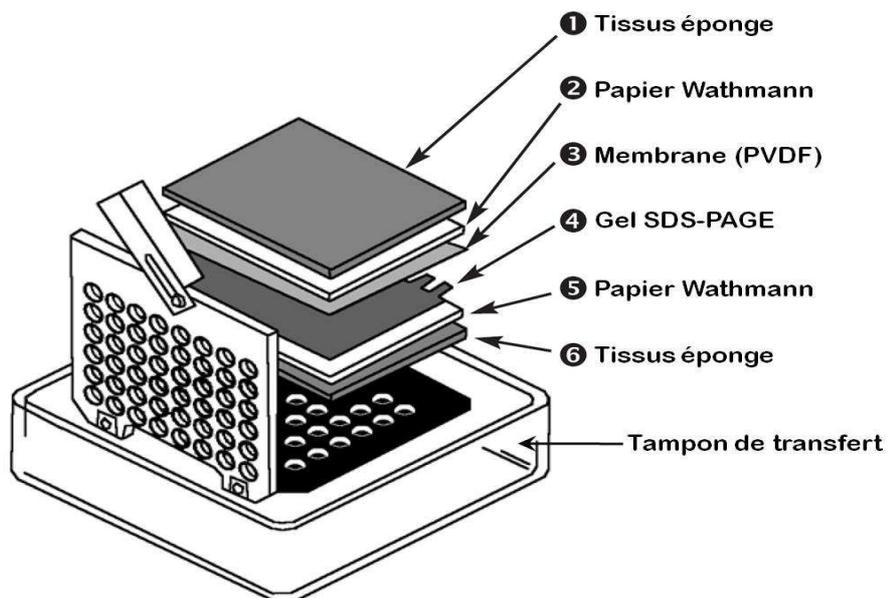


Figure 31: Schéma du montage de la cassette de transfert pour un western blot

Anticorps	Catégorie (I <sup>aire</sup> ou II <sup>aire</sup> )	Espèce de production	Utilisation	Fournisseur	Dilution
Anti His	I <sup>aire</sup> , monoclonal	Souris	IP, WB	Sigma Aldrich	1:10000
Anti GST	I <sup>aire</sup> ,	Souris	IP, WB	Thermo-Scientific	1:5000
Anti DHPR (sous-unité Alpha)	I <sup>aire</sup> , monoclonal	Souris	WB	Swant	1:7000
Anti CAV-3	I <sup>aire</sup> , polyclonal	Lapin	WB	Affinity BioReagents	1:1000
Anti Ig-souris	II <sup>aire</sup> , couplé HRP	Chèvre	WB	Jackson Immunoresearch	1:10000
Anti Ig-lapin	II <sup>aire</sup> , couplé HRP	Chèvre	WB	Jackson Immunoresearch	1:10000
Anti GFP	I <sup>aire</sup> , polyclonal	Lapin	WB, IF	TebuBio	1:5000

Tableau VI: Liste des anticorps utilisés

## 2. Clonage, expression et purification de protéines recombinantes

### 2.1 Clonage

Au cours de ma thèse, j'ai principalement étudié les interactions entre différentes protéines ou domaines de protéines. Plusieurs des approches méthodologiques que j'ai utilisées ont nécessité le clonage, l'expression et la purification de protéines ou domaines de protéines. Les études menées dans des systèmes cellulaires, ovocytes de xénope ou myotubes, ont elles aussi nécessité le clonage dans des vecteurs appropriés de différentes protéines.

Les différentes boucles cytoplasmiques, les domaines N et C-terminaux de la sous-unité  $\alpha 1S$  ainsi que la sous-unité  $\beta 1a$ , ont été clonées dans les vecteurs pMR78 ou pGEX-6P1. Ces vecteurs permettent de fusionner la séquence du gène cible à une séquence codant une polyhistidine (6-his) (pMR78) ou une enzyme, la glutathion sérine transférase (GST) (pGEX-6P1). Ces groupements 6-his et GST représentent des « étiquettes » qui permettent d'une part l'interaction de la protéine recombinante avec un substrat spécifique de l'étiquette, et d'autre part le marquage spécifique de la protéine recombinante à l'aide d'anticorps dirigés contre l'étiquette. On parlera de protéines étiquetées His ou GST.

Un fragment d'ADN codant la protéine ou le domaine protéique d'intérêt est amplifié par PCR avec les oligonucléotides adéquats. Ce produit de PCR constitue l'insert qui sera introduit dans un vecteur plasmidique bactérien. L'insert ainsi que le vecteur cible sont digérés pendant deux heures à 37°C par les endonucléases de restriction adéquates. Les produits de cette digestion (insert et vecteur) sont purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose puis sur colonne avec le kit « Qiaquick

gel extraction » (Qiagen). Ce kit permet la solubilisation de l'agarose et l'adsorption quantitative et sélective de l'ADN sur des particules de silice en présence d'une forte concentration de sels. L'ADN est élué dans une solution de Tris/HCl 10mM à pH8. Un gel d'agarose ainsi qu'un dosage spectrophotométrique à 260 nm et 280 nm permettent d'évaluer la quantité et la pureté de l'ADN récupéré.

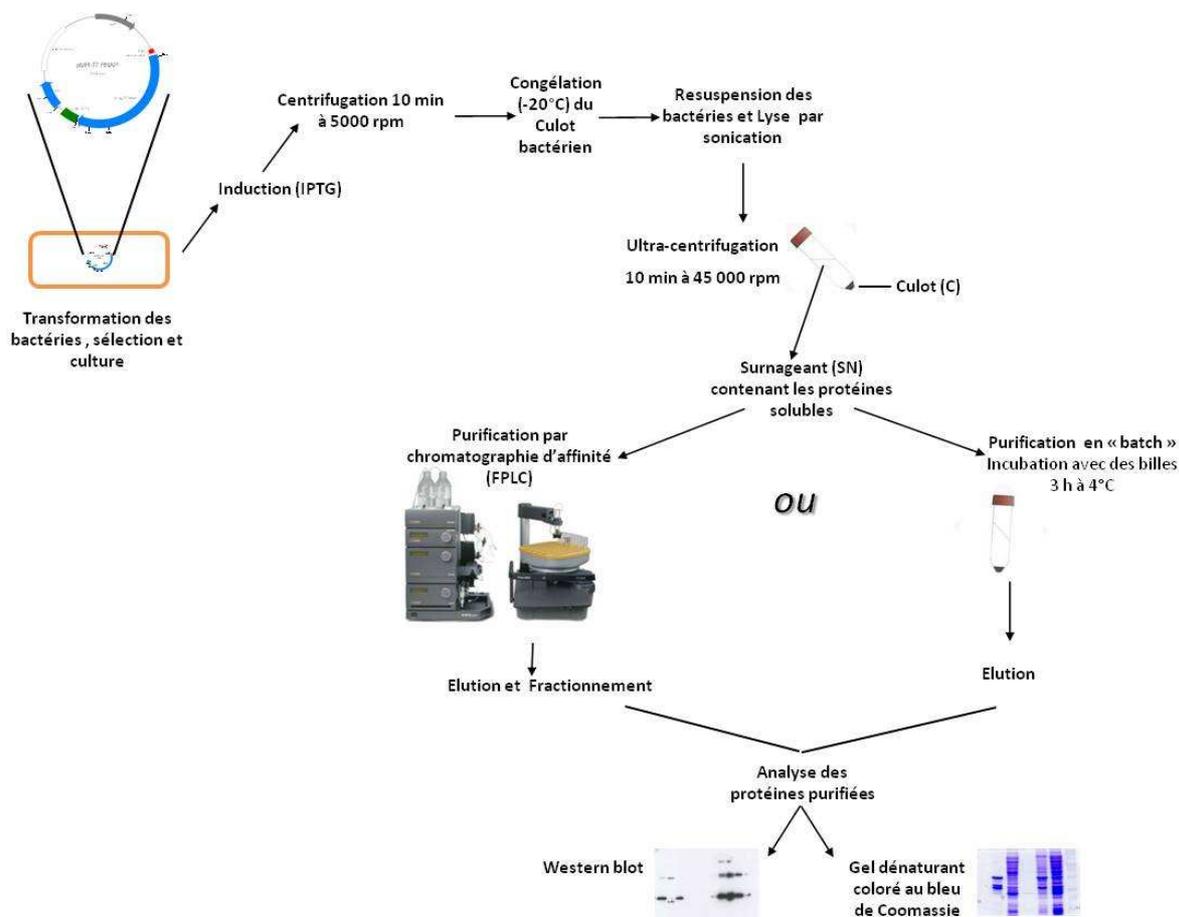
L'insert et le vecteur ainsi obtenus sont alors réunis par l'action d'une ligase (T4 DNA ligase, Invitrogen), pendant 1h ou 2h à température ambiante. Après cette étape de ligation, le plasmide recombinant formé (vecteur + insert) est utilisé pour la transfection par choc thermique d'une souche bactérienne ultra-compétente spécialement conçue pour le clonage (XL 10 Gold, Stratagen). Grâce à un gène de résistance à un antibiotique présent sur le vecteur, seules les bactéries ayant intégré le plasmide recombinant peuvent survivre. Après une nuit d'incubation sur boîte de milieu de culture nutritif « Lysogeny Broth » (LB-agar), une ou plusieurs colonies bactériennes (ou clone bactérien) sont récupérées puis mises en culture dans 5 mL de milieu LB liquide. Cette culture servira à purifier une quantité suffisante d'ADN plasmidique pour séquencer le clone produit. Cette étape est réalisée à l'aide du kit «Qiagen miniprep kit ».

<i>Vecteur</i>	<i>Caractéristiques principales</i>	<i>Taille (paires de bases)</i>	<i>Utilisation</i>	<i>Résistance aux antibiotiques</i>
pMR78	tag His (N-ter)	4893	clonage, expression en bactérie	Ampicilline
pGEX6P-1	tag GST (N-ter)	4900	clonage, expression en bactérie	Ampicilline
pGEX-2T	Double tag GST (N-ter) et His (C-ter)		clonage, expression en bactérie	Ampicilline
pcDNA3.1	pas de tag	5428	clonage, expression en cellule eucaryote	Ampicilline
pDsRed1-C1	pas de tag, code une protéine fluorescente rouge	4700	co-transfection, expression en cellule eucaryote	Kanamycine/ Néomycine
pEGFP-C1	tag EGFP (protéine fluorescente verte) (N-ter)	4700	Clonage, co-transfection, expression en cellule eucaryote	Kanamycine/ Néomycine

Tableau VII: Caractéristiques des différents vecteurs utilisés.

## **2.2 Expression des protéines recombinantes dans un système bactérien**

Les différentes phases de l'expression et de la purification des protéines recombinantes utilisées sont résumées dans la figure 32.



**Figure 32: Schéma des différentes étapes permettant l'expression et la purification de protéines recombinantes**

Pour la production des protéines recombinantes, nous avons utilisé des bactéries compétentes de la souche *E.coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen). Cette souche a spécialement été développée pour la surexpression de protéines exogènes. 50  $\mu$ l de bactéries sont transformées à l'aide des différentes constructions plasmidiques. Pour cela, les différents plasmides recombinants (5 ng d'ADN) sont incubés avec les bactéries pendant 30 min à 4°C, puis les bactéries sont soumises à un choc thermique pour faire pénétrer l'ADN, (42°C pendant 45 s puis 4°C pendant 2 min). Les bactéries transformées sont ensuite incubées pendant une heure à 37°C sous agitation dans 1 ml de milieu de culture riche (S.O.C. Medium, Invitrogen). Finalement, 1/10<sup>e</sup> du produit de transformation est étalé dans des boîtes LB-agar contenant de l'ampicilline (à 100  $\mu$ g/ml), afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide d'intérêt contenant le gène de résistance à l'ampicilline. Seize heures plus tard, une colonie est repiquée puis mise en culture en milieu LB liquide (1 mL) en présence d'ampicilline à 100  $\mu$ g/mL (LB-Amp). Cette culture est mélangée à du glycérol pour pouvoir être congelée à -20°C sans tuer les bactéries. Pour produire la protéine de fusion en quantité suffisante, une pré-culture est réalisée en mettant quelques microlitres de bactéries à pousser dans 40

mL de LB pendant la nuit. Le lendemain matin, les 40 mL de culture sont inoculés dans 400 mL de milieu LB-Amp. Lorsque la densité optique de la culture à 600 nm se situe entre 0.7 et 1, les bactéries sont en phase exponentielle de croissance, l'expression de la protéine recombinante est alors induite par ajout d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (entre 0.1 et 1 mM final suivant la protéine). Après 3 heures d'induction, les bactéries sont centrifugées 15 min à 5000 g, et les culots bactériens congelés à -20°C

Parfois les protéines surexprimées dans *E.coli*, forment des agrégats insolubles appelés corps d'inclusion. En effet, la solubilité d'une protéine surexprimée chez *E.coli* varie selon la protéine elle-même et/ou les étiquettes utilisées. Il est possible qu'une même protéine soit insoluble avec une étiquette 6-histidines et soluble avec une étiquette GST. Chaque protéine demandera donc un protocole de production et de purification optimisé.

### **2.3 Purification des protéines recombinantes**

Toutes les étapes de la purification sont réalisées à 4°C. Le culot de bactéries ayant exprimé la protéine recombinante d'intérêt est d'abord décongelé sur de la glace. Cette étape permet de fragiliser les membranes bactériennes. Il est ensuite resuspendu et lysé dans un tampon de lyse (tableau VIII). Généralement, le culot de 400 mL de culture est lysé dans 10 mL de tampon de lyse, mais ces volumes peuvent varier en fonction de la quantité de bactéries présentes et de la protéine à purifier. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication (75 cycles de 2 secondes). Après sonication, le matériel insoluble et les débris cellulaires sont retirés par ultracentrifugation pendant 10 min à 45000 rpm. Les protéines solubles présentes dans le surnageant sont ensuite purifiées suivant deux protocoles différents : les protéines étiquetées GST sont directement purifiées par ajout de billes recouvertes de Gluthation alors que les protéines étiquetées His sont purifiées par chromatographie d'affinité sur un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (*Äkta purifier*, Amersham) (figure 32). L'intégrité et la pureté des protéines ainsi purifiées sont contrôlées par gel SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Biorad) ainsi que par western blot.

	<i>Concentration finale</i>	<i>Remarques</i>
<i>Solution d'imidazole 20 ou PBS 1X</i>	Qsp 10 mL	Suivant la protéine
<i>DTT</i>	1 mM	Agent réducteur, empêche la reformation des ponts disulfures
<i>DNase</i>	20 µg/mL	
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	1 mM	
<i>Triton 20%</i>	0,5 %	Ajouté avant la sonication
<i>Inhibiteur de protéase (Complete, Roche)</i>	1 comprimé	Mélange d'inhibiteur de protéases

**Tableau VIII: Composition des tampons de lyse pour les bactéries**

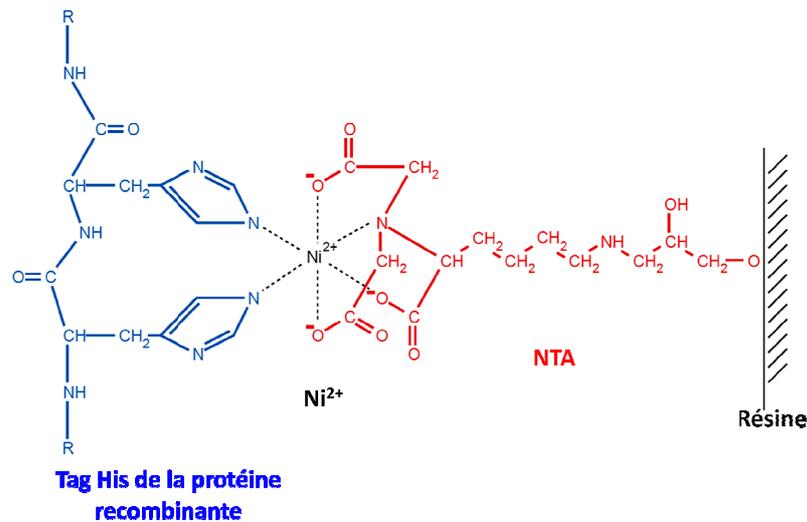
La solution d'imidazole 20 (20 mM imidazole; 20 mM Tris/HCl pH 7,9 ; 0,5 M NaCl et 10% Glycérol) est utilisée pour les purifications de protéines étiquetées His et le PBS 1X pour les protéines étiquetées GST

#### ✓ Purification des protéines étiquetées GST

Le surnageant de l'ultracentrifugation est incubé 2 h à 4°C sous agitation en présence de billes d'agarose couplées au glutathion resuspendu à 50 % (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey Nagel). Les billes sont ensuite centrifugées à 600 g pendant 3 min, lavées une fois avec 10 ml d'un tampon PBS-triton 0.05% puis deux fois avec 10 mL de PBS. Les billes GST-protéines ainsi obtenues peuvent être utilisées telles quelles, la protéine recombinante peut également être éluées par compétition avec du glutathion réduit (tampon 10 mM glutathion réduit, 50 mM Tris-HCl, pH9.5).

#### ✓ Purification par chromatographie d'affinité (FPLC) des protéines étiquetées His

Le principe de cette chromatographie d'affinité repose sur la propriété de fixation des histidines sur des ions métalliques comme le nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). L'étiquette 6-histidine présente sur les protéines recombinantes est donc capable d'interagir fortement avec les ions  $\text{Ni}^{2+}$ . Cette propriété est utilisée pour fixer de manière très spécifique les protéines sur une résine chromatographique sur laquelle est chélaté le  $\text{Ni}^{2+}$  via l'acide nitriloacétique (NTA). Ce dernier complexe fortement le  $\text{Ni}^{2+}$  qui garde 2 sites accessibles pouvant être occupés par les histidines de la protéine recombinante (figure 33).



**Figure 33: Interaction entre les résidus histidines de l'étiquette 6-His et une matrice Ni-NTA**

La purification des protéines est réalisée sur une colonne d'affinité Ni-NTA (His-Trap HP, 1ml ; GE healthcare) grâce au système HPLC/FPLC *Äkta purifier* (GE healthcare) comportant différents modules (pompes, spectrophotomètre UV, mélangeurs) synchronisés entre eux et automatisés, avec en série un collecteur de fractions (figure 32). La FPLC (Fast protein liquid chromatography) est un type de chromatographie liquide où la pression des tampons est contrôlée par des pompes pour maintenir un débit constant. Elle diffère de la HPLC (high performance liquid chromatography) par les valeurs de pression de solvant utilisées au niveau des colonnes qui restent inférieures à 3 MPa. Les protocoles de purification sont programmés via le logiciel UNICORN et peuvent varier suivant la protéine à purifier. Ils contiennent des étapes d'équilibration de la colonne, d'injection du surnageant, de lavages et d'éluion des protéines dans différentes fractions suivant un gradient croissant et non linéaire d'imidazole. L'imidazole déplace la protéine fixée sur le nickel par compétition.

Deux solutions d'imidazole sont utilisées contenant 20 mM et 1 M d'imidazole respectivement, 20 mM de Tris/HCl pH 7,9 ; 0,5 M NaCl et 10% Glycérol. Le surnageant obtenu après lyse des bactéries exprimant la protéine d'intérêt est directement injecté sur la colonne d'affinité via une boucle de 10 mL. La présence de protéines dans les différentes fractions éluées est détectée par mesure de la DO à 280 nm à l'aide du spectrophotomètre placé en sortie de colonne. D'autres longueurs d'ondes peuvent être suivies, notamment à 214 et 220 nm (absorption de la liaison peptidique spécifiquement) et à 254 nm (suivi des contaminations en acides nucléiques).

## **2.4 Synthèse de protéine in vitro (traduction in vitro)**

Certaines protéines ont été produites par traduction in vitro dans un système acellulaire. Pour cela, un kit de synthèse in vitro utilisant des lysats de cellules d'insectes a été utilisé (EasyXpress Insect Kit II, Qiagen). Les protocoles fournis avec le kit ont été suivis.

Les lysats de cellules d'insectes contiennent tous les composants de la machinerie traductionnelle (ribosomes, facteurs ribosomiaux, ARNs de transfert, aminoacyl-ARNt synthétases, etc.) nécessaire pour synthétiser une protéine fonctionnelle. Ils contiennent aussi l'ensemble des facteurs dont l'activité est nécessaire pour la réalisation des modifications post-traductionnelles des protéines eucaryotes, y compris pour protéines membranaires. Il s'agit d'un système couplé dans lequel l'ARNm est produit par transcription in vitro à partir d'un ADN plasmidique circulaire ou linéaire d'intérêt, puis utilisé comme matrice pour l'étape de traduction.

Ce système permet la synthèse de protéines radiomarquées spécifiquement en complétant le milieu réactionnel de traduction avec un acide aminé marqué. Dans notre cas, nous avons utilisé la méthionine marquée au soufre 35 ( $^{35}\text{S}$ ).

Pour les expériences de pull-down impliquant des protéines traduites in vitro et non marquées, nous avons travaillé directement avec le mélange réactionnel contenant la protéine traduite sans étape de purification préalable. Pour les expériences de pull-down dans lesquelles une protéine marquée au  $^{35}\text{S}$  est utilisée, le mélange réactionnel est d'abord purifié par chromatographie d'exclusion sur colonne NAP-10 (Amersham) pour éliminer les molécules de méthionine- $^{35}\text{S}$  libres. Ce type de pull-down est ensuite analysé par comptage de la radioactivité émise par la méthionine- $^{35}\text{S}$ . Les billes sont lavées, puis du liquide à scintillation est ajouté avant le comptage sur un compteur à scintillations.

## **3. Obtention des peptides biotinylés**

Les différents peptides présentés dans ce manuscrit ont été synthétisés au laboratoire par synthèse peptidique en phase solide à l'aide d'un synthétiseur automatique de dernière génération (synthétiseur micro-ondes CEM) en utilisant le protocole standard « Fast-Moc ». Tous ces peptides ont été biotinylés par ajout d'une lysine biotinylée à l'extrémité N-terminal. Cette modification va permettre de fixer les différents peptides sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine.

Ces synthèses sont initiées par l'extrémité C-terminale du peptide considéré puis étendues jusqu'à son extrémité N-terminale. Les fonctions réactives des chaînes latérales des acides aminés sont protégées par des groupements protecteurs adéquats. La synthèse totale du peptide est réalisée

en cycles comprenant plusieurs étapes. Chacun d'entre eux correspond à l'introduction d'un nouvel acide aminé à coupler. Ils sont répétés jusqu'à l'obtention de l'oligopeptide cible dont les fonctions réactives restent protégées.

Le peptide obtenu est ensuite déprotégé et clivé de la résine en milieu acide (*acide Trifluoroacétique*, TFA) et en présence de divers protecteurs (eau, dithiothréitole, triisopropylsilane). Après filtration, le peptide est précipité dans de l'éther puis solubilisé dans un tampon de repliement (variable selon le peptide) pendant 72 heures. Le peptide est ensuite purifié par chromatographie en phase inverse (colonne C18, Vydac) sur un système HPLC semi-préparatif (High Performance Liquid Chromatography) (*Äkta purifier*, Amersham). Une fois purifié le peptide est quantifié et lyophilisé.

## 4. Techniques de mesure des interactions protéines/protéines

### 4.1 La co-précipitation sur billes ou « Pull-down »

**Principe** (figure 34): La technique de co-précipitation (ou « pull-down ») permet de mettre en évidence, *in vitro*, une interaction physique entre deux protéines ou domaines protéiques. Cette technique est basée sur les mêmes principes que la chromatographie d'affinité. Elle consiste à immobiliser une protéine ou un peptide cible *via* une étiquette (His, GST, ou biotine) sur une matrice mobile (billes). La matrice ainsi créée est dite d'affinité spécifique. Elle sera mise en présence d'un partenaire protéique potentiel en solution qui pourra interagir avec la protéine immobilisée. Après incubation, les billes sont récupérées par centrifugation et lavées. Les complexes protéiques retenus sur les billes sont élués et analysés par western blot avec des anticorps spécifiques de la protéine soluble utilisée.

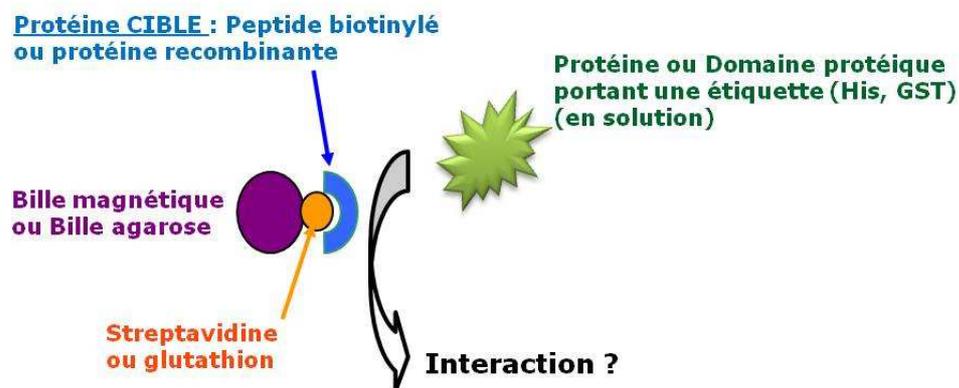


Figure 34: Principe de la co-précipitation sur bille ou « pull-down »

Pour les expériences de « pull-down » présentées dans ce manuscrit, deux types de billes ont été utilisées : les billes d'agarose couplées au glutathion (Protino Glutathione Agarose 4B, Macherey Nagel) pour les expériences impliquant l'immobilisation de protéines étiquetées GST, et des billes magnétiques en polystyrène recouvertes de streptavidine (Dynabeads M280 Streptavidine, Dnal) pour les expériences impliquant l'immobilisation de peptides biotinylés.

**Protocole :** Toutes les solutions utilisées sont maintenues à 4°C. Les protocoles décrits ci-dessous correspondent aux expériences de pull-down présentées dans la partie « Résultats » de ce manuscrit. Même si les principales étapes restent les mêmes, les conditions d'incubation et de lavage, la nature des tampons ainsi que les durées d'incubation varient beaucoup suivant les protéines et sont très empiriques.

- ✓ **Pull down avec les billes agarose glutathion :** Les billes sont d'abord lavées 3 fois avec 1 mL de PBS 1X et préparées de manière à obtenir une suspension à 50 % de billes (50% S) selon le protocole fourni avec les billes. 50 µL à 100 µL de billes 50 % S sont utilisées par condition. Elles sont ensuite recouvertes avec la protéine cible étiquetée avec la GST par incubation pendant 2 heures à 4 °C (NB : pour certaines expériences, les billes ayant servi à la purification de la protéine sont directement utilisées, pour d'autres les protéines sont éluées des billes, puis ré-incubées avec de nouvelles billes). Les billes GST-protéines sont lavées avec 1 ml de PBS froid et incubées dans un volume final de 500 µL dans un tampon de saturation (PBS 1X contenant de la BSA 1 mg/ml et des inhibiteurs de protéases) pendant 1 h à 4°C. Ensuite, suivant les expériences, différentes concentrations de protéines (partenaires potentiel) sont ajoutées. L'incubation entre les billes-protéines et les protéines en solution dure 3 heures à 4°C. Plusieurs contrôles négatifs sont ajoutés à chaque expérience, souvent il s'agit d'un contrôle avec des billes nues ou recouvertes seulement de GST ou avec des billes recouvertes d'une protéine tierce qui n'interagit pas avec la protéine cible. Après l'incubation, les billes sont récupérées par centrifugation 2 min à 600 g, puis lavées 3 fois : 2 fois avec 1 mL d'un tampon de lavage (PBS 1X, Tween 0,1%) et 1 fois avec du PBS 1X. L'éluat des complexes protéiques formés sur les billes se fait avec 30 µl de tampon dénaturant 2X. L'éluat est ensuite déposé sur un gel SDS-PAGE et analysé par western blot avec des anticorps spécifiques.
- ✓ **Pull down avec les billes magnétiques streptavidine :**(50 µl par condition) Les billes sont lavées 2 fois avec 1 ml de PBS 1X, puis incubées avec le peptide biotinylé d'intérêt dans un tampon de saturation (PBS 1X, BSA 1 mg/mL) pendant 30 minutes à température ambiante.

Après 2 lavages avec 1ml de PBS 1X froid, pour éliminer les peptides non fixés, les billes sont incubées 3 heures à 4°C avec le partenaire protéique supposé. Finalement, les complexes protéiques formés sont lavés, élués et analysés comme précédemment.

## **4.2 Co-immunoprécipitation de complexes protéiques**

**Principe :** Comme le « pull down », cette technique permet de déterminer des interactions protéine/protéine. Elle consiste à purifier, à partir d'un extrait cellulaire (lysate contenant la protéine d'intérêt solubilisée), une protéine d'intérêt et ses partenaires. L'extrait cellulaire contenant une protéine Y ou possédant un étiquette Y est incubé avec des billes qui servent de matrice sur laquelle on peut adsorber des anticorps anti-Y. On peut donc spécifiquement précipiter la protéine Y ou une protéine cible via son étiquette Y ainsi que ses partenaires protéiques potentiels. Cette approche permet de tester des interactions protéines/protéines in vivo.

Ce type d'expérience de co-immunoprécipitation a été utilisé pour étudier les interactions de la cavéoline 3 avec le DHPR et les boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  (voir article en annexe 2 pour les détails expérimentaux)

## **5. Préparation de vésicules de RS et mesure de la liaison de ryanodine**

### **5.1 Préparation des vésicules de RS (ou vésicules de HSR)**

Le RyR étant un complexe très difficilement exprimé dans un système bactérien ou de levure, il a directement été purifié à partir de fibres musculaires de lapin. Ce protocole consiste à préparer des vésicules membranaires de réticulum sarcoplasmique enrichies en RyR1, appelées HSR (Heavy Sarcoplasmic Reticulum). Pour cela, les fibres musculaires sont solubilisées en présence de détergents et de lipides pour former des micelles, puis purifiées par centrifugation sur gradient de sucrose.

Environ 100 g de muscle sont broyés à pH 7 dans 400 mL d'eau puis centrifugés 8 minutes à 9500 g, on obtient alors un surnageant qui est filtré puis ajusté à 1M NaCl avant d'être incubé pendant une heure à 4°C sous agitation. Après une seconde centrifugation de 40 minutes à 10500 g, les culots sont repris dans le tampon I (Tableau IX). La solution obtenue est homogénéisée avant une 3ème centrifugation de 40 minutes à 17400 g. Les culots sont ensuite resuspendus dans le

tampon II, puis homogénéisés et centrifugés une dernière fois pendant 40 minutes à 17400 g. Enfin, les derniers culots sont resuspendus dans un volume maximal de 10 ml de tampon II avant d'être congelés dans de l'azote liquide.

Tampon I	Tampon II
20 mM Pipes	
150 mM KCl	
0,3 M sucrose	
2,5 mM EGTA	
Inhibiteur de protéases (Complete, Roche)	
Solution ajustée à pH 7,1	

**Tableau IX: Solutions utilisées pour la préparation des vésicules de HSR**

## **5.2 Liaison de ryanodine sur les HSR**

Les états fonctionnels du RyR peuvent être caractérisés par des changements dans la capacité et/ou la cinétique de fixation de la ryanodine tritiée (Ry-<sup>3</sup>H) (Voir paragraphe 2.1.3.2, sur la pharmacologie du RyR). La mesure de la liaison de Ry-<sup>3</sup>H sur les RyRs est un outil largement utilisé pour étudier l'état d'activation ou d'inactivation du RyR. On peut donc étudier l'influence de divers facteurs (protéine, peptide...) sur les RyRs présents dans les HSR en mesurant la liaison de Ry-<sup>3</sup>H en présence de ces derniers.

Les vésicules de HSR sont incubées en présence de 3 nM de Ry-<sup>3</sup>H (Perkin elmer), de 50 nM de ryanodine froide (Latoxan) et du peptide ou de la protéine à tester (à des concentrations variables) dans une solution tampon (150 mM KCl, 20 mM MOPS, 2 mM EGTA, et 2 mM CaCl<sub>2</sub> à pH 7,4) à un volume final de 300 µL. Pour pouvoir mesurer et soustraire la liaison non spécifique (sur les vésicules et/ou sur le filtre) de ryanodine, on ajoute un large excès de ryanodine froide à une des conditions (80 µM). Après 2 heures d'incubation à 37°C, les vésicules de HSR sont déposées par filtration sur un filtre en nitrocellulose (Filtres Millipores, 0,65µM) qui sont ensuite lavés 3 fois avec 5 ml d'un tampon de lavage froid (150 mM KCl et 20 mM MOPS, à pH 7,4). Les filtres sont ensuite recouverts de 10 mL de liquide à scintillation. Les liquides scintillants sont des transformateurs de rayonnements ionisants en énergie lumineuse détectable par un compteur à scintillations et proportionnelle au nombre de photons produits. La quantité de Ry-<sup>3</sup>H lié aux RyRs présents sur les HSR immobilisés dans les filtres, est mesurée à l'aide d'un compteur de scintillation liquide (Beckman LS 6000 SC). Chaque condition est réalisée en duplicate ou triplicate. Les valeurs sont données en nombre de coups par minute.

## 6. Culture primaire, transfection et imagerie calcique sur des myotubes de souris transgéniques

À partir des différentes lignées de souris transgéniques (RyR null,  $\beta$ 1a null et  $\alpha$ 1S null) que nous maintenons au laboratoire, nous avons pu mettre en place des cultures de myotubes primaires. En croisant les souris hétérozygotes pour chaque mutation, il est possible d'obtenir des embryons homozygotes. À partir de ces derniers, des cultures primaires de myotubes n'exprimant pas, soit le RyR (dyspédiques), soit la sous-unité  $\beta$ 1a, soit la sous-unité  $\alpha$ 1S (dysgénique) sont réalisées. Ces myotubes peuvent être transfectés avec l'ADNc codant les protéines manquantes. On peut ainsi étudier les canaux ioniques (RyR, DHPR) normaux ou mutés directement exprimés dans des cellules de mammifères.

### **6.1 Protocole de préparation des cultures de myotubes**

- Toutes les solutions sont préalablement chauffées à 37°C et les manipulations sont réalisées en zone stérile.
- Les boîtes de cultures de 35 mm qui serviront à mettre en culture les myotubes sont préparées en amont : 1 mL d'une solution de gélatine (gélatine 1% dans de l'eau) est déposé sur chaque boîte. Après 2 heures d'incubation, l'excès de gélatine est retiré à l'aide d'une pipette.
- Les femelles gestantes sont tuées au 18<sup>ème</sup> jour de gestation (E18) et les embryons sauvages et homozygotes (figure 35) sont récupérés et séparés dans une solution HBSS + P/S.
- Les membres antérieurs et postérieurs des embryons sont coupés puis déposés dans une solution HBSS + P/S. À cette étape, un fragment de queue ou un doigt est prélevé sur chaque embryon pour réaliser un génotypage qui permettra de confirmer le génotype jusque-là déterminé sur des critères purement phénotypiques (figure 35).
- Sous une loupe binoculaire, on procède à la dissection des membres : la peau, les doigts, les os et tous les tissus non musculaires sont retirés. Le tissu musculaire est récupéré et coupé finement à l'aide de pinces.
- Le tissu musculaire est ensuite incubé 30 minutes à 37°C dans la solution de digestion et resuspendu toutes les 10 minutes (environ 10 mL de solution pour 4 à 6 embryons). (Tableau X).
- On procède ensuite à une dissociation mécanique des tissus en les remettant en suspension à l'aide d'une pipette de 10 mL. Une trentaine d'aller-retour suffisent généralement pour une bonne dissociation mais il est possible de remettre la suspension à digérer à 37°C pendant 10 minutes s' il reste des agrégats de tissus.

- La digestion enzymatique est stoppée par ajout de 1 volume de milieu de prolifération à la solution de digestion (tableau X).
- La solution obtenue est filtrée sur une compresse de gaz stérile puis centrifugée 5 minutes à 1500 rpm.
- Le culot contenant les cellules est resuspendu dans 10 mL de milieu de prolifération.
- La solution est déposée sur une boîte de culture (de diamètre 10 cm) et mise à l'incubateur à cellules pendant 15 minutes. Cette étape dite de « pré-plating » sert à diminuer la contamination de la culture par les fibroblastes en les faisant adhérer sur le plastique de la boîte de culture. Elle est répétée deux fois.
- Les cellules sont ensuite comptées sur une lame de « Malassez » puis ensemencées ( $5.10^4$  à  $1.10^5$  cellules par boîtes) sur des boîtes de culture de 35 mm de diamètre préalablement recouvertes de gélatine.
- Après 3 jours de cultures, le milieu de prolifération est remplacé par du milieu de différenciation.



Figure 35: Embryons de souris prélevés à E18

Milieu de prolifération	Milieu de différenciation	Solution de digestion
DMEM/ F-12	DMEM/ F-12	HBSS (sans $Ca^{2+}$ , sans $Mg^{2+}$ )
10 % Sérum de cheval (Horse Serum) (=HS)	10% HS	0,125 % Trypsine
2 % extrait d'embryon de poussin (Chick Embryo Extract) (=CEE)	1 % CEE	0,05 % Pancréatine
10 % Sérum de veau fœtal (=SVF)		1% P/S
0,1 % Antibiotiques (pénicilline/ streptomycine) (P/S)	0,1 % P/S	
Toutes les solutions sont chauffées à 37°C avant leur utilisation		

Tableau X: Solutions et milieux pour la culture primaire de myotubes

DMEM/F-12 = Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen)

HBSS = Hank's Balanced Salt Solution 1X (Invitrogen)

## **6.2 Protocole de transfection**

La transfection des myotubes est réalisée par magnétofection. La magnétofection est une méthode de transfection récemment développée, qui utilise un champ magnétique pour concentrer des nanoparticules contenant l'acide nucléique dans les cellules cibles. Cette méthode permet d'améliorer l'efficacité des agents de transfection traditionnels (lipides cationiques, polymères).

- L'agent de transfection TransIT-LT1 (Mirus) a été utilisé couplé aux nanoparticules magnétiques Combimag (OzBioscience).

- Le transit LT1 est chauffé à température ambiante. Pour chaque transfection, 10 µL de transit LT1 préalablement vortexé est mélangé à 250 µL de milieu OPTIMEM (Invitrogen) à l'aide d'une pipette

- 2,5 µg de l'ADN à transférer sont ajoutés puis mélangés à l'aide d'une pipette.

- La solution ADN + agent de transfection est incubé 15 minutes à température ambiante.

- 3 µL de nanoparticules combimag sont ajoutés à chaque réaction puis mélangés à la pipette.

- Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, le mélange est déposé sur les cultures de myotubes dans les boîtes de 35 mm.

- Les boîtes sont ensuite déposées sur une plaque magnétique puis incubées 15 minutes à 37°C dans l'incubateur à cellules.

- La plaque magnétique est retirée et les boîtes de cultures transfectées sont laissées 2 heures à 37 °C dans l'incubateur.

- Après deux lavages avec 2 mL de milieu de différenciation (tableau X). Les cellules sont remises à l'incubateur dans du milieu de différenciation.

- 2 à 4 jours après la transfection, les cellules peuvent être utilisées.

## **6.3 Imagerie calcique sur les myotubes.**

Les expériences d'imageries calciques permettent de suivre les variations de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules en fonction du temps. Sur les myotubes, on peut suivre les transitoires calciques. Cette technique consiste à incuber les cellules dans une solution saline (tampon de Krebs) contenant une sonde calcique, le Fluo -4AM (Invitrogen). Le Fluo-4AM un dérivé acéto-méthylester du Fluo4 obtenu par estérification. Cette sonde n'étant pas polaire, elle peut donc pénétrer dans les cellules à travers la membrane plasmique. Sous cette forme AM, elle ne peut pas fluorescer et n'est pas sensible au calcium, mais une fois dans le cytoplasme, les groupes esters sont clivés par des estérases intracellulaires. Le Fluo4 est ainsi piégé dans le cytoplasme et devient sensible au  $\text{Ca}^{2+}$ . La

composition du tampon de Krebs est la suivante: 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM Hepes, pH 7.4.

- Les myotubes sont d'abord incubés pendant 1 heure dans une solution de Krebs contenant 0.05% BSA et 5 μM de Fluo-4AM (invitrogen). Ils sont chargés en Fluo4.
- Les myotubes sont lavés 3 fois avec la solution de Krebs.
- Ils sont ensuite incubés pendant 1 heure dans la solution de Krebs. Cette incubation permet la dé-estérification du Fluo-4AM dans les cellules. Lorsque les myotubes sont incubés en présence de M<sub>Ca</sub>, cette dernière est ajoutée à cette étape.
- Après trois lavages avec la solution de Krebs, les mesures des transitoires calciques sont effectuées à l'aide d'un microscope couplé à une caméra CCD (« *charge coupled device* »). Ce type de caméra assure la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique. Les myotubes sont dépolarisés par perfusion dans le milieu d'un flux continu d'une solution de KCl (140 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, et 10 mM, pH 7.4).

## 7. Étude des canaux ioniques par expression dans un système hétérologue

Les relations structures-fonctions et les propriétés biophysiques des canaux ioniques peuvent également être étudiées en les exprimant dans un système hétérologue. L'ovocyte de la grenouille *Xenopus laevis* est largement utilisé. Ce système est capable de traduire un ARNc pour produire une protéine fonctionnelle. Les principales étapes de l'étude des canaux ioniques exprimés en ovocytes de xénope sont résumées dans la figure 36.

### 7.1 Protocole de préparation des ovocytes

- La femelle Xénope est anesthésiée dans une solution de tricaine méthanesulfonate (MS-222, 1g/L) pendant environ 15 minutes puis positionnée en décubitus dorsal sur une couche de glace.
- Une petite incision d'environ 10 mm est réalisée dans la zone iliaque pour accéder à l'ovaire où les ovocytes sont retirés par lobes de plusieurs centaines d'ovocytes et plongés dans la solution Barth Ca<sup>2+</sup> (tableau XI). Les ovocytes sont manipulés à température ambiante.
- Le plan musculaire et la peau incisés sont recousus puis l'animal est mis dans un bac provisoire jusqu'à son réveil complet en veillant à ce qu'il ne soit pas recouvert d'eau.

- Les lobes d'ovocytes prélevés sont rincés 3 fois dans 15 mL de barth sans  $\text{Ca}^{2+}$  puis individualisés avec des ciseaux fins.

- Les ovocytes subissent ensuite une digestion enzymatique par la collagénase (collagénase IA 2 mg/ml, Sigma) pendant 1 à 2h à température ambiante pour éliminer le tissu conjonctif et séparer chaque ovocyte de son enveloppe de cellules folliculaires (membrane vitelline).

- Les œufs sont lavés 4 à 6 fois avec la solution de Barth sans  $\text{Ca}^{2+}$  pour éliminer toutes traces de collagénase.

- On procède ensuite au tri des ovocytes sous loupe binoculaire. Seuls les ovocytes de stade V et VI sont gardés (généralement les plus gros). Ils sont ensuite conservés à 18°C dans un milieu nutritif, le DNOM (« Defined Nutrient Oocyte Medium ») dans lequel leurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques peuvent être maintenues pendant des périodes pouvant aller jusqu'à 3 semaines (voir (Eppig & Dumont, 1976) pour le protocole de préparation du DNOM).

- Le lendemain, les œufs sont de nouveau triés pour éliminer les ovocytes morts. Il est conseillé de n'utiliser les ovocytes que le lendemain de leur prélèvement, même s'ils peuvent être injectés avec l'ARN d'intérêt dès le soir du prélèvement.

## **7.2 Transcription de l'ADN et injection des ovocytes**

- Pour éviter toute dégradation, il est important que l'ensemble des étapes impliquant l'ADN et l'ARN soient réalisées en conditions « RNase, DNase free ». Il faut donc soigneusement nettoyer le matériel utilisé et la paillasse avant chaque manipulation.

- L'ADNc d'intérêt est d'abord linéarisé et resuspendu dans de l'eau ultrapure à 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Il est ensuite transcrit à l'aide du kit « mMessage mMachine T7 ou SP6 » (Ambion). Le protocole du Kit est suivi.

- L'ARN obtenu est resuspendu à 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Il peut être conservé sous forme d'aliqots à -80°C pour limiter la dégradation s'il n'est pas utilisé immédiatement.

- Les ovocytes sont injectés avec 50 nL d'ARN (à des concentrations entre 0,1 et 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) à l'aide d'un micro-injecteur et de fins capillaires stériles étirés et coupés à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre.

- Pour l'injection, les ovocytes sont déposés sur une grille dans du barth  $\text{Ca}^{2+}$ . Une cinquantaine d'ovocytes sont injectés pour chaque condition.

- Après l'injection, les ovocytes sont conservés à 18°C dans du DNOM.

- Les canaux ioniques sont exprimés et des courants sont mesurables parfois dès le lendemain, mais selon les cas, on peut attendre jusqu'à 3 jours après l'injection pour pouvoir commencer les mesures.

Solution Stock A	Stock calcium B	Solution d'antibiotique	Solution Barth Ca <sup>2+</sup> (pour 500 mL)	Solution Barth sans Ca <sup>2+</sup> (pour 500 mL)
NaCl 128 g/L KCl 2 g/L NaHCO <sub>3</sub> 5 g/L MgSO <sub>4</sub> 5 g/L HEPES 89 g/L	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 1,9 g/L CaCl <sub>2</sub> 1,15 g/L	Gentamycine 5mg/mL  Ou Pénicilline/ streptomycine 100%	20 mL solution stock A 20 mL stock Ca <sup>2+</sup> B 5 ml de solution d'antibiotique Eau distillée qsp 500 mL	20 mL solution stock A 5 mL solution d'antibiotique Eau distillée qsp 500 mL
Solutions aliquotées et conservées à -20°C			ajuster à pH 7,4 avec du Tris 2M pH 8 Solutions conservées à 4°C	

Tableau XI: Solutions utilisées pour la préparation des ovocytes de xénopes

### **7.3 Enregistrement des courants en double électrode**

La taille trop importante de l'ovocyte de Xénope (1,2 à 1,5 mm de diamètre) ne permet pas l'étude des courants macroscopiques par les techniques habituelles de patch clamp. C'est la raison pour laquelle ces courants sont enregistrés par la technique de double électrode ou TEVC (Two Electrode Voltage Clamp) à l'aide d'un amplificateur GeneClamp 500 (Axon Instruments). Les courants sont mesurés grâce à deux microélectrodes insérées dans la membrane de l'ovocyte. La première maintient le potentiel de membrane (V<sub>m</sub>) à une valeur constante imposée par l'expérimentateur (V<sub>ref</sub>) et la seconde électrode permet de mesurer l'intensité du courant obtenu en réponse (figure 36). Le courant mesuré correspond à l'ensemble des canaux de la membrane de l'ovocyte.

#### Conditions expérimentales :

- Les microélectrodes de mesure sont composées de micropipettes (diamètre de l'ordre du µm) réalisées en étirant des tubes capillaires de borosilicate (Mikro Hematokrit) dans lesquels sont plongés des filaments d'argent recouvert de chlorure d'argent. Ces filaments permettent de convertir un courant d'ions en solution en un courant d'électrons.

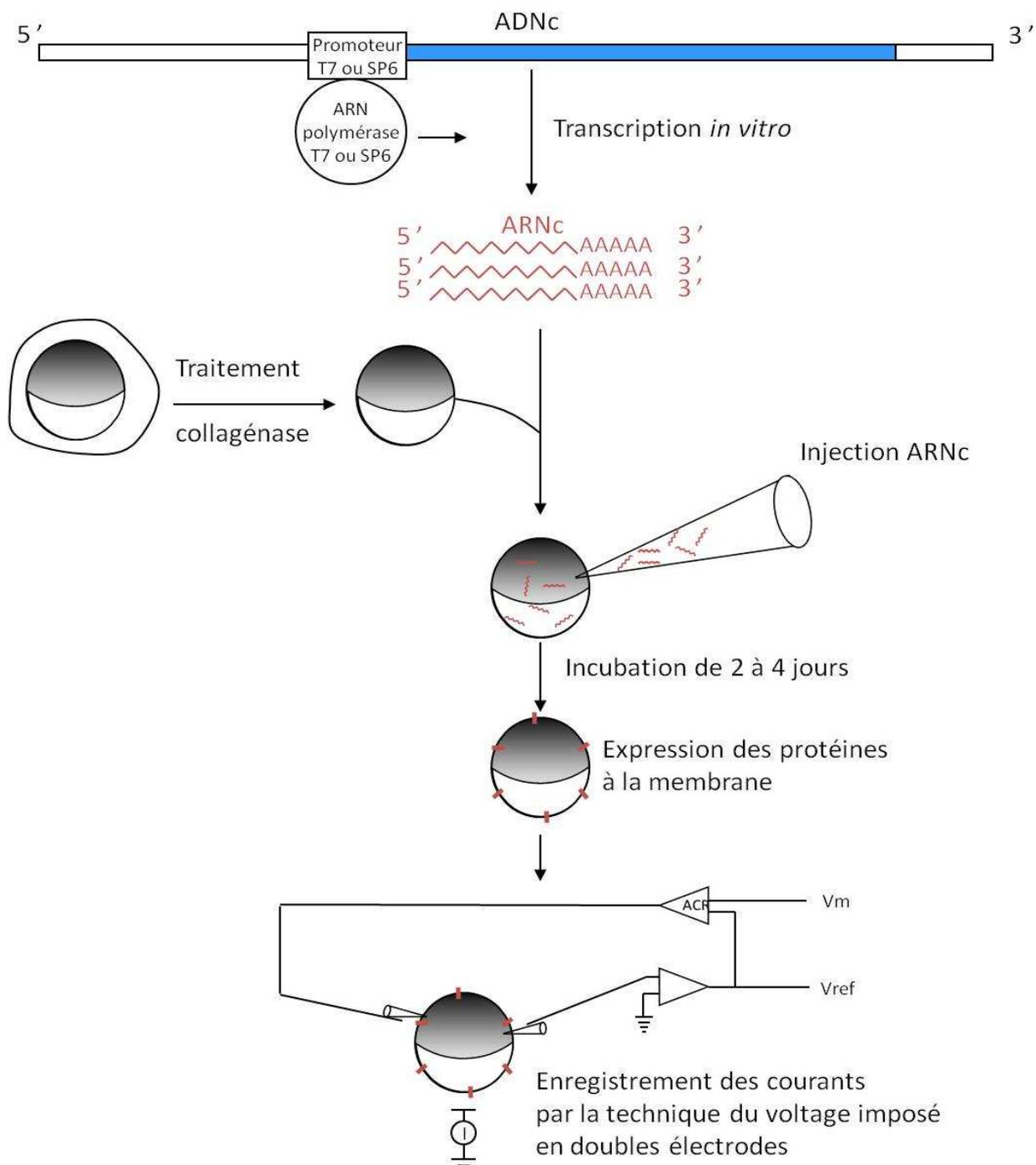
- Les micropipettes sont remplies (environ à la moitié de leur longueur) par une solution ionique conductrice (KCl 3M, milieu intrapipette).

- L'ovocyte est placé dans une chambre d'enregistrement d'environ 250  $\mu$ L contenant le milieu d'enregistrement (tableau XII). Un système de perfusion permet de faire varier la composition de ce milieu. On peut ainsi injecter des activateurs ou des inhibiteurs des canaux ioniques et mesurer leurs effets sur les courants.

- L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées à l'aide du logiciel pClamp (Axon Instruments). Le programme utilisé permet d'imposer et de faire varier les potentiels imposés sur des durées variables.

Milieu intrapipette	Milieu d'enregistrement (en mM)
KCl 3 M	Ba(OH) <sub>2</sub> 40 NaOH 50 KCl 3 HEPES 10 Acide niflumic 0.5 Ajustée à pH 7.4 avec de l'acide méthane sulfonique

**Tableau XII: Solutions utilisées pour l'enregistrement de courants calciums sur ovocytes de xénope en doubles électrodes**



**Figure 36: Les différentes étapes de l'étude de canaux ioniques exprimés dans l'ovocyte de xénope**

Tirée de Sandoz, 2003 (thèse)

L'ovocyte est placé dans une chambre d'enregistrement sous une loupe binoculaire et deux microélectrodes sont délicatement insérées dans la membrane en utilisant des micromanipulateurs. Le potentiel imposé (ou "Voltage Clamp") consiste à maintenir le potentiel de membrane ( $V_m$ ) à une valeur constante et imposée par l'expérimentateur ( $V_{ref}$ ). Pour cela, un amplificateur à contre-réaction (ACR) délivre un courant ( $I$ ) égal et de sens opposés au courant ionique transmembranaire et tendant à annuler la différence ( $V_{ref}-V_m$ ). Une électrode est utilisée pour imposer différents potentiels transmembranaires à l'ovocyte, l'autre permet de mesurer le potentiel interne de l'ovocyte (elle mesure l'intensité du courant résultant).



## RESULTATS ET DISCUSSION



# RESULTATS ET DISCUSSION

## OBJECTIFS

Les déterminants moléculaires et structuraux de l'interaction DHPR/RyR sont encore mal connus. Les interactions, identifiées à ce jour, entre les protéines formant le complexe de mobilisation du calcium ne permettent pas de dresser un schéma clair de la séquence des évènements moléculaire permettant le couplage entre le DHPR et le RyR. Les différentes données accumulées suggèrent que la mise en place et la régulation de ce couplage dans la fibre musculaire squelettique nécessitent de multiples interactions, entre les domaines cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1$ , la sous-unité  $\beta 1a$  et RyR1. Nous savons aussi que d'autres protéines, identifiées ou non, participent à la régulation de ce processus.

L'objectif de mon travail de thèse a donc été d'identifier et de caractériser de nouveaux déterminants structuraux du couplage DHPR/RyR1. J'ai travaillé selon 3 axes complémentaires se focalisant chacun sur un des intervenants du couplage DHPR/RyR1:

- ✓ (1) **la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR** : étude des interactions intramoléculaires au sein de la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR, notamment entre les différentes boucles cytoplasmiques. Caractérisation d'un nouveau partenaire protéique du DHPR, la cavéoline-3 (CAV-3).
- ✓ (2) **la sous-unité  $\beta 1a$  du DHPR** : étude de l'effet de la sous-unité  $\alpha 1S$  sur l'interaction de la sous-unité  $\beta 1a$  avec RyR1 et caractérisation d'un domaine de la sous-unité  $\beta 1a$  impliqué dans son interaction avec RyR1.
- ✓ (3) **RyR1**:
  - Définition d'un domaine minimal du RyR1 correspondant au site d'interaction du RyR1 avec le domaine A de la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR et avec la MCa. Je présente les premiers résultats de l'étude structurale par RMN de ce domaine.
  - Caractérisation de l'effet de la MCa sur RyR1 dans des myotubes dysgéniques.
  - Caractérisation de l'effet de l'isoforme D de la MCa (MCa-D) sur RyR1.

Ces travaux ont nécessité le clonage, l'expression dans des bactéries et la purification de nombreuses protéines, ou domaine de protéines. Plusieurs approches biochimiques telles que la co-précipitation m'ont permis l'étude *in vitro* des interactions entre ces différentes protéines. J'ai également utilisé des approches basées sur l'expression de protéines dans des myotubes en culture

afin d'aborder le rôle fonctionnel de ces interactions. Enfin, une étude structurale d'une de ces interactions a pu être initiée.

# 1. INTERACTIONS AU SEIN DE LA SOUS-UNITÉ $\alpha$ 1S DU DHPR

## Introduction

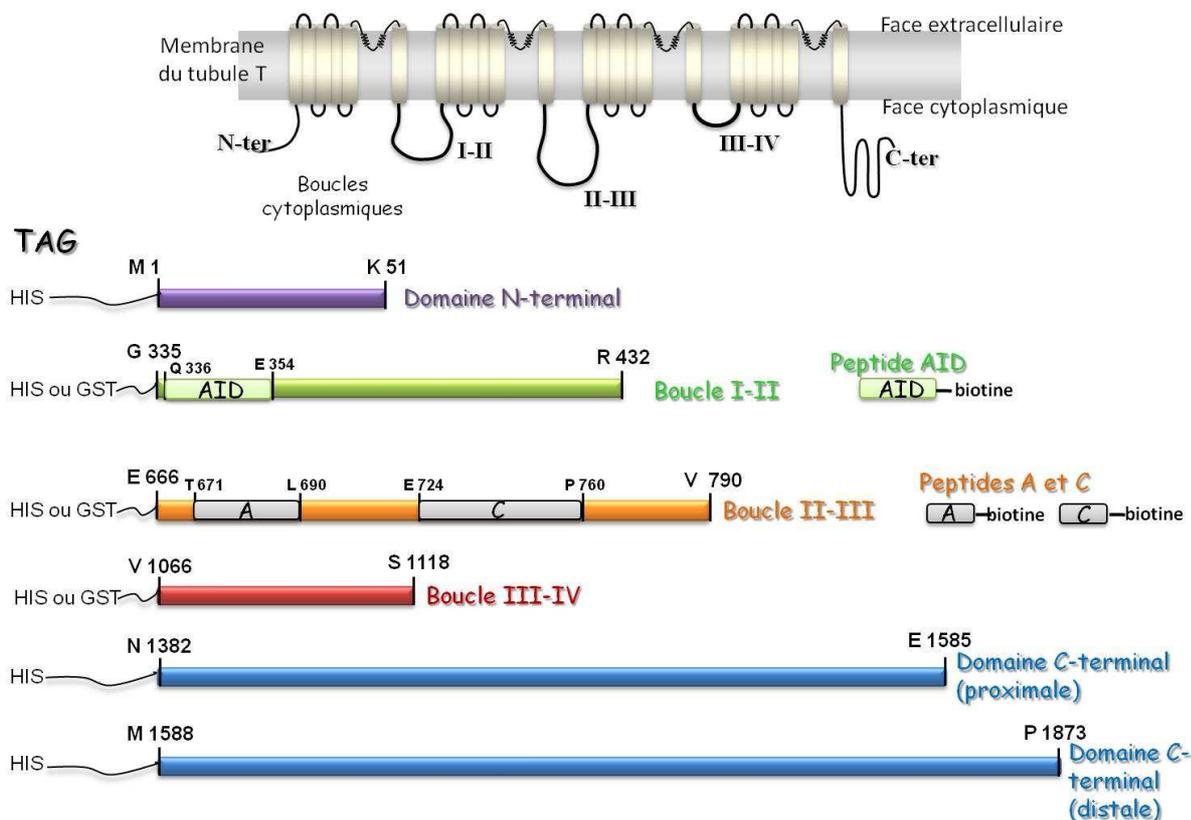
Comme je le rappelle en détail au paragraphe 3.1 de la partie introduction de ce manuscrit, de nombreuses études ont démontré l'interaction physique et fonctionnelle de la sous-unité  $\alpha$ 1S du DHPR avec le RyR1 et en particulier l'importance de la boucle II-III dans cette interaction. Cependant, l'ensemble des domaines cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha$ 1S contribue à l'obtention d'un couplage DHPR/RyR1 complet et fonctionnel. Différents résultats suggèrent par ailleurs que les boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha$ 1S interagissent les unes avec les autres. Ces interactions intramoléculaires représentent sans doute un élément important de régulation des propriétés de canal calcique du DHPR, mais également du couplage fonctionnel entre DHPR et RyR1. De même, des interactions entre d'autres protéines et la sous-unité  $\alpha$ 1S peuvent réguler son fonctionnement et ainsi participer directement ou indirectement à la régulation du processus de couplage DHPR/RyR1. Dans ce cadre, nous avons choisi d'étudier l'interaction et le rôle de la cavéoline 3 (Cav-3), une protéine dont la mutation est responsable d'une forme de dystrophie musculaire des ceintures et dont l'interaction fonctionnelle avec le DHPR a déjà été démontrée.

Les principaux objectifs de cette étude étaient: 1) d'établir une carte des interactions entre les différents domaines cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha$ 1 du DHPR; 2) d'étudier le rôle fonctionnel de ces interactions en exprimant dans un système hétérologue la sous-unité  $\alpha$ 1 ; 3) d'identifier et de caractériser l'interaction de la sous-unité  $\alpha$ 1S avec la Cav-3.

### 1.1 Interactions inter-boucles au sein de la sous-unité $\alpha$ 1S

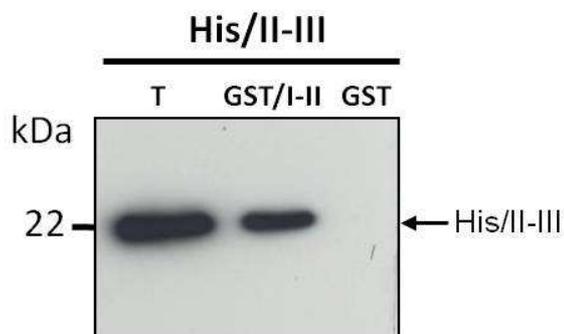
La première étape de mon travail a consisté à cloner les différents domaines de la sous-unité  $\alpha$ 1S, puis à les exprimer sous forme de protéines recombinantes en fusion avec la protéine GST ou une étiquette composée de 6 histidines (figure 37). J'ai ensuite utilisé ces protéines dans des expériences de co-précipitation pour tester les différentes interactions possibles entre ces domaines au sein de la sous-unité  $\alpha$ 1S. Pour ces expériences, la protéine recombinante, correspondant à un domaine, est étiquetée avec la protéine GST et immobilisée sur des billes. Ces billes sont alors

incubées avec la deuxième protéine recombinante portant elle une étiquette 6-His. Après lavage l'interaction entre les deux protéines est révélée par immunomarquage avec des anticorps anti histidine. La boucle II-III étant centrale dans le CEC, c'est sur cette dernière que j'ai concentré mes recherches.



**Figure 37: Schéma des protéines recombinantes utilisées au cours de l'étude des interactions au sein de la sous-unité  $\alpha 1S$**

La position relative du domaine AID sur la boucle I-II et des domaines A et C sur la boucle II-III est indiquée.

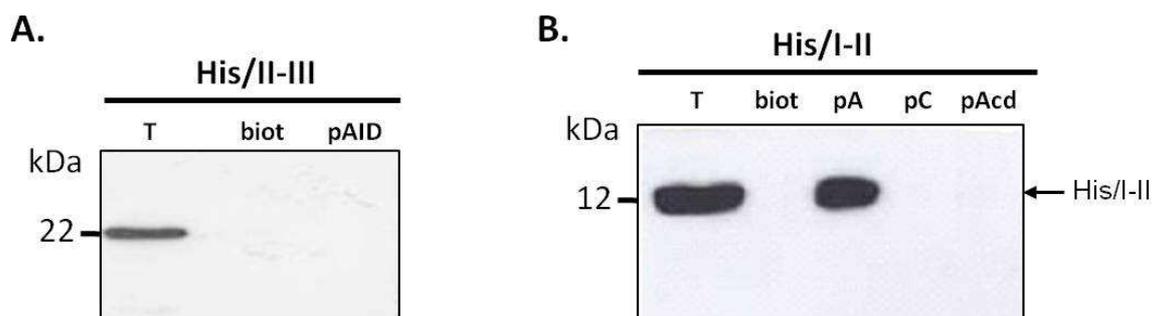


**Figure 38: Interaction des boucles I-II et II-III de la sous-unité  $\alpha 1S$** 

La boucle II-III purifiée sous la forme d'une protéine recombinante étiquetée His (His/II-III ; T quantité totale de His/II-III utilisée pour l'expérience) a été incubée avec des billes agarose glutathion recouvertes de protéine GST (contrôle négatif) ou de protéine recombinante GST/I-II. La présence de la protéine His/II-III est révélée avec par immuno marquage avec des anticorps anti His.

La figure 38 montre l'interaction de la protéine GST/I-II immobilisée sur des billes d'agarose glutathation, avec la protéine His/II-III en solution. Et comme l'indique la présence d'une bande correspondant à la protéine His/II-III, lorsque les billes sont recouvertes par la protéine GST/I-II, ces deux boucles de la sous-unité  $\alpha 1S$  interagissent entre elles. L'absence de bandes lorsque l'expérience est réalisée avec des billes recouvertes de GST seule démontre la spécificité de l'interaction.

J'ai ensuite voulu regarder plus précisément quels étaient les acides aminés sur les boucles I-II et II-III impliqués dans l'interaction. Comme je l'ai décrit au chapitre 3 de l'introduction on retrouve, sur chacune de ces boucles, différents domaines qui ont été identifiés comme jouant un rôle direct ou indirect dans le mécanisme du CEC. Le domaine AID, sur la boucle I-II représente le site de fixation principal de la sous-unité  $\beta 1a$  sur la sous-unité  $\alpha 1S$ . Les domaines A et C de la boucle II-III qui ont été décrits comme des domaines impliqués dans la régulation de l'interaction DHPR/RyR1. Une interaction directe du domaine A avec RyR1 a été identifiée. Des peptides correspondants à chacun de ces domaines, AID, A et C, ont été synthétisés sous une forme biotinylée (pAID, pA et pC respectivement) de manière à pouvoir être immobilisés sur des billes streptavidine et utilisés dans des expériences d'interaction avec les boucles I-II et II-III.

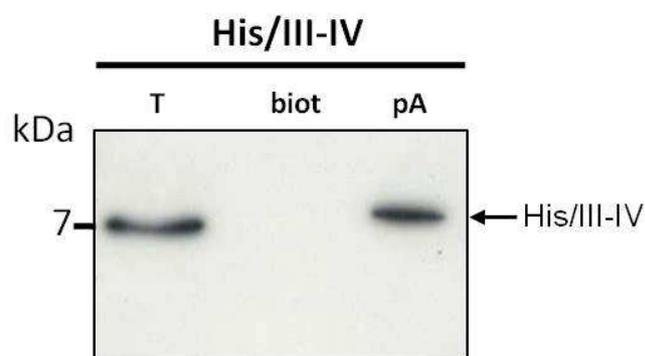
**Figure 39: L'interaction de la boucle I-II avec la boucle II-III implique le domaine A.**

(A). La boucle II-III purifiée (His/II-III, T = quantité de His/II-III utilisée pour l'expérience) a été incubée avec des billes magnétiques streptavidine recouvertes de biotine (biot, contrôle), ou du peptide AID (pAID)

(B). La boucle I-II purifiée (His/I-II, T = quantité de His/I-II utilisé pour l'expérience) a été incubée avec des billes magnétiques streptavidine recouvertes de biotine (biot, contrôle négatif), de peptide A (pA), de peptide C (pC), ou de peptide A cardiaque (pAcid, correspondant au domaine A de la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha 1C$ )

La présence des protéines His/I-II et His/II-III est révélé par immuno marquage avec des anticorps anti His.

Les résultats de ces expériences sont présentés sur la figure 39. La figure 39B montre que le domaine A interagit spécifiquement avec la boucle I-II. En effet, la protéine His/I-II est présente seulement sur les billes recouvertes par le peptide A. Cette interaction est spécifique du domaine A de la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha 1S$ , puisque son équivalent d'origine cardiaque (pAcd) issue de la sous-unité  $\alpha 1C$  n'interagit pas avec la protéine His/I-II. De même, l'absence de bande lorsque l'expérience est réalisée avec des billes recouvertes de biotine ou de peptide C démontre la spécificité de cette interaction et indique qu'elle n'implique pas le domaine C. La figure 39A nous indique que le domaine AID de la boucle I-II n'intervient pas non plus dans l'interaction de cette boucle avec la boucle II-III.



**Figure 40: Interaction de la boucle III-IV avec le domaine A**

La boucle III-IV purifiée sous la forme d'une protéine recombinante (His/III-IV, T = quantité de His/III-IV utilisé pour l'expérience) a été incubée avec des billes streptavidine recouvertes de biotine (biot, contrôle négatif), ou de peptide A. La présence de la protéine His/III-IV a été révélée par immuno marquage avec des anticorps anti His.

J'ai alors testé l'interaction de la boucle II-IV de la sous-unité  $\alpha 1S$  avec le domaine A de la boucle II-III. La figure montre l'interaction de la protéine correspondant à la boucle III-IV avec le peptide correspondant au domaine A.

J'ai ensuite testé l'interaction du domaine C-terminal de la sous-unité  $\alpha 1S$  avec les boucles I-II et II-III. Pour ces expériences, le domaine C-terminal est exprimé sous forme de deux protéines recombinantes correspondant à la région proximale et à la région distale de ce domaine respectivement (figure 37). Aucun de ces domaines n'a montré une interaction avec les boucles cytoplasmiques I-II, II-III et III-IV.

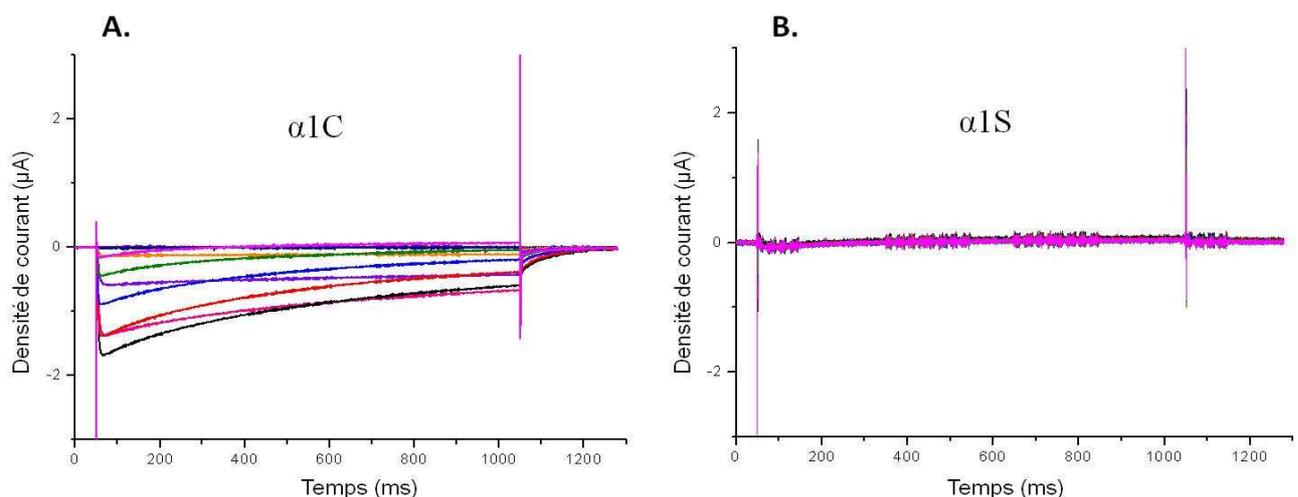
## 1.2 Etude du rôle fonctionnel des interactions

Ces résultats montrent donc que le domaine A est capable d'interagir soit avec la boucle I-II soit avec la boucle II-III. Cette interaction entre les boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  pourrait être impliquée dans le contrôle de l'activité canal calcique de cette sous-unité. En effet, le fait que la séquence de type cardiaque correspondant au domaine A n'interagit ni avec la boucle I-II ni avec la boucle II-III pourrait traduire une différence fonctionnelle entre les boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  et celles de la sous-unité  $\alpha 1C$ . Le remplacement de l'une des boucles de la sous-unité  $\alpha 1S$  par la boucle correspondante de type cardiaque provoque une perte du couplage de type rétrograde c'est-à-dire du contrôle de l'activité canal de  $\alpha 1S$  par RyR1.

Afin de tester l'hypothèse de l'implication de cette interaction entre les boucles cytoplasmiques de  $\alpha 1S$  dans le couplage rétrograde entre  $\alpha 1S$  et RyR1, j'ai choisi d'étudier l'influence de la présence de différents domaines du RyR1 sur l'expression de courants calciques portés par  $\alpha 1S$ . J'ai pour cela utilisé un système d'expression hétérologue, l'ovocyte de xénope.

J'ai donc co-exprimé, dans des ovocytes de xénope, différents domaines du RyR1 (figure 51). Dans tous les cas, la sous-unité  $\beta 1a$  est co-exprimée avec la sous-unité  $\alpha 1S$ .

Ainsi, l'expression des différents domaines du RyR1 n'a pas permis l'enregistrement d'un courant calcique porté par la sous-unité  $\alpha 1S$ .



**Figure 41: Courants de type L mesurés sur des ovocytes de xénope exprimant l'isoforme cardiaque ou squelettique de la sous-unité  $\alpha 1$** 

Les courants sont mesurés par la technique de doubles électrodes en configuration de voltage imposé sur des ovocytes de xénope. En (A) les ARNs correspondant aux sous-unité  $\alpha 1C$  et  $\beta 1a$  ont été injectés. En (B) les ARNs correspondant aux sous-unités  $\alpha 1S$  et  $\beta 1a$  ainsi que ceux correspondant à différents domaines du RyR1 ont été injectés.

Plusieurs raisons peuvent expliquer cet échec dans la restauration d'un courant calcique de type L par expression de la sous-unité  $\alpha 1S$  et en particulier l'absence dans ce système d'une protéine partenaire du RyR1 ou de  $\alpha 1S$  indispensables au couplage rétrograde. L'existence d'une contrainte conformationnelle du côté du RyR1 entraînant la nécessité de la présence de toute la protéine pour permettre le couplage rétrograde pourrait également expliquer ce résultat.

### 1.3 Etude de l'interaction de la CAV-3 avec la sous-unité $\alpha 1S$

Comme décrit au chapitre 1 de la partie rappels bibliographiques, les cavéoles et la cavéoline 3 joue un rôle particulier dans la biogénèse des tubules T. L'expression d'un mutant de Cav-3 (Cav-3<sup>P104L</sup>) entraînant, dans des cellules musculaires, une absence quasi totale de Cav-3 à la membrane plasmique a pour conséquence une forte réduction de la densité des courants calciques de types L (Couchoux et al., 2007; Weiss et al., 2008). Cette réduction des courants L ainsi que la diminution du CEC ne sont pas dues à une diminution de l'expression membranaire des DHPRs ce qui suggère un effet de Cav-3 sur la fonction de canal calcique de la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR. Récemment, une étude biochimique sur fibres musculaires de rat a démontré que la Cav-3 est associée au complexe de mobilisation du calcium (Vassilopoulos et al., 2010). Dans cette étude les auteurs montrent que Cav-3 est capable d'interagir avec le domaine transmembranaire du RyR1.

Il apparait donc aujourd'hui clairement que la Cav-3 est impliquée dans la régulation fonctionnelle et/ou la localisation membranaire du DHPR et du RyR1. Cependant, jusqu'à aujourd'hui aucune étude ne démontre la nature précise des liens moléculaires entre la Cav-3 et la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR. En collaboration avec le laboratoire de physiologie intégrative cellulaire et moléculaire de Lyon (UMR 5123, Lyon 1), nous avons donc mené une étude alliant des expériences d'imagerie, de biochimie et d'électrophysiologie afin de confirmer la localisation de la Cav-3. Nous avons aussi recherché les déterminants moléculaires de son interaction avec la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR (annexe 3).

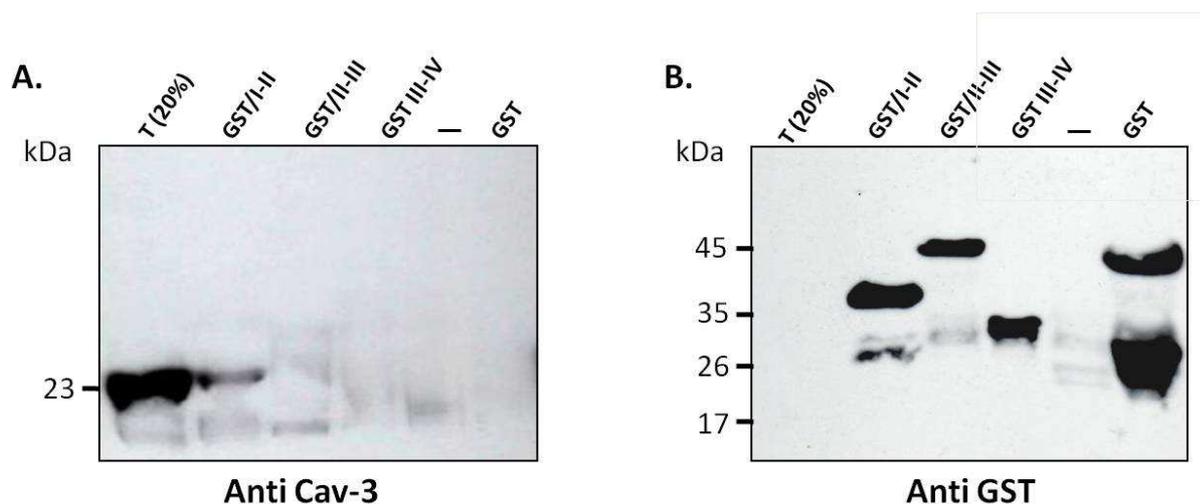
Dans cette étude, l'altération des courants de types L induite par la diminution de l'expression de Cav-3 à la membrane plasmique a été confirmée dans les cellules d'une lignée murine myoblastique (cellules C2C12) exprimant le mutant Cav-3<sup>P104L</sup>. L'étude de la localisation de Cav-3 dans des cellules musculaires adultes par marquage immunofluorescent à l'aide d'anticorps dirigés contre Cav-3 et d'anticorps dirigés contre la sous-unité  $\alpha 1S$ , a permis de montrer une co-localisation de ces deux protéines dans la membrane des tubules T.

La localisation de Cav-3 dans la membrane des tubules-T a alors été confirmée par analyse de deux préparations membranaires de RS. Une préparation correspondant à la partie longitudinale du RS, qui n'est pas associée à la membrane des tubules T et n'est pas impliquée dans le CEC (voir introduction paragraphe 1.3.2), et une préparation enrichie en triades. Cette fraction triadique correspond aux régions du RS faisant face à la membrane des tubules T et au niveau desquels a lieu le CEC. Les images réalisées en microscopie électronique de cette préparation triadique montrent la présence de nombreuses triades formées de deux citernes terminales de RS encadrant un fragment de tubule T (Mitchell et al., 1983).

On observe un très fort enrichissement en Cav-3 dans la préparation membranaire correspondant aux triades confirmant la présence de Cav-3 dans la membrane des tubules T (figure 2 Annexe 2).

A partir de cette préparation membranaire de triades, des expériences d'immunoprécipitation de la sous-unité  $\alpha 1S$  à l'aide d'anticorps spécifiques anti-Cav-3 ont montré la co-immunoprécipitation de la Cav-3 et d' $\alpha 1S$ . Ce résultat démontre la participation de la Cav-3 au complexe DHPR au sein de la membrane du tubule T.

Afin de démontrer l'interaction directe de Cav-3 avec le DHPR nous avons alors étudié l'interaction possible de Cav-3 avec les différents domaines cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  décrite au paragraphe précédent. L'approche méthodologique utilisée est celle de la co-précipitation que j'ai utilisée pour l'étude des interactions entre boucles de  $\alpha 1S$  (cf. paragraphe 1.1). Pour cette étude nous avons essayé sans succès d'exprimer Cav-3 sous forme d'une protéine recombinante dans des bactéries. Pour les expériences présentées ci-dessous Cav-3 fut donc exprimée par traduction *in vitro* (voir Matériels et méthodes) et identifiée par immunomarquage à l'aide d'anticorps spécifiques.

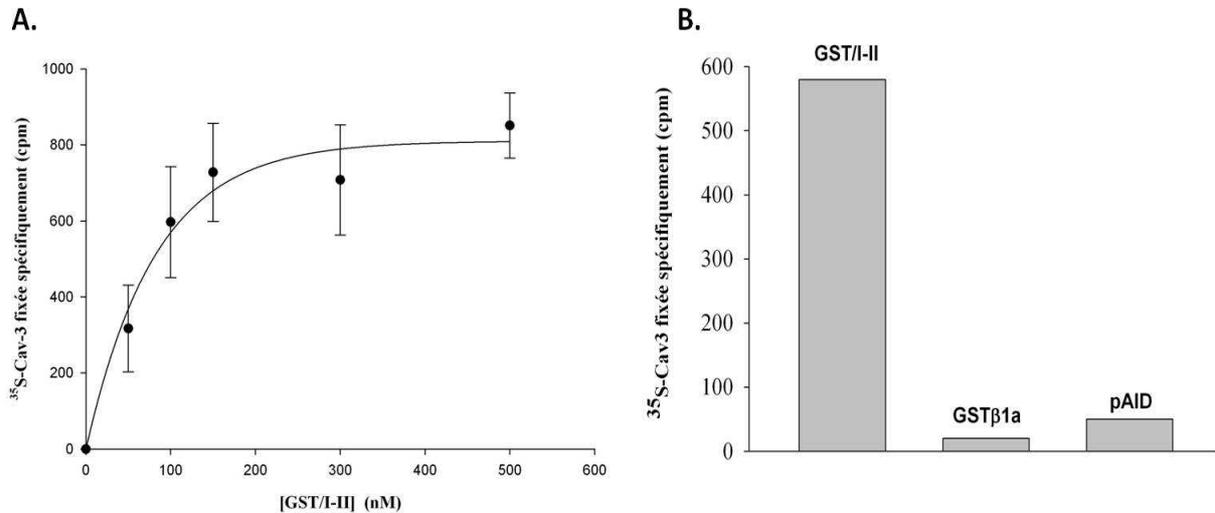


**Figure 42: Interaction de Cav-3 avec les différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$**

(A). Les protéines recombinantes (étiquetées GST) correspondant aux différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  ont été immobilisées sur des billes d'agarose recouvertes de glutathion et incubées (concentration finale :  $7,5 \mu M$ ) avec de la Cav-3 traduite in vitro. T (20 %) = 20 % de la quantité totale de Cav-3 utilisée pour les différentes expériences a été déposée. Des billes recouvertes de GST ont servi de contrôle négatif. La présence de Cav-3 est révélée avec un anticorps anti Cav-3.

(B). Western blot avec un anticorps anti GST de la membrane utilisée pour analyser les interactions avec la Cav-3 (en A.). Afin de vérifier que les quantités de protéines recombinantes utilisées dans les différentes expériences présentées en A étaient équivalentes, la membrane utilisée en A. a été lavée puis réincubée avec un anticorps anti GST.

Des protéines recombinantes correspondant aux différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$ , ont été immobilisées sur des billes d'agarose et utilisées dans des expériences d'interaction avec une Cav-3 traduite in vitro. La figure 42A montre que parmi les différentes constructions testées, seule celle correspondant à la boucle I-II interagit spécifiquement avec la Cav-3. L'absence de bande correspondant à la Cav-3 avec les autres boucles et avec la GST seule démontre l'absence d'interaction directe entre la Cav-3 et les autres boucles cytoplasmiques ainsi que la spécificité de l'interaction Cav-3/boucle I-II. La figure 42B montre la détection avec un anticorps anti GST, des protéines recombinantes utilisées dans les expériences présentées dans la figure 42A. On observe que l'intensité des bandes pour chacune des préparations protéiques utilisées est similaire, indiquant que les protéines ont été utilisées dans des concentrations équivalentes.



**Figure 43: Mesure de l'affinité de la liaison Cav-3/boucle I-II**

(A). L'affinité apparente de la liaison Cav-3/I-II a été mesurée en incubant une quantité constante de Cav-3 marquée au <sup>35</sup>S (<sup>35</sup>S-Cav-3 avec des concentrations croissantes de la protéine recombinante GST/I-II immobilisée sur des billes agarose glutathion. La quantité totale de billes est maintenue constante pour toutes les conditions par ajout de billes recouvertes de GST. La <sup>35</sup>S-Cav-3 interagissant avec les billes GST/I-II est mesurée par comptage de la radioactivité du <sup>35</sup>S après lavages et récupération des billes par centrifugation. La fixation non spécifique de la <sup>35</sup>S-Cav-3 a été mesurée sur un volume équivalent de billes agarose recouvertes de GST seule. Cpm = coups par minutes (B). Pull down de la <sup>35</sup>S-Cav-3 par la boucle I-II, le domaine AID de la boucle I-II et par la sous-unité β1a. La protéine GST/I-II, GST/β1a et le peptide biotynilé AID ont été immobilisés sur des billes agaroses recouvertes de glutathion ou des billes magnétiques recouvertes de streptavidine et incubées sur la nuit à 4°C avec la <sup>35</sup>S-Cav-3. La mesure de la <sup>35</sup>S-Cav-3 fixée sur les billes est réalisée dans les mêmes conditions qu'en A. La fixation non spécifique de la <sup>35</sup>S-Cav-3 a été mesurée sur un volume équivalent de billes agarose recouvertes de GST seule ou de billes streptavidine recouvertes de biotine seule. Elle représente environ 25 % de la fixation totale mesurée en présence de la boucle I-II. Cpm = coups par minutes

Dans le but de mieux caractériser cette interaction, j'ai mesuré son affinité apparente à l'aide de Cav-3 marquée au <sup>35</sup>S (figure 43). La quantité de <sup>35</sup>S-Cav-3 retenue sur les billes augmente avec la concentration de GST/I-II pour atteindre un plateau vers 300 nM. Cette courbe permet de calculer une affinité apparente pour l'interaction Cav-3/I-II de l'ordre de 60 nM.

Ces résultats démontrent l'interaction directe de Cav-3 avec la boucle I-II de la sous-unité α1S du DHPR. Comme nous l'avons vu précédemment, cette boucle contient un site de fixation de la sous-unité β1a (domaine AID) extrêmement importante pour l'adressage de α1S à la triade ainsi que pour la régulation de ses propriétés de canal calcique. Nous avons donc mesuré l'interaction de <sup>35</sup>S-Cav-3 avec le domaine AID ainsi qu'avec la sous-unité β1a purifiée. Comme le montre la figure 43, aucune interaction de Cav-3 avec AID ou la sous-unité β1a n'a pu être mise en évidence. Ce résultat confirme la spécificité de l'interaction de Cav-3 avec la boucle I-II de la sous-unité α1S.

## Discussion et perspectives

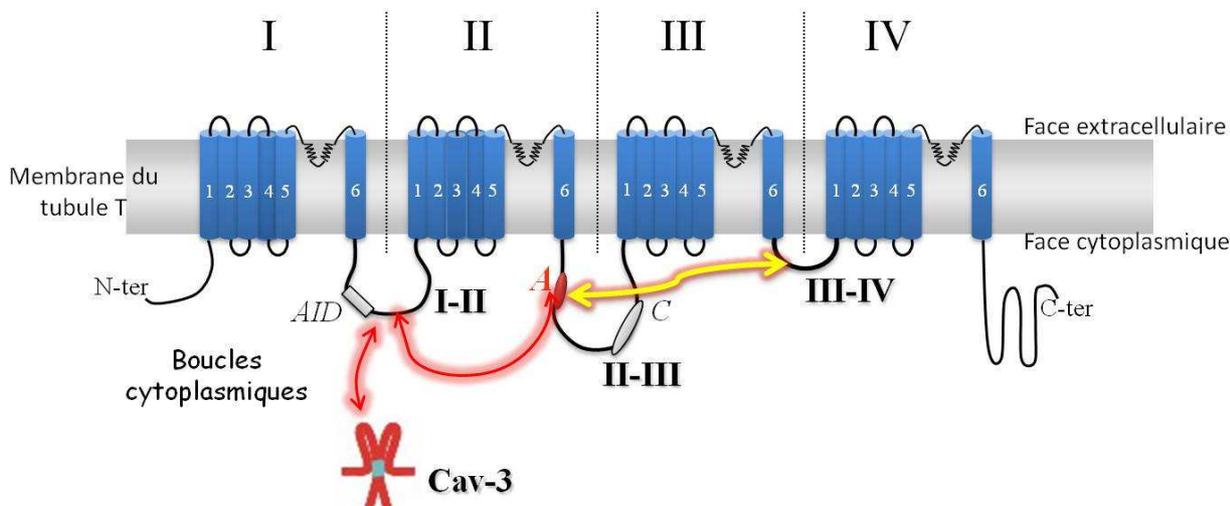


Figure 44: Schéma résumant les interactions intramoléculaires au sein de la sous-unité  $\alpha 1S$ .

Les résultats que je viens d'exposer sont résumés sur la figure 44. J'ai donc montré: a) l'existence d'une interaction intramoléculaire entre les différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR ; b) que le domaine A de la boucle II-III est au centre de cette interaction puisqu'il est capable d'interagir avec la boucle I-II et avec la boucle III-IV ; c) que l'isoforme cardiaque du domaine A n'interagit ni avec la boucle I-II ni avec la boucle II-IV ; d) que la boucle I-II renferme le site d'interaction de la sous-unité  $\alpha 1S$  avec Cav-3 ; et e) que le site d'interaction Cav-3/boucle I-II ne se situe pas sur le domaine AID.

Plusieurs hypothèses peuvent être faites quant au(x) rôle(s) fonctionnel(s) de ces interactions. Comme je l'ai rappelé dans l'introduction de ce manuscrit, le couplage fonctionnel DHPR/RyR1 repose sur deux mécanismes, le couplage orthograde par lequel le DHPR contrôle l'activité du RyR1 et le couplage rétrograde par lequel RyR1 contrôle l'activité DHPR. Il est cependant très probable que ces deux mécanismes ne soient pas indépendants l'un de l'autre, mais plutôt fortement interconnectés. Ces deux mécanismes montrent par exemple la même dépendance vis-à-vis de la nature de l'isoforme (squelettique versus cardiaque) de DHPR et/ou de RyR présent, et ne sont observés que lorsque les isoformes squelettiques de chacune de ces deux protéines sont exprimées. Il a ainsi été montré que le remplacement de l'une ou l'autre des trois boucles cytoplasmiques de  $\alpha 1S$  par son homologue cardiaque de  $\alpha 1C$  entraîne la perte du couplage de type rétrograde et l'apparition de courant de type L en absence de RyR.

L'interaction entre les boucles cytoplasmiques de  $\alpha 1S$  pourrait donc représenter un déterminant moléculaire du couplage rétrograde en stabilisant la sous-unité  $\alpha 1S$  dans un état de conformation correspondant à l'état fermé du canal DHPR. L'interaction du DHPR avec une protéine du complexe DHPR/RyR1 induirait alors la dissociation de cette interaction et la possibilité de transition vers un état ouvert de la sous-unité  $\alpha 1S$  et donc l'apparition d'un courant de type L.

Cette hypothèse laisse cependant entière la question de l'identité de la protéine responsable de la modification de cette interaction. Un candidat est bien sûr RyR1 lui-même. L'interaction du domaine A de la boucle II-III avec RyR1 pourrait induire la déstabilisation de l'interaction entre les boucles cytoplasmiques de  $\alpha 1S$ . D'autres domaines du RyR1 identifiés comme sites d'interaction avec notamment la boucle III-IV pourraient également être impliqués dans la régulation de cette interaction.

L'identification d'une interaction directe de Cav-3 avec la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1S$ , fait de Cav-3 un candidat potentiel pour jouer un rôle dans la régulation de l'interaction entre les boucles de  $\alpha 1S$ . L'absence de Cav-3 induit une forte diminution du courant calcique de type L qui pourrait être lié à la stabilisation de l'interaction entre boucles.

Il est intéressant de noter qu'une mutation ponctuelle de la boucle III-IV (R1086H) a été associée à l'hyperthermie maligne (Monnier et al., 1997). L'étude du CEC dans des cellules dysgéniques exprimant une sous-unité  $\alpha 1S$  portant cette mutation a montré que cette mutation augmente la sensibilité du RyR à la dépolarisation de la membrane plasmique ainsi qu'à la caféine (Weiss et al., 2004). En outre, cette boucle, comme la boucle II-III, a été identifiée comme interagissant avec RyR1 (Leong & MacLennan, 1998b).

Différentes études montrent donc l'implication de chacune des boucles cytoplasmiques de  $\alpha 1S$  dans la mise en place ou la régulation des différents acteurs du CEC. L'existence d'une interaction entre ces boucles peut de ce fait représenter un élément important du contrôle des rôles respectifs de chacune de ces boucles.

## 2. ETUDE DE L'INTERACTION $\beta$ 1A /RYR1

### Introduction

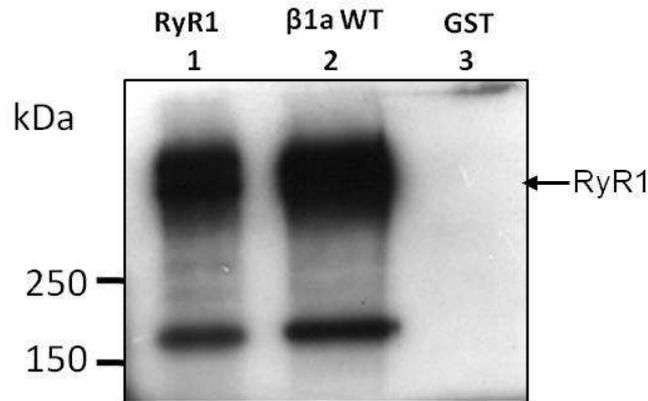
Comme nous l'avons évoqué dans les rappels bibliographiques, une interaction directe de la sous-unité  $\beta$ 1a du DHPR avec RyR1 a été mise en évidence (Cheng et al., 2005). Dans cette étude, un site de liaison de la sous-unité  $\beta$ 1a sur RyR1 a été identifié et les auteurs ont montré que la mutation, ou la délétion, de ce groupe d'acides aminés chargés positivement entraîne la perte de l'interaction RyR1- $\beta$ 1a et une forte diminution de l'efficacité du couplage fonctionnel entre le DHPR et RyR1. Cette étude, ainsi que celles plus récentes montrant un rôle de  $\beta$ 1a dans l'organisation des DHPRs en tétrades, a amené plusieurs hypothèses quant au rôle de cette sous-unité (voir chapitre 3). Ces résultats ouvrent donc une voie nouvelle de régulation du couplage DHPR/RyR.

Au cours de mon travail, j'ai abordé deux aspects de l'interaction  $\beta$ 1a/RyR1. J'ai tout d'abord étudié l'influence de l'interaction de la sous-unité  $\beta$ 1a avec la sous-unité  $\alpha$ 1S sur son interaction avec RyR1. Dans un deuxième temps, j'ai essayé de définir la région de la sous-unité  $\beta$ 1a impliquée dans l'interaction avec RyR1.

### 2.1 L'interaction $\beta$ 1a/ $\alpha$ 1S modifie l'interaction $\beta$ 1a/RyR1

Comme je l'ai décrit dans l'introduction de ce manuscrit (paragraphe 2.1.1.2), la sous-unité  $\beta$ 1a représente la seule sous-unité entièrement cytoplasmique du DHPR. Une interaction forte de cette sous-unité avec la sous-unité  $\alpha$ 1S a été décrite. Le domaine d' $\alpha$ 1S impliqué dans cette interaction a aussi été identifié sur la boucle I-II (domaine AID) (figure 37).

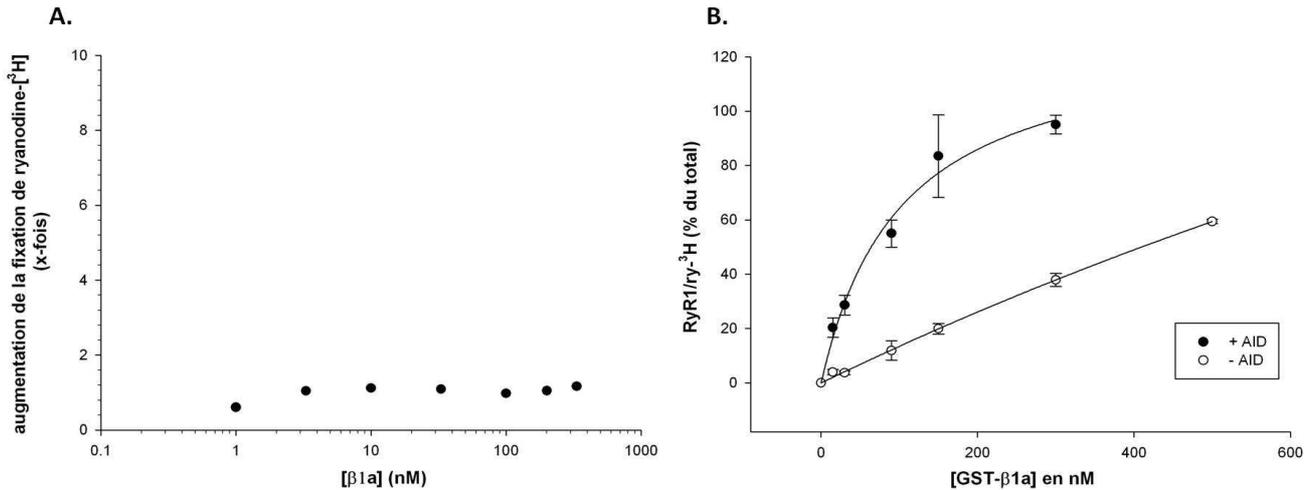
Afin d'étudier l'effet de l'interaction  $\alpha$ 1S/ $\beta$ 1a sur l'interaction  $\beta$ 1a/RyR1, j'ai dans un premier temps cloné, exprimé dans des bactéries, puis purifié une protéine recombinante correspondant à la sous-unité  $\beta$ 1a et portant une étiquette GST en position N-terminale et une étiquette histidine en position C-terminale ( $\beta$ 1a WT, figure 47). La figure 45 confirme l'interaction entre la sous-unité  $\beta$ 1a et le RyR1. On observe que les billes recouvertes par la construction  $\beta$ 1a WT interagissent avec le RyR1 alors que celles seulement recouvertes de GST n'interagissent pas. Cette interaction est donc spécifique entre la sous-unité  $\beta$ 1a et le RyR1.



**Figure 45 : La sous-unité β1a interagit avec RyR1**

Le RyR1 purifié à partir de vésicules HSR (puits 1) a été incubé avec la sous-unité β1a purifiée sous la forme d'une protéine recombinante étiquetée His et GST (β1a WT) et immobilisée sur des billes agarose glutathion (puits 2) ou avec des billes ou recouvertes de GST seule (contrôle négatif, puits 3). La présence du RyR1 est révélée par immunomarquage avec des anticorps anti RyR.

Dans un second temps, j'ai développé une technique me permettant d'étudier l'interaction β1a/RyR1 en fonction de la présence du domaine AID de la boucle I-II. Dans cette approche, le RyR1 purifié à partir de vésicules de HSR est préalablement incubé avec de la ryanodine-<sup>3</sup>H. Cette étape permet de marquer les molécules du RyR1 purifiées. Ces RyR1/ry-<sup>3</sup>H sont ensuite incubés avec des billes agaroses glutathion recouvertes de β1a WT ou sur des billes streptavidines recouvertes d'un complexe AID-β1a où le peptide AID est biotinylé pour permettre l'immobilisation du complexe AID/ β1a sur les billes. Pour l'expérience, des concentrations croissantes de protéines sont utilisées (0 à 500 nM) (figure 46B). Cette approche n'est évidemment possible que si la sous-unité β1a n'a pas d'effet sur la fixation de ryanodine-<sup>3</sup>H sur RyR1. C'est pourquoi j'ai d'abord procédé à cette vérification. La figure 46A montre que la fixation de ryanodine sur RyR1 n'est pas affectée par la sous-unité β1a. J'ai donc pu réaliser l'expérience de co-précipitation sur billes du RyR1 marqué à la ryanodine. La figure 46B présente le résultat de cette expérience. Les résultats sont présentés en pourcentage de la quantité totale de ryanodine-<sup>3</sup>H utilisée en fonction de la concentration de la sous-unité β1a seule ou avec le peptide AID. On constate que l'affinité apparente du RyR1 pour la sous-unité β1a est bien meilleure en présence du peptide AID. Ce résultat suggère un rôle de l'interaction entre la sous-unité α1S et la sous-unité β1a dans l'efficacité de l'interaction β1a/RyR1.



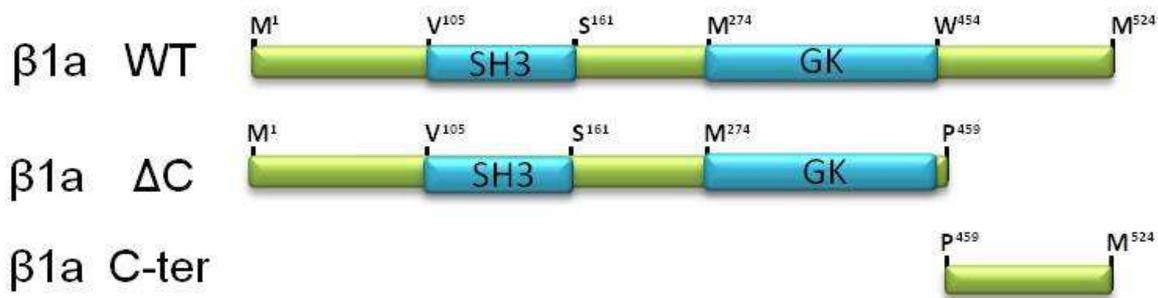
**Figure 46: Interaction β1a/RyR1 en présence ou en absence de peptide AID**

(A). Mesure de l'effet de β1a sur la fixation de ryanodine-<sup>3</sup>H. La liaison de ryanodine-<sup>3</sup>H sur des vésicules de HSR purifiées a été mesurée en présence de concentration croissante de la sous-unité β1a.

(B). Des RyR1 ont été purifiés à partir de HSR, puis incubés avec de la ryanodine-<sup>3</sup>H. Les RyR1/ry-<sup>3</sup>H ont ensuite été incubés avec des billes glutathion agarose recouvertes de la protéine recombinante β1a WT seule (blanc) ou des billes streptavidine recouvertes par un complexe AID-β1a (noir). Le peptide AID fixant la β1a est biotinylé pour pouvoir être immobilisé sur les billes. Dans les deux cas, la concentration de β1a varie de 0 à 500 nM. Les pulls downs sont analysés par comptage de la radioactivité des complexes RyR1/Ry-<sup>3</sup>H immobilisés sur les billes après 30 minutes d'incubation et plusieurs lavages par centrifugation. Les résultats sont présentés en pourcentage de la quantité totale de ryanodine-<sup>3</sup>H utilisée.

## 2.2 Le domaine C terminal de la sous-unité β1a contrôle l'interaction β1a/RyR1

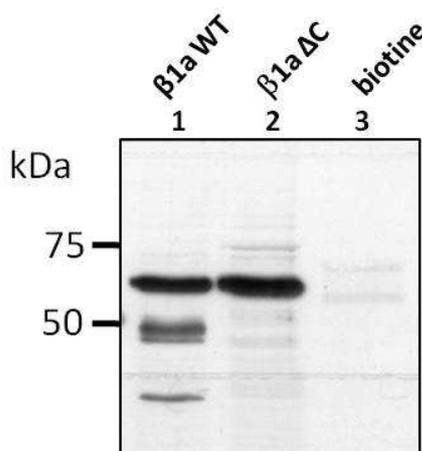
Afin de définir la région de la sous-unité β1a impliquée dans l'interaction avec RyR1, j'ai produit deux protéines recombinantes correspondant à des délétions de la sous-unité β1a. Celles-ci portent, comme la sous-unité β1a que je viens de décrire, une double étiquette GST et histidine (figure 47).



**Figure 47: Représentation schématique de différentes constructions de la sous-unité  $\beta$ 1a**

La construction  $\beta$ 1a  $\Delta$ C (acides aminés 1-459) correspond à la forme délétee du domaine C terminal. La construction  $\beta$ 1a C-ter correspond au domaine C terminal délétee dans la construction précédente (acides aminés 459-524). Ces constructions ont été clonées dans un vecteur de manière à obtenir des protéines recombinantes doublement étiquetées : histidine en C-terminal et GST en N-terminal (pGEX-2T). Ces constructions ont aussi été clonées dans un vecteur permettant d'exprimer les protéines dans des cellules eucaryotes (pcDNA3.1).

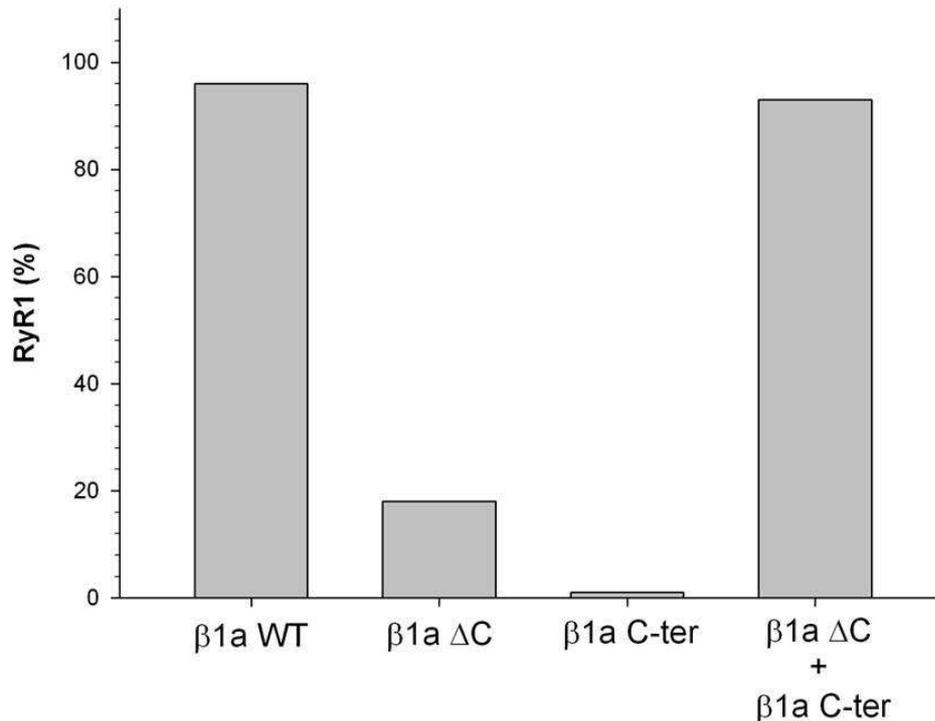
J'ai démontré que l'interaction avec le peptide AID modifiait l'interaction de  $\beta$ 1a avec RyR1. Dans le but d'étudier les interactions de ces différentes constructions avec le RyR1, j'ai décidé d'utiliser des billes recouvertes de streptavidine sur lesquelles les constructions  $\beta$ 1a WT et  $\beta$ 1a  $\Delta$ C ont été immobilisées via un peptide AID biotinylé. La construction  $\beta$ 1a C-ter est, d'après les données structurales connues sur la sous-unité  $\beta$ 1a, délétee des principaux éléments intervenant dans l'interaction avec le domaine AID (voir paragraphe 2.1.1.2 de l'introduction). Cette dernière a donc été immobilisée sur des billes glutathion agarose pour l'expérience d'interaction. J'ai d'abord regardé si la construction  $\beta$ 1a, délétee du domaine C-terminal, conservait sa capacité d'interaction avec le domaine AID de la boucle I-II. La figure 48 montre le résultat de la co-précipitation de la construction  $\beta$ 1a  $\Delta$ C par le peptide AID immobilisé sur des billes streptavidine. On observe que cette construction de la sous-unité  $\beta$ 1a interagit toujours avec AID, comme le montre la bande dans le puits 2. L'interaction observée est spécifique, puisque sur des billes recouvertes de biotine seule, cette construction de  $\beta$ 1a n'interagit pas. On peut noter que les bandes correspondantes à la  $\beta$ 1a WT et à la  $\beta$ 1a  $\Delta$ C se trouvent au même niveau sur le western blot. Ceci peut être dû à la migration des protéines dans le gel utilisé qui ne permet pas toujours de différencier deux protéines dont la différence de taille n'est pas très élevée.



**Figure 48 : La construction de  $\beta 1a$  délétée du domaine C-terminal interagit toujours avec le domaine AID**

Les protéines recombinantes correspondant à la sous-unité  $\beta 1a$  WT ( $\beta 1a$  WT) ou à la sous-unité  $\beta 1a$  délétée du domaine C-terminal ( $\beta 1a \Delta C$ ) ont été incubées avec des billes magnétiques streptavidine recouvertes de peptide AID (Puits 1 et 2) ou de biotine (puits 3, contrôle négatif). La présence des protéines recombinantes a été révélée par immuno-marquage avec des anticorps anti His.

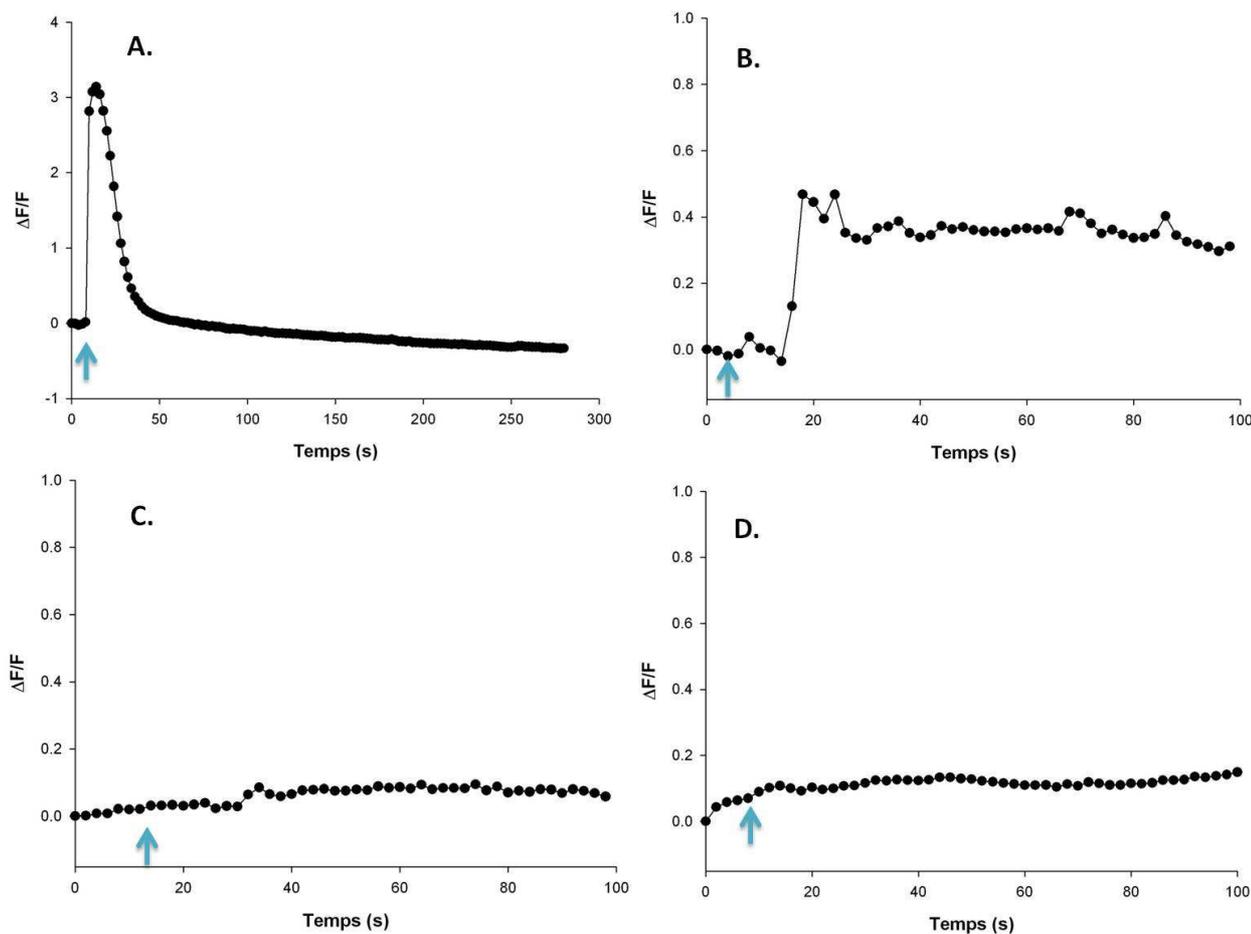
J'ai ensuite testé l'interaction des différentes constructions présentées dans la figure 47 avec le RyR1. Les résultats de ces expériences d'interactions sont résumés dans la figure 49 sous la forme d'un tableau présentant la quantité de RyR1 immobilisée sur les billes par rapport à la quantité totale de RyR1 utilisée dans l'expérience, en fonction des constructions recouvrant les billes. On observe que la sous-unité  $\beta 1a$  délétée de sa partie C-terminale perd sa capacité à se fixer sur RyR1, seul 18% des RyR1 sont fixés sur les billes. Le domaine C-terminal seul n'interagit pas non plus avec RyR1. À l'inverse, lorsque les deux constructions précédentes sont utilisées simultanément, l'interaction avec RyR1 est restaurée, 93 % des RyR1 se fixent sur les billes. Ces résultats suggèrent que la structure tridimensionnelle de  $\beta 1a$  est importante pour son interaction avec RyR1. La présence du domaine C-terminal, permet au reste de la sous-unité  $\beta 1a$  d'interagir de nouveau avec le RyR1.



**Figure 49 : Graphique récapitulatif des expériences de co-précipitation sur billes réalisées avec les différentes constructions de la sous-unité  $\beta 1a$**

Les différentes constructions de la sous-unité  $\beta 1a$  ont été immobilisées sur des billes puis utilisées dans des expériences de pull downs avec des RyR1 purifiés. Les constructions  $\beta 1a$  WT,  $\beta 1a \Delta C$ , et  $\beta 1a \Delta C + \beta 1a$  C-ter sont immobilisées sur des billes streptavidine via le domaine AID, alors que la construction  $\beta 1a$  C-ter est immobilisée sur des billes agarose glutathion. La présence du RyR1 sur les billes dans les différentes expériences a été révélée par immuno marquage avec un anticorp anti RyR, puis les bandes correspondants aux RyR1 ont été quantifiées à l'aide d'un logiciel de traitement d'images. Les résultats sont présentés en pourcentage de RyR1 fixé sur les billes par rapport à la quantité totale de RyR1 purifiée utilisée dans l'expérience.

Les expériences fonctionnelles réalisées sont basées sur la ré-expression des différentes constructions modifiées de la sous-unité  $\beta 1a$  dans des myotubes  $\beta 1$ -null. En utilisant ces myotubes dans des expériences d'imagerie calcique, nous avons pu évaluer l'efficacité du CEC en mesurant les transitoires calciques via RyR1 induits par la dépolarisation de la membrane plasmique. Les transitoires calciques sont mesurés 3 à 5 jours après la transfection des myotubes avec les différentes constructions. Ils sont chargés avec 5  $\mu M$  d'un indicateur fluorescent pour la mesure du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique (Fluo4AM, Invitrogen). La dépolarisation de la membrane plasmique est obtenue par perfusion du milieu extracellulaire avec une solution de KCl (140 mM). L'amplitude des transitoires calciques obtenus est mesurée par une variation de la fluorescence de l'indicateur. Les résultats sont présentés figure 50.



**Figure 50: Mesure des transitoires calciques dans des myotubes β1-null exprimant différentes constructions de la sous-unité β1a**

Les myotubes sont transfectés avec (A) la sous-unité β1a sauvage (β1a WT); (B) la sous-unité β1a délétée du domaine C-terminal (β1a ΔC); (C) le domaine C-terminal de la sous-unité β1a (β1a C-ter) ou (D) avec la sous-unité β1a délétée du domaine C-terminal + le domaine C-terminal de la sous-unité β1a (β1a C-ter).

Les transitoires calciques sont mesurés 3 à 5 jours après la transfection. Les myotubes sont chargés avec 5 μM d'un indicateur fluorescent pour la mesure du Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique (Fluo4AM, Invitrogen). La dépolarisation de la membrane plasmique est obtenue par perfusion dans le milieu extracellulaire avec une solution de KCl (140 mM) (flèche bleue). L'amplitude des transitoires calciques obtenus est mesurée par une variation de fluorescence (ΔF/F)

L'expression de la sous-unité β1a non modifié (β1a WT) dans les myotubes β1-null permet de restaurer le CEC. C'est ce que montre la figure 50A, après dépolarisation par le KCl, on observe un transitoire calcique dont l'amplitude est similaire à celle observée dans des myotubes normaux.

La figure 50 C-D montre les résultats obtenus avec les myotubes transfectés par les constructions délétées de la sous-unité β1a. On observe que ni le domaine C-terminal de β1a exprimé seul ni son association avec la construction de β1a délété du domaine C-terminal ne permet de restaurer un couplage fonctionnel entre le DHPR et RyR1, aucun transitoire n'apparaît. À l'inverse, lorsque les myotubes sont transfectés avec la construction β1a ΔC, seulement délétée du

domaine C-terminal, on peut mesurer un relâchement de calcium dont les propriétés diffèrent largement des transitoires normaux (figure 50B). Ce relâchement de calcium est très réduit puisque qu'il ne représente que 20 % de l'amplitude maximale obtenue avec l'expression de la sous-unité  $\beta 1a$  WT. Ensuite, ce relâchement n'est pas transitoire, son amplitude diminue très lentement. Au lieu de diminuer rapidement au bout de 40 secondes comme c'est le cas lorsque la sous-unité  $\beta 1a$  WT est exprimée (figure 50A,  $\beta 1a$  WT), la fluorescence se maintient et représente encore environ 60 % de l'amplitude maximale plus d'une minute après la dépolarisation. Ces résultats suggèrent donc qu'en plus d'un défaut dans la mise en place du CEC, cette construction délétée du domaine C-terminal provoque aussi un défaut dans la refermeture des RyR1 après leur activation.

Pour confirmer la présence de la sous-unité  $\alpha 1S$  à la membrane et vérifier que l'effet que nous observons n'est pas dû à une modification de l'adressage membranaire d' $\alpha 1S$ , nous avons décidé de mesurer les courants de type L par la technique de voltage clamp sur des myotubes  $\beta 1$ -null exprimant la construction  $\beta 1a \Delta C$ . La transfection de cette construction n'a pas permis de mesurer des courants L significatifs.

## Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous apportons de nouvelles informations sur l'interaction de la sous-unité  $\beta 1a$  avec RyR1 en montrant ; a) que l'affinité de cette interaction est augmentée par l'interaction de la sous-unité  $\beta 1a$  avec le domaine AID de la sous-unité  $\alpha 1S$  ; b) que la région C-terminale de  $\beta 1a$  (acides aminés 459-524) est nécessaire, mais pas suffisante pour l'interaction  $\beta 1a$  /RyR1 ; c) que la délétion de cette partie de la sous-unité  $\beta 1a$  provoque non seulement une perte de l'interaction avec RyR1 mais aussi une modification importante des caractéristiques du transitoire calcique induit par une dépolarisation membranaire, suggérant une fermeture incomplète de RyR1 après activation. Nous démontrons aussi que cette délétion n'empêche pas l'interaction de la sous-unité  $\beta 1a$  avec le domaine AID.

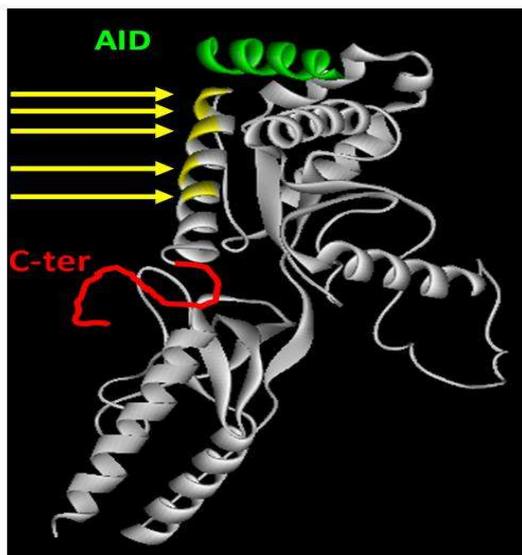
Comme je l'ai décrit dans l'introduction (paragraphe 3.2), l'expression d'un CEC de type squelettique requière la présence de l'isoforme squelettique de la sous-unité  $\beta$  ( $\beta 1a$ ) et ce dernier intervient de manière déterminante dans le couplage physique DHPR/RyR lors de ce processus. Cependant la sous-unité  $\beta 1a$  étant impliquée dans l'adressage de la sous-unité  $\alpha 1S$  à la triade et dans l'organisation du DHPR en tétrade, il est toujours difficile de différencier ce rôle de  $\beta 1a$  de son rôle dans le couplage fonctionnel entre DHPR et RyR1. Le fait que l'interaction  $\beta 1a$ /RyR1 soit renforcée par l'interaction de  $\beta 1a$  avec le domaine AID de la sous-unité  $\alpha 1S$  montre l'imbrication des

différents aspects du rôle fonctionnel de la sous-unité  $\beta 1a$ . Les travaux de Leuranguer (2006) montrant qu' en absence de sous-unité  $\alpha 1S$  (myotubes dysgéniques) la sous-unité  $\beta 1a$  présente une répartition diffuse dans le cytoplasme alors qu'elle présente une organisation punctiforme en présence de  $\alpha 1S$  ont été interprétées par ces auteurs comme une preuve de l'absence d'interaction entre  $\beta 1a$  et RyR1 (Leuranguer et al., 2006). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la construction d'un complexe DHPR/RyR1 parfaitement organisé et fonctionnel met en jeux des relations coopératives entre les différentes protéines impliquées. La présence de  $\beta 1a$  serait donc un facteur potentiateur de la formation de tétrades et donc de la formation du complexe  $\alpha 1s$ /RyR1 mais la présence de  $\alpha 1S$  serait également un élément potentiateur de l'interaction  $\beta 1a$ /RyR1.

L'implication du domaine C-terminal de la sous-unité  $\beta 1a$  dans le CEC a été proposée par l'équipe de Coronado (2003, 2004) (Sheridan et al., 2003; Sheridan et al., 2004). Leurs travaux d'expression de sous-unités  $\beta$  portant des domaines C-terminaux de différentes origines et de sous-unités  $\beta$  tronquées de leur domaine C-terminal ont en effet montré dans les différentes situations étudiées une forte perturbation du CEC. Nous apportons ici, la première observation montrant que la sous-unité  $\beta 1a$  délétée de son domaine C-terminal n'interagit plus avec RyR1. Ce domaine C terminal ne représente cependant pas le site d'interaction avec RyR1 puisqu'il est incapable d'interagir avec RyR1 lorsqu'il est seul. Ce résultat met donc en évidence l'importance de la structure tridimensionnelle de la sous-unité  $\beta 1a$  dans l'établissement d'une zone de contact DHPR/RyR fonctionnelle.

Les caractéristiques du relâchement de  $Ca^{2+}$  mesurées lors de l'expression de la construction  $\beta 1a \Delta C$  montrent un effet direct sur RyR1. La délétion du domaine C-terminal de  $\beta$  entraîne non seulement une réduction importante de l'amplitude du relâchement de  $Ca^{2+}$  induit par le choc KCl, mais également la persistance du relâchement observé, suggérant un défaut dans le mécanisme de fermeture de RyR1.

Lors de cette étude, nous avons aussi observé une diminution très forte de l'amplitude des courants de types L lors de l'expression de  $\beta 1a \Delta C$ . Ce résultat suggère un défaut d'adressage des sous-unités  $\alpha 1S$  à la membrane ou un effet direct de cette délétion sur les propriétés canaux de la sous-unité  $\alpha 1S$  qui pourrait expliquer la diminution de l'amplitude du transitoire calcique que nous observons.



**Figure 51 : Structure cristallographique de la sous-unité  $\beta$ 1a en interaction avec AID**

Modifié d'après (Opatowsky et al., 2004)

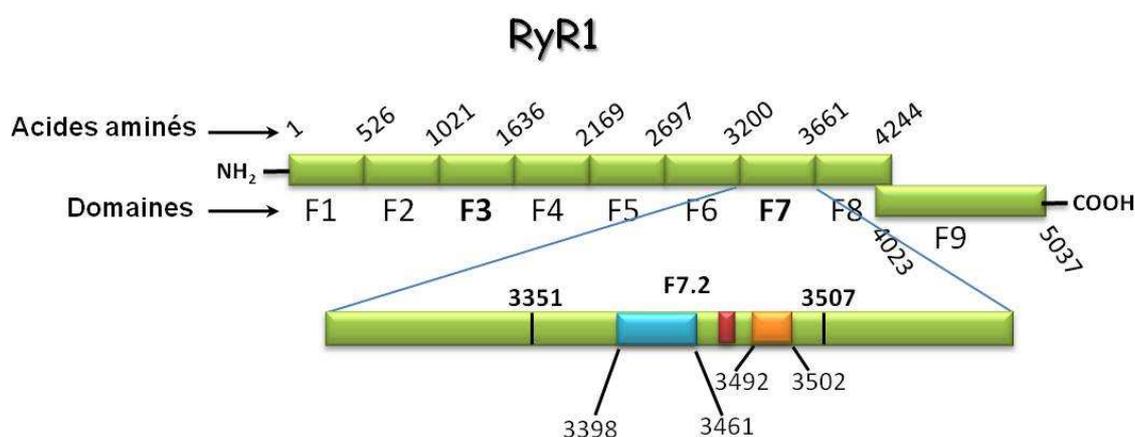
Le domaine AID est représenté en vert. Le domaine C terminal de la sous-unité est en rouge et les acides aminés chargés négativement et regroupés sur une surface chargée au niveau de la charnière entre le domaine GK et le domaine C-terminal sont représentés en jaune.

A ce stade de notre étude, il ne nous est pas possible de définir de façon précise la séquence d'acides aminés de  $\beta$ 1a responsable de l'interaction avec RyR1. L'existence d'un facteur conformationnel important pour cette interaction risque de rendre difficile cette identification. L'analyse de la structure tridimensionnelle de  $\beta$ 1a fait apparaître un groupe d'acides aminés chargés formant une surface chargée négativement au niveau de la charnière entre le domaine GK et le domaine C-terminal (figure 51). Ce groupe d'acides aminés représente un site potentiel d'interaction avec le groupe d'acides aminés chargés positivement de RyR1 identifié comme site d'interaction de  $\beta$ 1a (Cheng et al. 2005). Malheureusement, la structure tridimensionnelle du domaine C-terminal de  $\beta$ 1a n'a pas pu être déterminée en raison de sa trop grande flexibilité et de son absence de motif structuré. Il serait intéressant d'étudier si l'interaction de  $\beta$ 1a avec RyR1 stabilise une conformation particulière de ce domaine C-terminal de  $\beta$ 1a. Une étude structurale en RMN identique à celle que nous avons initiée pour le domaine de RyR1 correspondant au site de liaison de la MCa pourrait être envisagée, les deux domaines, C-ter de  $\beta$ 1a et site de liaison de  $\beta$ 1a sur RyR1 étant déjà clonés et exprimés sous forme de protéines recombinantes.

### 3. ETUDE STRUCTURALE DU DOMAINE DE RyR1 CORRESPONDANT AU SITE D'INTERACTION DE LA MCa ET DU DOMAINE A DU DHPR

#### Introduction

Dans une étude menée au laboratoire, différents fragments de RyR1 ont été exprimés sous forme de protéine recombinante (F1 à F9, figure 52) et leur capacité à interagir avec la MCa ou avec le domaine A de la sous-unité  $\alpha 1S$  du DHPR a été testée (Altafaj et al., 2005). Deux domaines, nommés F3 et F7, interagissant avec la MCa et avec le domaine A ont été identifiés sur RyR1. L'expression dans des cellules COS-7 d'un ADNc codant une forme de RyR1 déletée du domaine F7 (RyR1 $\Delta$ F7) a permis de montrer que l'absence du domaine F7 entraîne la perte totale d'interaction de RyR1 avec la MCa ou le domaine A, aboutissant à l'absence d'effet de la MCa sur la fixation de ryanodine. La poursuite de la caractérisation de ce site d'interaction a permis l'identification sur RyR1 d'une séquence de 150 acides aminés comprenant le site d'interaction avec la MCa et le domaine A du DHPR.



**Figure 52: Les différents fragments de RyR1 étudiés**

(en Haut), les différents fragments utilisés dans l'étude de Altafaj et ses collaborateurs (2005); (en bas), le fragment F7.2 (résidus 3351-3507) sur lequel on retrouve le site d'interaction de la sous-unité  $\beta 1a$  déterminé par Cheng et ses collaborateurs (2005) (en orange), la région AS1 qui fait l'objet d'un épissage alternatif (résidus 3481-3485) (en rouge) et la zone d'interaction commune à la MCa et au domaine A que j'ai déterminé (résidus 3398-3461, en bleu).

Comme nous l'avons vu précédemment les données structurales obtenues à ce jour sur RyR1 ne permettent pas la localisation précise (à l'échelle de l'acide aminé) de domaines fonctionnels du

RyR. Ceci est dû d'une part à l'absence de données structurales et également au manque d'information sur les acides aminés directement impliqués dans la régulation de RyR1.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail fut de réduire la taille de la séquence de RyR1 responsable de la liaison de M<sub>Ca</sub> et du domaine A, afin de permettre l'étude structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN) de ce domaine.

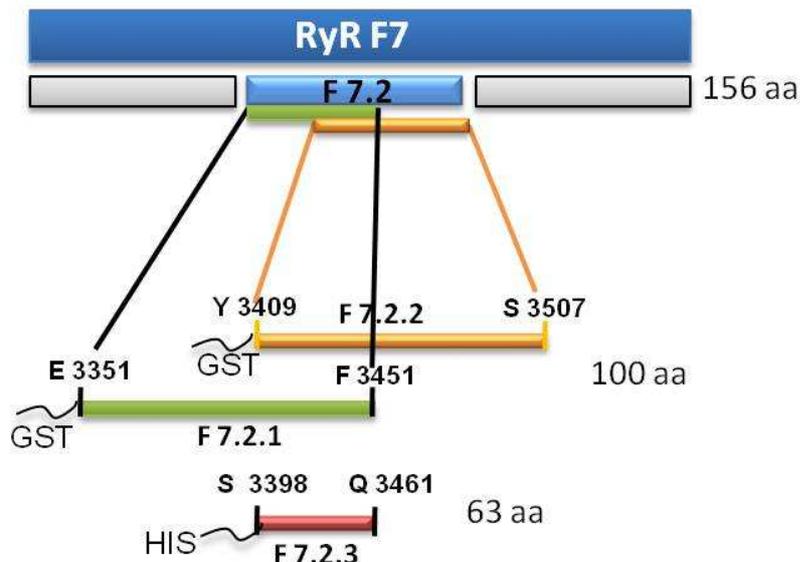
À partir de la séquence du domaine F7.2, j'ai dans un premier temps cherché à définir une séquence minimale conservant la capacité à interagir avec la M<sub>Ca</sub> et le domaine A.

Dans un deuxième temps, j'ai exprimé dans des bactéries, puis purifié ce site minimum de liaison de M<sub>Ca</sub> et domaine A. J'ai également réalisé le marquage isotopique (<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C) de ce fragment. Enfin, une étude structurale par RMN a été entamée.

### **3.1 Identification d'une séquence de RyR1 portant le site de liaison de la M<sub>Ca</sub> et du domaine A du DHPR.**

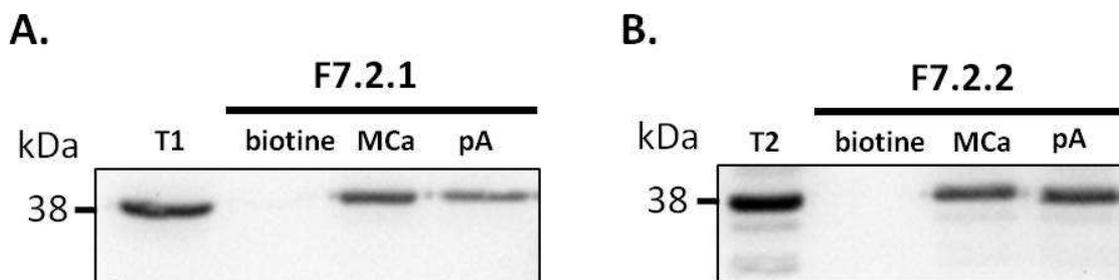
Pour cette étude j'ai réalisé le clonage de trois sous-domaines de la région F7.2, nommés F7.2.1, F7.2.2 et F7.2.3, et exprimé chacun de ces domaines sous forme de protéine recombinante en fusion avec la protéine GST ou avec une étiquette histidine (figure 53). La position relative de chacun de ces sous-domaines dans la séquence primaire de RyR1 est schématisée sur la figure 52.

La M<sub>Ca</sub> ainsi que le peptide correspondant à la séquence du domaine A de la sous-unité  $\alpha$ 1S du DHPR (pA) furent synthétisés sous forme biotinylée et immobilisée sur des billes recouvertes de streptavidine. Par des expériences de co-précipitation, j'ai alors testé l'interaction des différents domaines avec la M<sub>Ca</sub> et le domaine A. L'interaction des domaines F7.2.1, F7.2.2 et F7.2.3 est mesurée par immunomarquage des protéines interagissant avec les billes-M<sub>Ca</sub> et les billes-pA avec des anticorps reconnaissant la protéine GST ou l'étiquette histidine.



**Figure 53: Représentation schématique des différents fragments F7.2 de RyR1**

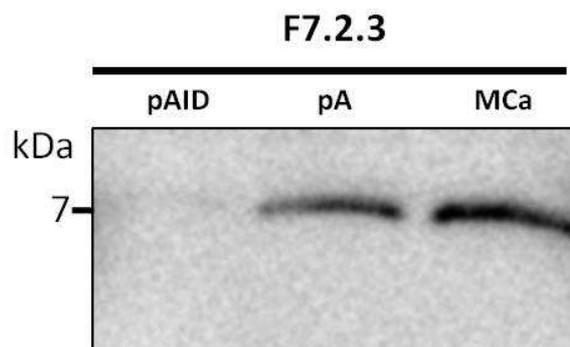
Deux protéines recombinantes possédant une étiquette GST et correspondant à deux fragments chevauchants du domaine F7.2 ont été clonées : F7.2.1 et F7.2.2. Elles comprennent 100 acides aminés chacune. Le fragment F7.2.3 (63 acides aminés) correspond à la séquence chevauchante des fragments F7.2.1 et F7.2.2. Le fragment F7.2.3 a été cloné avec une étiquette histidine.



**Figure 54: Interaction des fragments F7.2.1 et F7.2.2 avec la MCa et le peptide A**

Les protéines recombinantes GST/F7.2.1 (A) et GST/F7.2.2 (B) ont été incubées avec des billes magnétiques streptavidine recouvertes de biotine (biotine, contrôle négatif), de MCa (MCa) ou de peptide correspondant au domaine A de la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha$ 1S du DHPR (pA). T1 et T2 représentent les quantités de GST/F7.2.1 et de GST/F7.2.2 respectivement utilisées pour les expériences. La présence de GST/F7.2.1 ou GST/F7.2.2 est révélée à l'aide d'anticorps anti GST

Sur la figure 54 on peut observer l'interaction des domaines F7.2.1 et F7.2.2 avec les billes-MCa et les billes-pA comme en témoigne la présence des bandes correspondant aux fragments GST/F7.2.1 et GST/F7.2.2. Les deux domaines de RyR1 conservent donc la capacité d'interagir avec le domaine A et la MCa. L'absence de bandes lorsque l'expérience est réalisée avec des billes recouvertes de biotine seule démontre la spécificité de l'interaction.



**Figure 55: Interaction du fragment F7.2.3 avec la MCA et le peptide A**

La protéine recombinante His/F7.2.3 a été incubée avec des billes magnétiques streptavidine recouvertes de peptide AID (pAID, contrôle négatif), du peptide A (pA) ou de MCA. La présence de F7.2.3 est révélée avec des anticorps anti HIS

Les fragments F7.2.1 et F7.2.2 comportant une séquence commune de 63 acides aminés, j'ai donc cloné une protéine recombinante correspondant à cette séquence (F7.2.3). Dans le but d'obtenir une protéine de taille compatible avec les études de RMN, cette protéine fut clonée avec une étiquette histidine (figure 53). La figure 55 démontre que cette région interagit spécifiquement avec la MCA et le domaine A. Dans cette expérience le contrôle négatif utilisé est le peptide AID correspondant au domaine d'interaction de la sous-unité  $\beta 1a$  sur la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1S$ . On observe que notre protéine F7.2.3 n'interagit pas avec ce peptide.

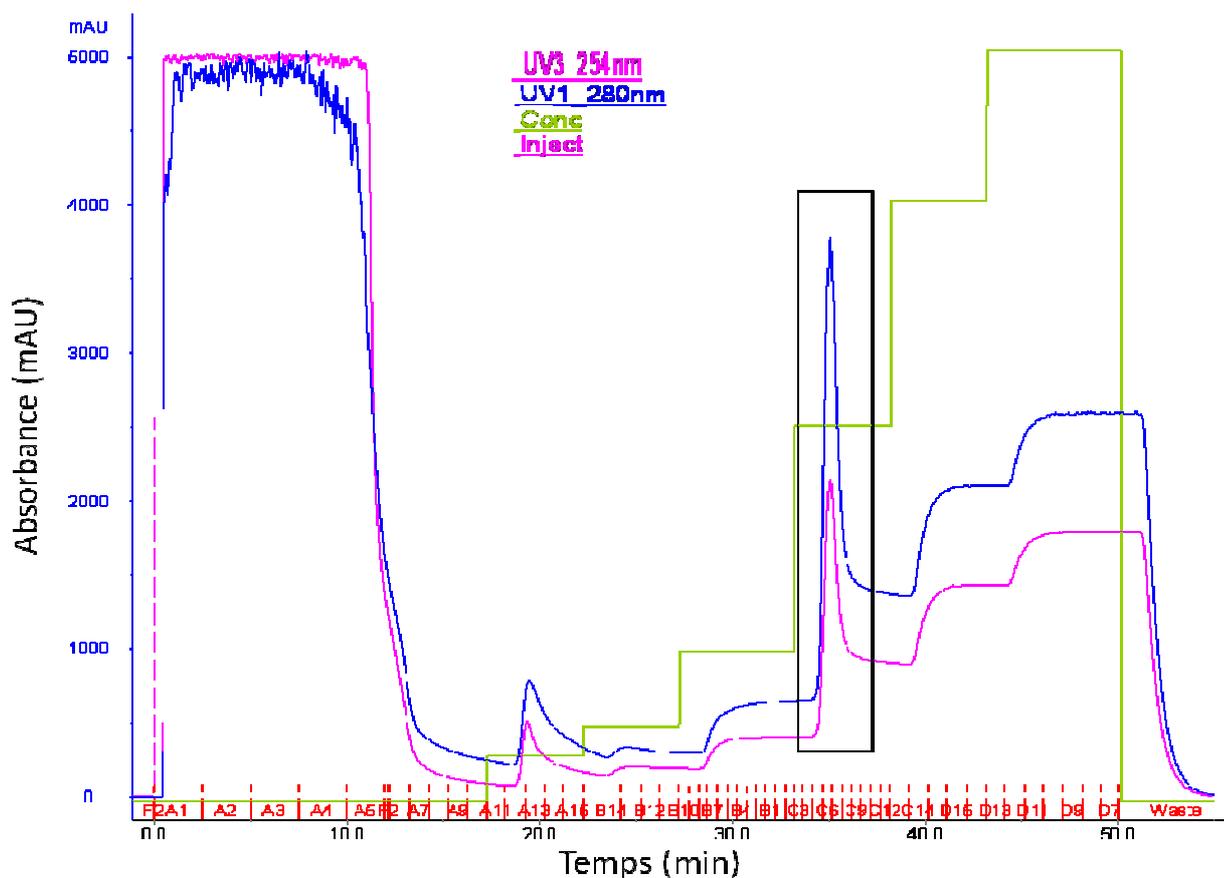
### 3.2 Expression et purification de la protéine F7.2.3

Dans le but de poursuivre la caractérisation structurale du site d'interaction identifié, il m'a fallu exprimer et purifier la protéine recombinante F7.2.3 dans des conditions particulières. En effet l'obtention de données structurales par RMN nécessite l'utilisation de protéines marquées au carbone 13 ( $^{13}C$ ) et à l'azote 15 ( $^{15}N$ ). Les isotopes  $^{12}C$  et  $^{14}N$  du carbone et de l'azote ne permettent en effet pas la mesure de signaux de RMN. Afin de remplacer les atomes de carbone ( $^{12}C$ ) et d'azote ( $^{14}N$ ) de la molécule par leur isotope  $^{15}N$  et  $^{13}C$ , les bactéries sont cultivées dans un milieu de culture minimum dont les seules sources de carbone et d'azote sont respectivement le glycérol  $^{13}C$  et le chlorure d'ammonium  $^{15}N$ . De plus, les échantillons utilisés en RMN nécessitent un degré de pureté supérieur à celui nécessaire pour réaliser des expériences de biochimie (moins de 5% d'impuretés). C'est la raison pour laquelle, l'expression et la purification de la protéine His/F7.2.3 ont nécessité une mise au point particulière. Dans un premier temps, j'ai produit la protéine recombinante avec seulement un marquage à l' $^{15}N$ .

Les protocoles d'expression et de purification standard pour les protéines recombinantes étiquetées histidine décrits au paragraphe 2.2 et 2.3 de la partie matériels et méthodes ont donc été modifiés. Les étapes non décrites dans ce paragraphe restent inchangées.

Une pré-culture de 200 mL de bactéries recombinantes est réalisée sur la nuit. Le lendemain, les bactéries sont collectées par centrifugation et lavées une fois avec le milieu minimum enrichis en  $^{15}\text{N}$  (annexe 7). Les bactéries sont alors mises en cultures dans le milieu minimum à 37°C et sous agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO d'environ 0,8. L'expression de la protéine est induite par ajout d'IPTG (0,5 mM final). Les bactéries sont alors remises en cultures à 37°C sous agitation pendant 6 heures (DO = 2). Elles sont ensuite collectées par centrifugation et congelées à -20°C.

La purification sur colonne d'affinité histidine est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre Matériels et Méthodes. La figure 56 montre le spectre d'absorption à 254 et 280 nm réalisé lors de la purification en sortie de colonne après la purification par chromatographie FPLC.

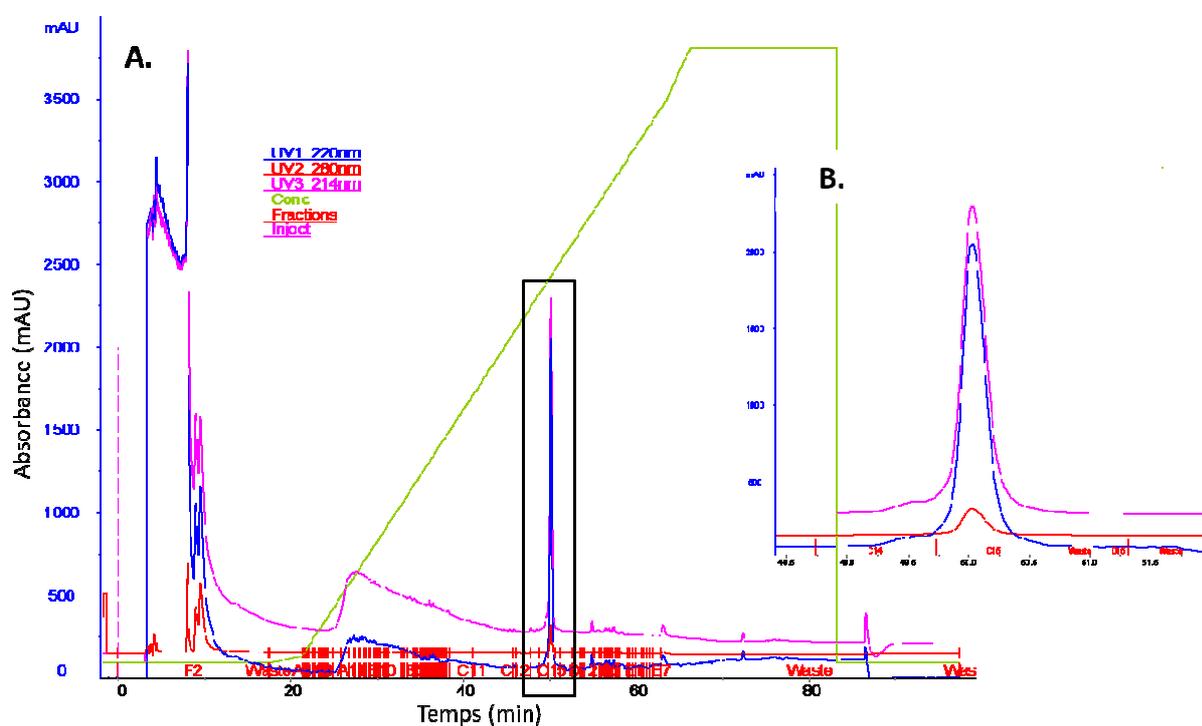


**Figure 56: Chromatogramme de la purification de la protéine recombinante His/F7.2.3 sur colonne d'affinité**

On suit l'absorbance (280 nm (trace bleue) et 254 nm (trace rose)) en fonction du temps. La protéine est purifiée selon un programme qui permet d'éluer les protéines fixées spécifiquement sur la colonne selon un gradient non linéaire d'imidazole (de 0 à 1 M, en vert sur le graphe). La protéine est éluée avec 500 mM d'imidazole (rectangle

noir, fractions C5 à C9). Les fractions (rouge) correspondant à ce pic sont récupérées.

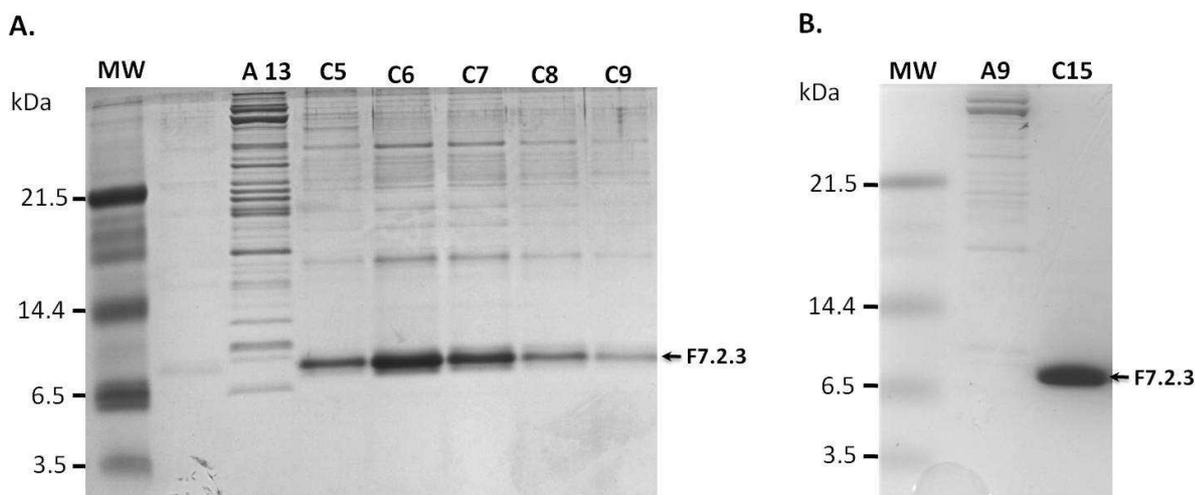
À l'issue de la purification sur colonne histidine, la protéine obtenue n'est pas assez pure pour être utilisée en RMN et se trouve dans un tampon contenant 500 mM de NaCl et 500 mM d'imidazole. Ces concentrations de NaCl et d'imidazole étant incompatibles avec les expériences de RMN et afin d'augmenter le degré de pureté de notre échantillon, j'ai réalisé une deuxième étape de purification par chromatographie d'adsorption en phase inverse sur colonne C18. La chromatographie sur colonne C18 est une technique de chromatographie haute pression (HPLC) qui permet de séparer des échantillons selon leur degré d'hydrophobicité. La figure 57 montre les spectres à 214 nm, 200 nm et 280 nm obtenus en sortie de colonne lors de cette purification.



**Figure 57: Chromatogramme de la purification de la protéine recombinante F7.2.3 sur colonne C18 en phase inverse**

On suit l'absorbance (280 nm (trace rouge), 214 nm (trace rose) et 220 nm (trace bleue)) en fonction du temps. La protéine est purifiée selon un programme qui permet d'éluer les protéines selon un gradient linéaire d'un tampon acétonitrile 90% (ACN), eau 10 % et acide trifluoroacétique 0,1% (TFA) (de 0 à 100 % d'ACN, en vert sur le graphe). (A) La protéine est éluée avec 63 % d'ACN (rectangle noir). (B) zoom sur le pic d'absorbance correspondant à la protéine F7.2.3 (rectangle noir). La fraction (C15, rouge) correspondant à ce pic est récupérée.

Un gel SDS-PAGE a permis de vérifier l'intégrité et la pureté des échantillons purifiés après chaque étape (figure 58). Après la purification sur colonne C18, l'échantillon protéique est lyophilisé.



**Figure 58: Analyse de différentes fractions protéiques correspondant aux différentes étapes de purification.**

(A). Les différentes fractions indiquées (A13 et C5 à C9) correspondent aux fractions récupérées en sortie de colonne FPLC. 10  $\mu$ L de chaque fraction ont été déposés.

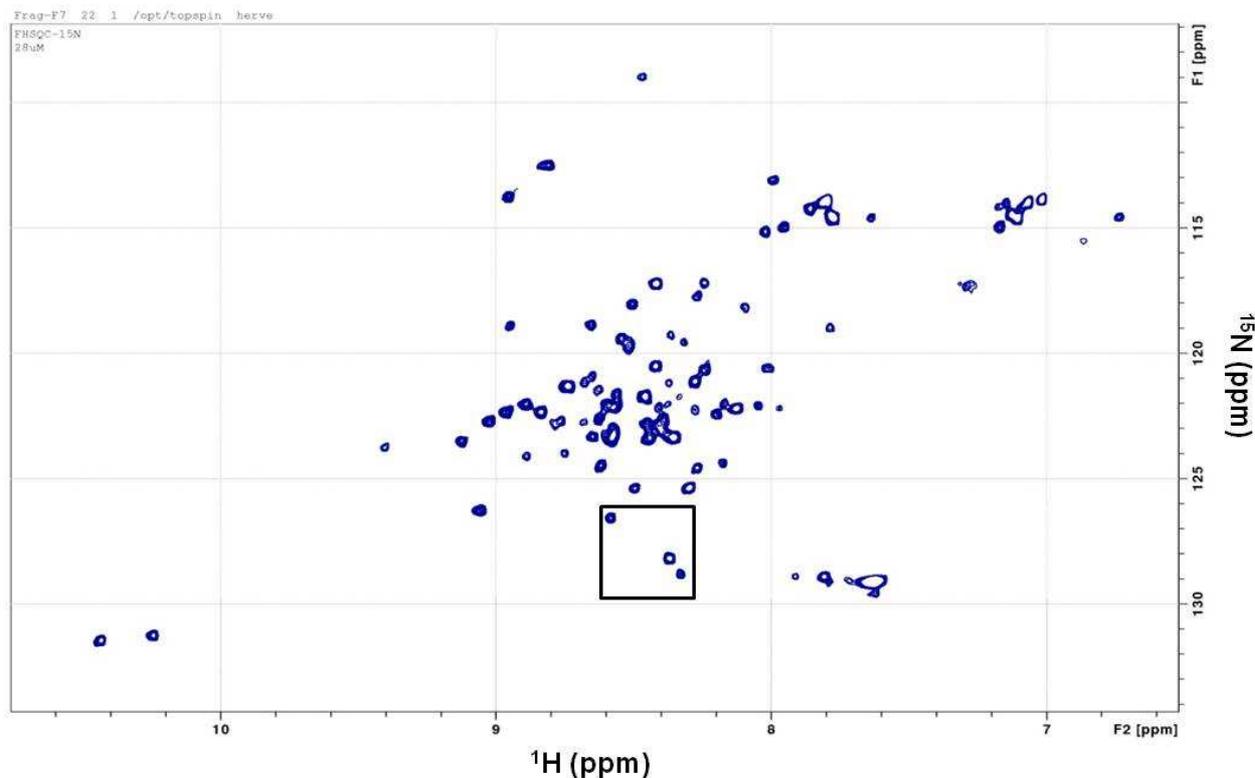
(B). Les fractions A9 et C15 correspondent aux fractions principales obtenues après passage sur la colonne C18. 20  $\mu$ L de chaque fraction ont été déposés.

### 3.3 Étude structurale du site d'interaction

En collaboration avec le Dr Hervé Darbon du laboratoire « Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques » du CNRS d'Aix-Marseille Universités, nous avons donc entamé une étude structurale du domaine F7.2.3.

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire est basé sur le fait que tous les noyaux sont caractérisés par un spin nucléaire et un moment magnétique nucléaire qui sont tous deux quantifiés. Les valeurs de spin peuvent être prévues empiriquement à partir du nombre  $p$  de protons et du nombre  $n$  de neutrons constituant le noyau. Les noyaux dont la valeur de spin est de  $\frac{1}{2}$  comme le  $^1\text{H}$ , le  $^{13}\text{C}$  ou le  $^{15}\text{N}$ , ont en fait deux états de spin et donc deux moments magnétiques possible. Si l'on applique un champ magnétique externe, les noyaux interagissent différemment suivant l'état de leur moment magnétique et acquièrent des énergies différentes. Les noyaux passent alors d'un état d'énergie à un autre en absorbant des photons, on dit qu'il y a résonance. Dans une HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation, ou corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ), sur chaque résidu de la protéine (sauf la proline) il y a transfert de résonance entre le  $^{15}\text{N}$  et le proton amide ( $^1\text{H}$ ) (couple ou groupement N-H) de la liaison peptidique. Si la protéine est repliée, chaque couple N-H aura un environnement chimique (et donc magnétique) spécifique qui va influencer sur la fréquence de résonance. Sur un spectre HSQC (figure 59 et 60), chaque tache (ou pic) de corrélation correspondra

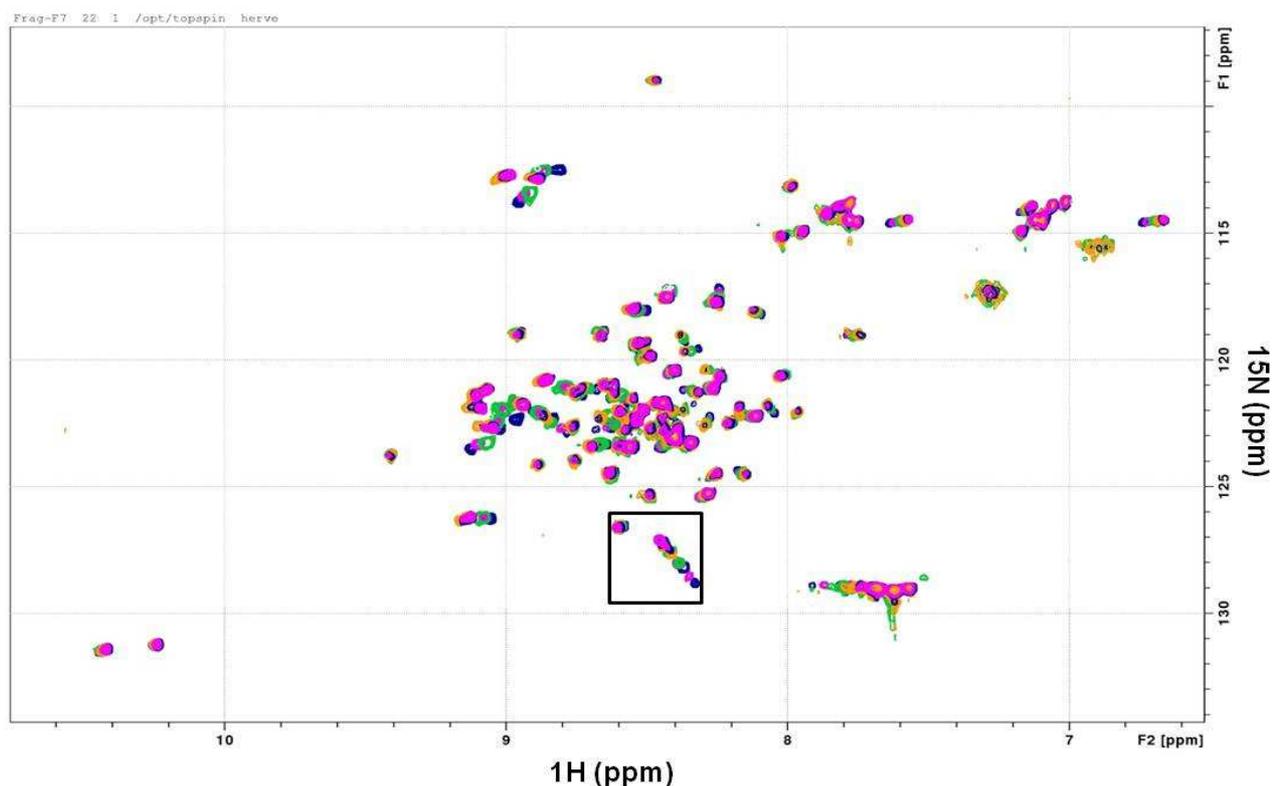
à un acide aminé de la molécule. La position de chaque pic de corrélation dépend de l'environnement immédiat du groupement N-H.



**Figure 59: Spectre HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de la protéine F7.2.3**

Un pic correspond à un acide aminé. Les fréquences de résonance sont indiquées en ppm (partie par millions) de la fréquence de résonance du proton du spectromètre (ici, 500 MHz). Le cadre noir représente les acides aminés pour lesquels la variation de fréquence en présence de MCA a été analysée en détail

La figure 59 correspond au spectre HSQC obtenu pour le fragment F7.2.3 marqué avec l'isotope  $^{15}\text{N}$ . La distribution des pics est révélatrice d'une protéine structurée avec des motifs secondaires en conformation stable. Les corrélations centrées autour de 8,5 ppm (spectre du  $^1\text{H}$ ) sont révélatrices de structures en boucles, celles comprises entre 8,5 et 10 ppm indiquent plutôt des structures étendues de type feuillet  $\beta$ . Enfin, les fréquences entre 7 et 8,5 indiquent une zone en hélice  $\alpha$ .



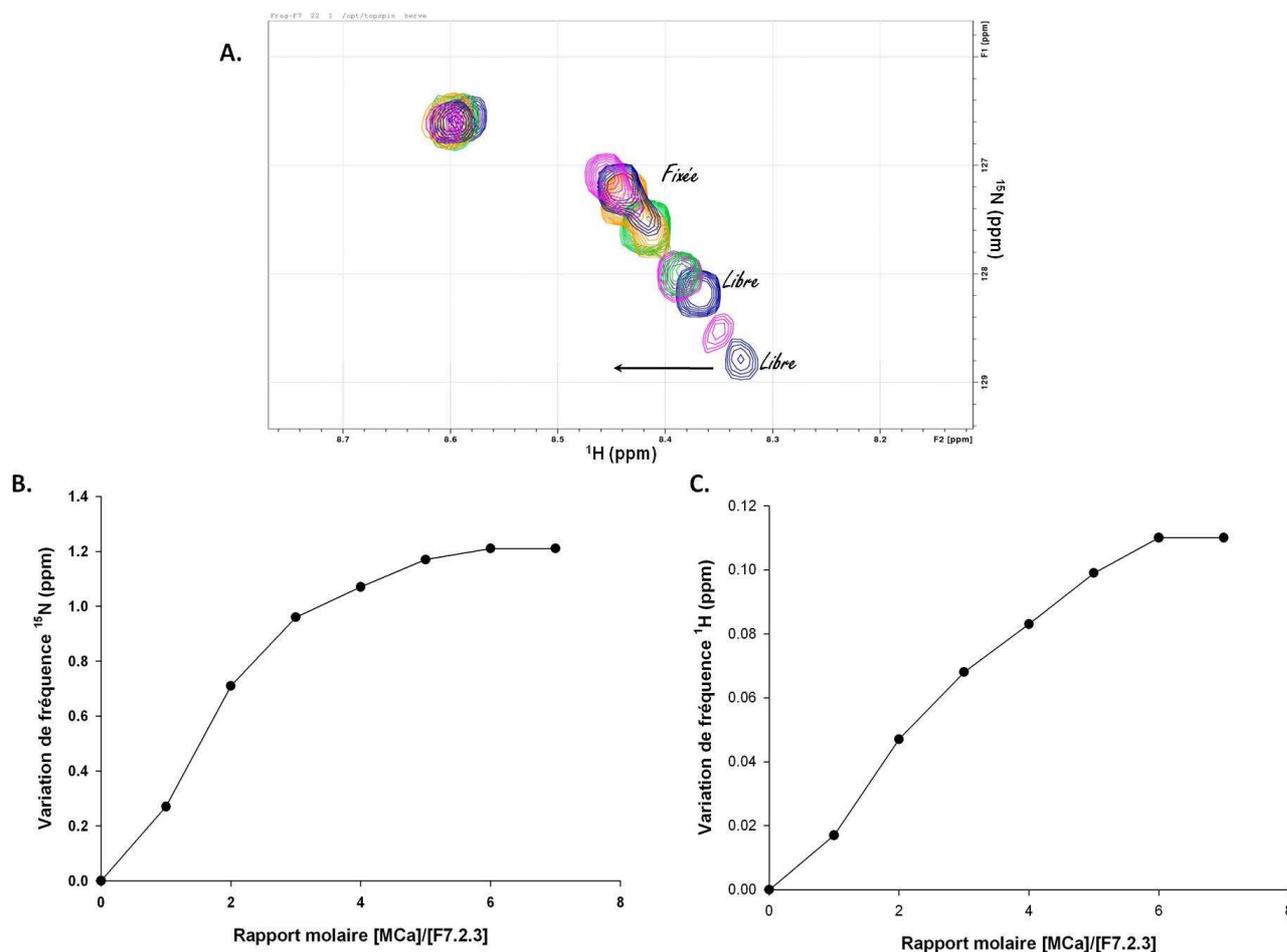
**Figure 60:** Superposition des spectres HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de la forme libre du fragment F7.2.3 et de ceux obtenus après ajout de différentes concentrations de MCA

Chaque tache de couleur correspond à un acide aminé. Les fréquences de résonance sont indiquées en ppm (partie par millions) de la fréquence de résonance du proton (ici, 500 MHz). Les différentes couleurs représentent les positions des corrélations H-N en fonction de la quantité de MCA ajoutée. Le cadre noir représente les acides aminés pour lesquels la variation de fréquence en présence de MCA a été analysée en détail (figure 59)

En HSQC, la position d'un pic dépend de son environnement magnétique et donc chimique. L'ajout d'un ligand provoque un changement d'environnement magnétique pour les couples N-H des acides aminés impliqués dans l'interaction, ce qui induit un déplacement du pic sur le spectre (figure 60). On peut ainsi suivre la valeur du déplacement des pics en fonction du rapport molaire récepteur/ligand (ici F7.2.3/MCA) (figure 61). La figure 61B et 61C montre que ce déplacement varie en fonction du rapport molaire de MCA et de F7.2.3 pour atteindre un plateau pour un rapport molaire (MCA/F7.2.3) égale à 6, ce qui montre la spécificité de l'interaction observée. La valeur absolue de ce rapport est cependant difficile à interpréter en raison des concentrations élevées de MCA et de fragment F7.2.3 utilisés.

Sur la figure 60, les pics dont la position ne change pas en présence de MCA représentent des résidus des fragments F7.2.3 situés hors de la zone d'interaction. À l'inverse, les couples N-H des résidus situés dans la zone d'interaction auront des fréquences modifiées en présence de MCA

(figure 60 et 61A). Douze acides aminés présentent une modification de spectre en présence de MCa, ce qui signifie que 12 résidus parmi les 63 qui composent le fragment F7.2.3 sont impliqués dans l'interaction avec MCa. Cette interaction représenterait une surface d'interaction d'environ  $500 \text{ \AA}^2$ .



**Figure 61: Exemple de variations chimiques induites par la MCa mesurées pour deux acides aminés.**

(A) Superposition des spectres HSQC de la forme libre du fragment F7.2.3 de RyR1 (figure, cadre noir) et de ceux obtenus avec différentes concentrations de MCa. Le spectre indique les changements de fréquences de résonance induits par l'ajout de quantité croissante de MCa libre dans le milieu pour deux acides aminés du fragment F7.2.3. Ces résidus sont impliqués dans l'interaction avec la MCa, ils passent d'une forme libre (en bleu) à une forme fixée (rose, vert, jaune).

(B) Courbe de titration, variation des fréquences de résonance  $^{15}\text{N}$  en fonction du rapport molaire de MCa/F7.2.3

(C) Courbe de titration, variation des fréquences de résonance  $^1\text{H}$  en fonction du rapport molaire de MCa/F7.2.3

## Discussion et perspectives

Au cours de ce travail, j'ai identifié une région de 64 acides aminés de RyR1 interagissant avec la M<sub>Ca</sub> et le domaine A. J'ai cloné ce domaine appelé F7.2.3 que j'ai ensuite exprimé dans des bactéries et purifié afin de permettre l'étude de sa structure tridimensionnelle par RMN. Les premiers résultats obtenus montrent l'existence de régions structurées au sein de cette protéine. Le site d'interaction de la M<sub>Ca</sub> met en jeu 12 acides aminés parmi les 63 acides aminés de ce domaine. L'étude structurale présentée ici est un travail préliminaire qui nécessite encore des approfondissements dans l'analyse des spectres et des expériences supplémentaires pour aboutir à une structure 3D complète du fragment F7.2.3. Pour cela, j'ai produit la protéine F7.2.3 sous une forme doublement marquée (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N). L'objectif final de cette étude est de réaliser la structure des complexes M<sub>Ca</sub>/F7.2.3 et peptide A/F7.2.3. Ce travail permettra l'identification précise des acides aminés impliqués dans l'interaction M<sub>Ca</sub>/RyR1 et domaine A/RyR1. En étudiant les déplacements chimiques induits par ces derniers, nous pourrons réaliser une étude comparative du positionnement de ces deux ligands sur leur site d'interaction commun.

Ce travail, une fois terminé proposera la première structure atomique d'un site fonctionnel important de RyR1 en interaction avec la M<sub>Ca</sub> et avec le domaine A. L'obtention de cette structure représentera une étape très importante non seulement pour la compréhension du positionnement de la M<sub>Ca</sub> et du domaine A sur RyR1 mais permettra également, par modification des acides aminés impliqués dans cette interaction d'étudier leurs rôle dans le contrôle de l'activité de RyR1.

Les études structurales de RyR1 réalisées à ce jour par cryomicroscopie électronique ont permis de positionner les sites de fixations de plusieurs protéines sur le modèle de structure tridimensionnelle de RyR1. Parmi celles-ci, une autre toxine de scorpion, l'impératoxine (IpTxa) se fixe dans une région cytoplasmique de RyR1 délimitée par les domaines 3,7 et 8. Plusieurs éléments semblent indiquer que les domaines F3 et F7 identifiés comme interagissant avec la M<sub>Ca</sub> et le domaine A, pourraient se trouver dans des régions de RyR1 correspondant aux bords de la poche formée par les domaines 3, 7 et 8. Au sein d'une telle poche d'interaction, la région F7.2.3 pourrait représenter le point d'ancrage du domaine A, cette interaction serait stabilisée par l'interaction avec le domaine F3.

Au niveau fonctionnel, plusieurs études ont apporté des éléments démontrant que la région F7.2 de RyR1 influençait le couplage à plusieurs niveaux. En effet, elle contient le site d'interaction identifié pour  $\beta$ 1a et dont la délétion a montré qu'il influait sur le CEC (figure 52) (Cheng et al.,

2005). Ce site se situe 30 acides aminés en aval de la région F7.2.3 que nous avons identifiée comme site d'interaction pour le domaine A. On pourrait donc imaginer que l'interaction F7.2.3 /pA puisse modifier ou réguler l'interaction  $\beta$ 1a/RyR au sein de la poche et influencer ainsi sur le CEC.

La séquence nucléotidique F7.2 de RyR1 comprend la séquence Ala3481-Gln3485 dont l'expression est régulée au cours du développement par l'épissage de l'exon appelé AS1 (Futatsugi, Kuwajima & Mikoshiba, 1995). L'isoforme juvénile de RyR1 ne possède pas cet exon alors qu'on le trouve dans l'isoforme adulte. Il a été montré que le domaine correspondant à l'exon AS1 influence l'activité canal de RyR1 via une interaction inter-domaine avec une autre région de RyR1 (Kimura et al., 2009; Kimura et al., 2007). Ces auteurs ont aussi montré qu'un peptide correspondant à la séquence Thr<sup>3471</sup>-Gly<sup>3500</sup>, appelé peptide AS1, possède une structure tridimensionnelle ressemblant à celle du peptide correspondant au domaine A (figure 52). L'épissage de l'exon ASI entraîne une augmentation de l'amplitude du relâchement de calcium induit par dépolarisation, suggérant que cette séquence pourrait jouer un rôle inhibiteur de RyR1 en stabilisant une interaction intramoléculaire entre différents domaines de RyR1. L'hypothèse proposée par ces auteurs est que la fixation du domaine A sur RyR1 pourrait déstabiliser le module inhibiteur formé par AS1 et permettre une levée d'inhibition préalable au CEC. *In vivo*, ce rôle serait joué par le domaine A de la boucle II-III.

Grâce à la structure précise du site d'interaction du domaine A et de la M<sub>Ca</sub> sur RyR1, il nous sera possible d'identifier précisément les acides aminés impliqués dans cette interaction. Le rôle fonctionnel de cette interaction pourra alors être évalué *in situ* par l'expression de constructions modifiées ou mutées sur ces acides aminés dans des myotubes de souris dysgéniques ou dyspédiques.

## 4. ETUDE DE L'EFFET DE LA MCA SUR LES MYOTUBES DYSGENIQUES

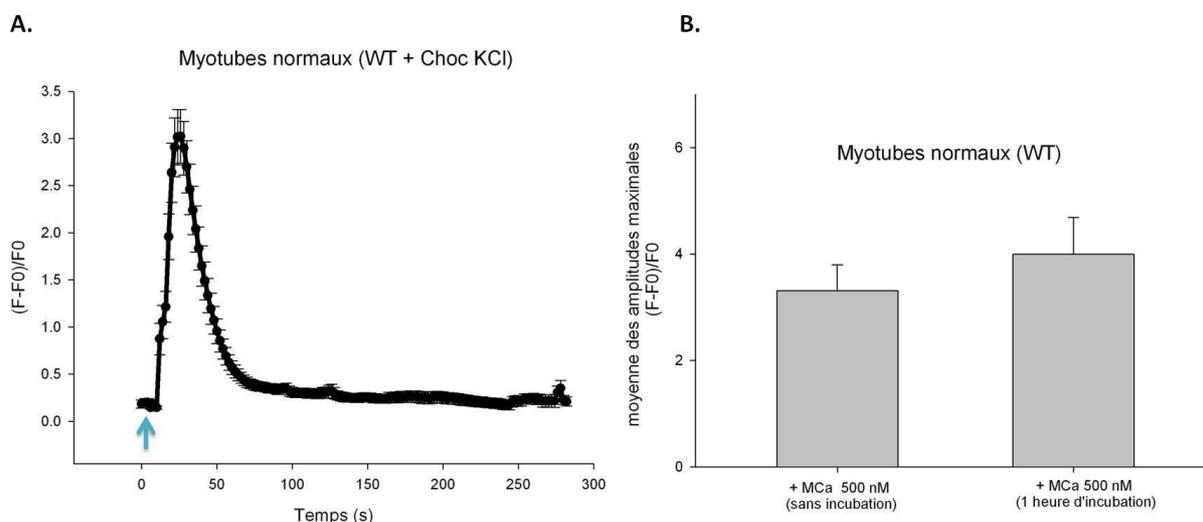
Comme je le rappelle au paragraphe 3.4 de la partie introduction, différentes études ont montré que la MCa est un effecteur puissant du RyR1. Une analogie de séquences avec le domaine A de la sous-unité  $\alpha 1S$  ainsi que le fait qu'elle partage un site de fixation sur RyR1 avec le peptide correspondant au domaine A, a poussé les chercheurs à s'intéresser à son effet sur RyR1 dans le cadre du CEC au sein de la fibre musculaire. Les études menées ont utilisé deux modèles différents : (1) des myotubes obtenus à partir de cultures primaires et (2) des fibres musculaires adultes.

Les études réalisées sur des myotubes en culture démontrent la capacité de la MCa à déclencher un relâchement de  $Ca^{2+}$  à partir du RS et à augmenter fortement l'activité spontanée de RyR1, suggérant un ciblage préférentiel des RyR1 non couplés au DHPRs par la MCa (Esteve et al., 2003; Szappanos et al., 2005). Les études sur fibres musculaires adultes montrent (1) que l'effet de la MCa n'est observable que lorsque le processus de CEC est activé et (2) que dans ce cas la MCa induit un défaut dans la fermeture de RyR1 suivant la repolarisation de la membrane plasmique qui se traduit par une augmentation de la durée du transitoire calcique (Jacquemond, 1997; Pouvreau et al., 2006).

Ces études ont amené leurs auteurs à proposer un modèle au sein duquel ; dans la fibre musculaire au repos, le couplage DHPR/RyR1 empêche l'interaction de la MCa avec le RyR1. Cette absence d'interaction serait dans ce modèle due à l'encombrement stérique provoqué par l'interaction du domaine A sur le site de fixation de la MCa sur RyR1. La dépolarisation de la membrane plasmique, provoquerait une déstabilisation de l'interaction domaine A/RyR1 et autoriserait alors l'interaction MCa/RyR1

Ces différents travaux suggèrent que dans la fibre musculaire, l'accès et/ou l'action de la MCa sur RyR1 sont contrôlés par la présence de la sous-unité  $\alpha 1S$ . Nous avons donc décidé de caractériser l'effet de la MCa sur RyR1 dans des myotubes en absence de la sous-unité  $\alpha 1S$ , c'est-à-dire dans des myotubes dysgéniques. En raison de l'absence d'  $\alpha 1S$ , ces myotubes ne présentent pas de transitoires calciques en réponse à une dépolarisation et sont incapables de se contracter (figure 63). J'ai donc étudié l'effet de la MCa sur la concentration cytoplasmique de  $Ca^{2+}$ . L'approche méthodologique utilisée pour la mesure des variations de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique est identique à celle utilisée précédemment (résultats paragraphe 2.2) et est basée sur l'utilisation de la sonde Fluo 4AM.

Dans un premier temps, j'ai voulu vérifier l'effet de la M<sub>Ca</sub> sur le CEC dans des myotubes normaux (en présence de la sous-unité  $\alpha 1S$ ). Les résultats présentés sur la figure 62 B montrent l'absence d'effet de la M<sub>Ca</sub> sur l'amplitude du transitoire  $Ca^{2+}$  déclenché par une augmentation de la concentration de KCl, confirmant que la M<sub>Ca</sub> n'a pas d'effet sur RyR1 en présence de la sous-unité  $\alpha 1S$ . En effet, sans incubation ou après incubation pendant une heure avec 500 nM de M<sub>Ca</sub>, les transitoires observés après dépolarisation par choc KCl ne diffèrent ni en amplitude, ni en forme de ceux observés sans M<sub>Ca</sub>.

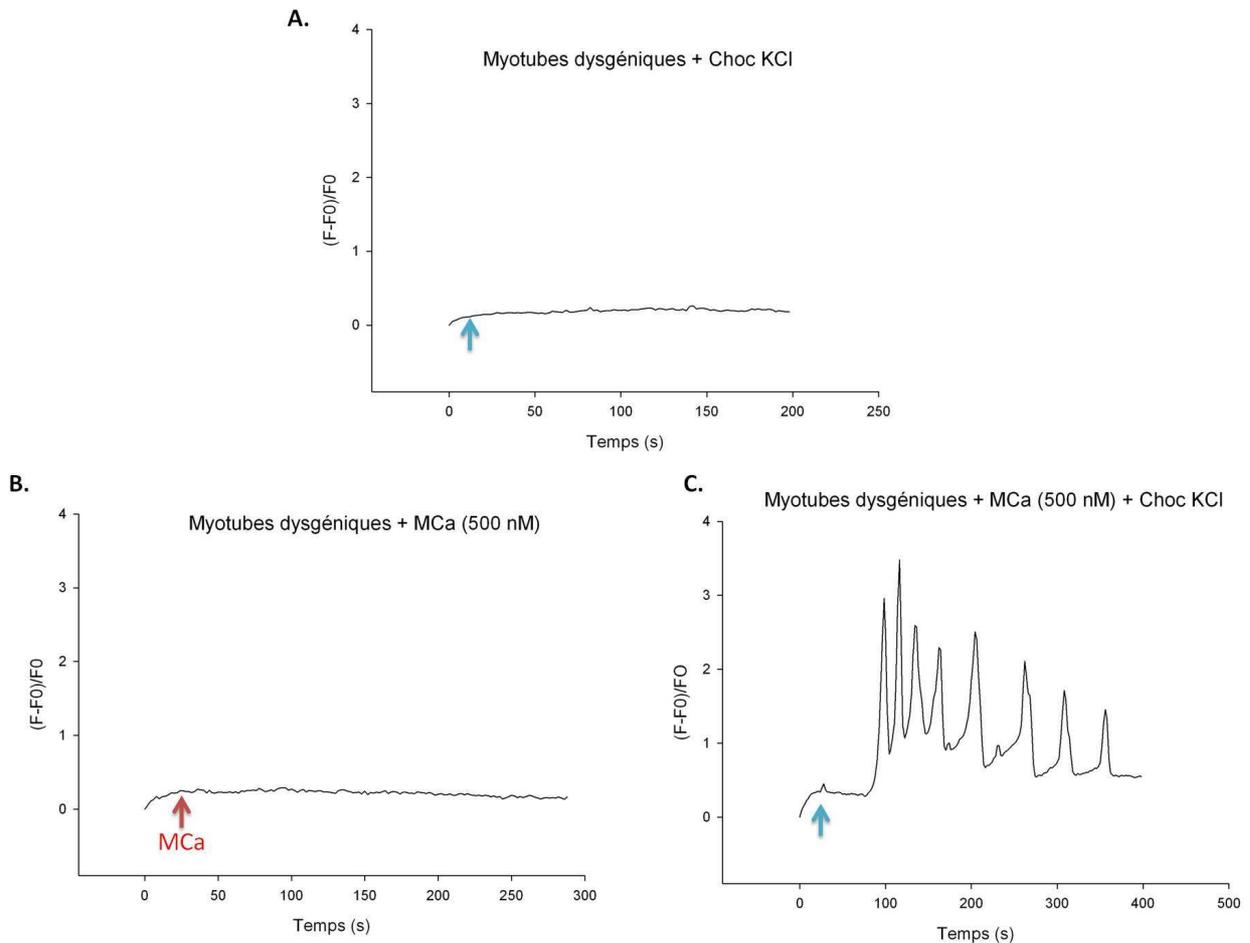


**Figure 62: Effet de la dépolarisation au KCl et de la M<sub>Ca</sub> sur des myotubes normaux**

(A). Moyenne des transitoires calciques mesurés sur des myotubes normaux (n=16). Les myotubes sont chargés avec 5  $\mu M$  d'un indicateur fluorescent pour la mesure du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique (Fluo4AM, Invitrogen). La dépolarisation de la membrane plasmique est obtenue par perfusion dans le milieu extracellulaire d'une solution de KCl (140 mM) (flèche bleue). L'amplitude des transitoires calciques obtenus est mesurée par une variation de fluorescence (F-F<sub>0</sub>/F<sub>0</sub>) (B). Représentation de la moyenne des amplitudes maximales des transitoires calciques mesurés sur des myotubes normaux (n=16).

Dans un second temps, j'ai réalisé le même type d'expériences sur des myotubes dysgéniques. Les résultats sont regroupés figure 63. L'enregistrement présenté sur la figure 63 A montre l'absence totale de variation de la concentration cytoplasmique de  $Ca^{2+}$  dans les myotubes dysgéniques exposés à une dépolarisation par augmentation de la concentration de KCl. Ce résultat attendu traduit l'absence de sous-unité  $\alpha 1S$  dans ces myotubes et donc l'absence totale de CEC. L'enregistrement présenté sur la figure 63 B montre que l'addition dans le milieu extracellulaire de M<sub>Ca</sub> (500 nM concentration finale) n'induit aucune modification de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique mesurée sur plusieurs minutes suivant l'addition de M<sub>Ca</sub>. De façon surprenante, la

MCa seule n'a donc pas d'effet sur les myotubes dysgéniques. A l'inverse, nous avons pu observer un résultat particulièrement intéressant et complètement différent lorsque les myotubes dysgéniques préalablement incubés avec la MCa sont soumis à une dépolarisation. Ce résultat est présenté figure 63C. En effet, dans ces conditions on observe une augmentation rapide de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la dépolarisation de la membrane plasmique. Cette réponse calcique diffère du transitoire calcique observé sur des myotubes normaux. En effet l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  induite dans les myotubes dysgéniques par la dépolarisation en présence de MCa présente un caractère oscillatoire et une amplitude plus faible que celle du transitoire calcique observé sur les myotubes normaux. Un tel signal calcique a pu être observé dans 24% des myotubes dysgéniques (sur un total de 167 myotubes) incubés en présence de MCa et soumis à une dépolarisation. Le caractère oscillatoire de cette variation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique suggère l'induction d'un processus de relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par le  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR).



**Figure 63 : Effet de la MCa sur les myotubes dysgéniques**

Les transitoires calciques types observés sont représentés. Ils ont tous été mesurés sur des myotubes dysgéniques. (A). Réponse observée lorsque les myotubes sont directement soumis à une dépolarisation au KCl. (B). Réponse observée lorsque les myotubes sont exposés à une injection de MCa (flèche rouge) (500 nM finale), ces myotubes ne sont pas soumis à un choc KCl. (C). Réponse observée lorsque les myotubes sont soumis à une dépolarisation au KCl après 1 heure d'incubation avec de la MCa (500 nM finale).

Les myotubes sont chargés avec 5  $\mu\text{M}$  d'un indicateur fluorescent pour la mesure du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique (Fluo4AM, Invitrogen). La dépolarisation de la membrane plasmique est obtenue par perfusion dans le milieu extracellulaire d'une solution de KCl (140 mM) (flèche bleue). L'amplitude des transitoires calciques obtenus est mesurée par une variation de fluorescence  $(F-F_0)/F_0$

Ce résultat montre pour la première fois que la présence de MCa induit le rétablissement d'une variation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique induite par la dépolarisation de la membrane plasmique en absence de sous-unité  $\alpha 1S$ .

Plusieurs hypothèses peuvent être faites pour expliquer ce résultat.

a) La MCa pénètre dans les myotubes dysgéniques et se fixe sur RyR1. En se fixant sur RyR1 la MCa augmente leur sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique. Lors de la dépolarisation, une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage, autres que les DHPR, pourrait alors induire

l'activation de RyR1 et le déclenchement d'un relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les courants portés par les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type T pourraient représenter cette voie d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ .

b) La M<sub>Ca</sub> pénètre dans les myotubes, se fixe sur RyR1 et joue un rôle de détecteur de potentiel. En réponse à la dépolarisation membranaire, la M<sub>Ca</sub> (représentant un dipôle) changerait de position et pourrait ainsi activer RyR1. Le  $\text{Ca}^{2+}$  relâché par cette activation pourrait alors induire à son tour le processus de CICR.

Afin de vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses, plusieurs protocoles ont été mis en place. Dans un premier temps, ces expériences ont été répétées en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ou en présence de Nickel. Dans ces deux conditions, les courants  $\text{Ca}^{2+}$  potentiellement activateurs sont très fortement diminués. Cependant le fait que l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par dépolarisation en présence de M<sub>Ca</sub> ne soit observée que dans 24% des cas, oblige à l'enregistrement d'un grand nombre de myotubes et nous empêche jusqu'ici d'avoir des résultats significatifs confirmant ou infirmant nos différentes hypothèses.



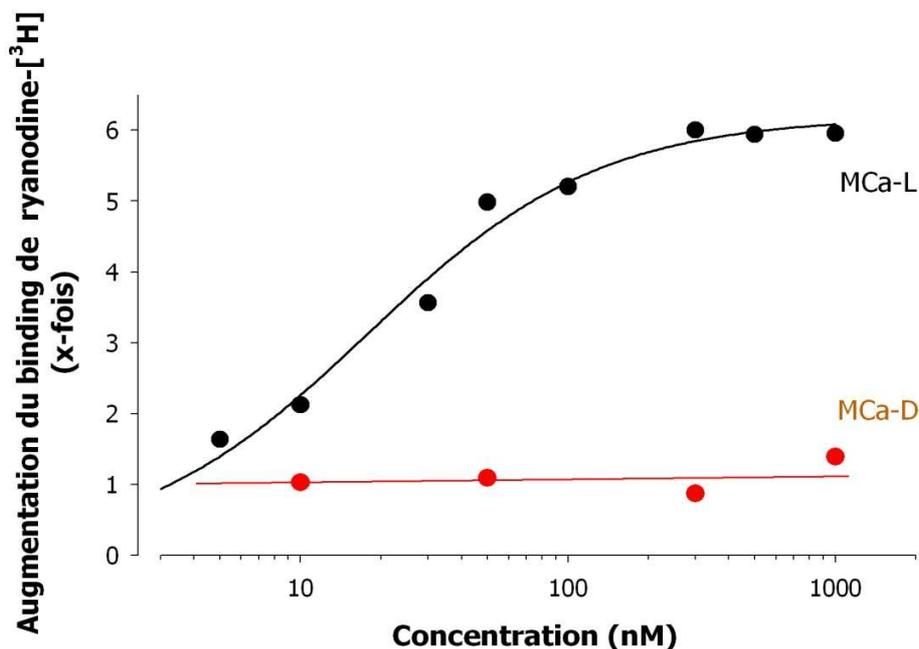
## 5. CARACTERISATION DE LA MCA-D, UN ANALOGUE PHARMACOLOGIQUEMENT INERTE DE LA MCA

Les caractéristiques de la MCA et surtout sa capacité à traverser passivement les membranes plasmiques font d'elle un membre de la famille des peptides de pénétrations cellulaires (ou CPP, Cell penetrating peptide). Ces derniers ont largement été décrits comme étant capables de transporter à l'intérieur des cellules des composés imperméants, faisant de ce type de molécules des vecteurs de pénétration idéaux pour des applications *in vivo*. Par comparaison avec les autres CPPs connus, la MCA présente plusieurs avantages : (1) sa structure 3D est plus stable, (2) elle pénètre dans les cellules à des concentrations plus faibles et (3) elle présente une toxicité moins élevée. Mais son activité pharmacologique sur RyR1 est un frein pour d'éventuelles applications *in vivo*. Plusieurs études ont donc été menées pour rechercher un analogue de la MCA n'ayant pas d'effet sur RyR1 mais conservant leur capacité de pénétrer dans les cellules (Mabrouk et al., 2007; Ram et al., 2008b). Cependant, les tentatives pour obtenir un tel analogue ont jusque-là conduit à des peptides moins efficaces pour la pénétration cellulaire.

Tous les acides aminés, à part la glycine, dont la chaîne latérale est composée d'un seul hydrogène, peuvent exister sous la forme de deux énantiomères optiquement actifs, traditionnellement appelés D et L. Selon que le groupement  $\text{NH}_2$  se trouve respectivement à droite ou à gauche dans la projection de Fischer, un acide aminé sera D ou L. On parle aussi d'isomères D ou L. Par conséquent, un peptide peut être soit D, soit L selon la configuration des acides aminés qui le composent. Les deux isomères d'un acide aminé sont l'image l'un de l'autre dans un miroir. Cependant, les acides aminés L représentent la quasi-totalité des acides aminés naturels trouvés dans les molécules du vivant. Au sein des cellules, à quelques exceptions près (ADN, paroi cellulaire) des enzymes dégradent les acides aminés D.

Les isomères D de molécules ligands sont donc supposés perdre leur capacité à reconnaître leur cible pharmacologique. Nous avons synthétisé une molécule de MCA à partir d'acides aminés D. Cette MCA-D présente une structure tridimensionnelle similaire à celle de la MCA mais qui est son symétrique par rapport à un plan. Nous avons regardé quels étaient les effets de la MCA-D sur RyR1 en analysant deux paramètres, la liaison de ryanodine- $^3\text{H}$  qui nous renseigne indirectement sur l'état d'activation du canal (ouverture) et le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir de vésicules de RS (HSR).

### Effet sur la liaison de ryanodine

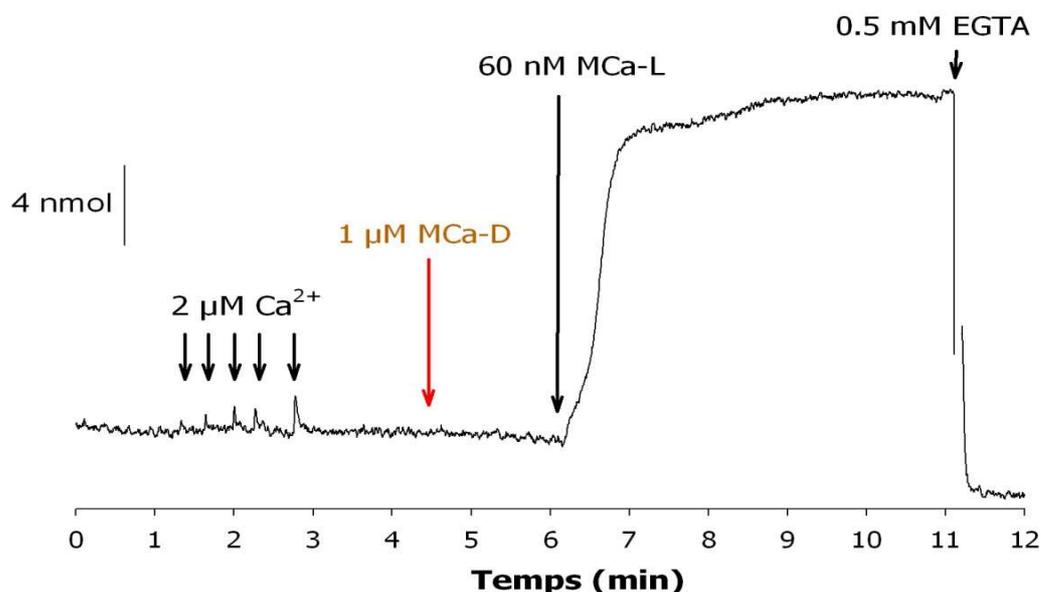


**Figure 64: Effet des MCa-D et -L sur la liaison de ryanodine**

La liaison de ryanodine-<sup>3</sup>H (Ry-<sup>3</sup>H) sur des vésicules de HSR (enrichis en RyR1) purifiés a été mesurée en présence de concentration croissante de MCa-L (rond noir) ou de MCa-D (ronds rouges), après 2 heures d'incubation à 37°C en présence de 10 nM de Ry-3H et de 2 mM de Ca<sup>2+</sup>. Pour toutes les conditions, la liaison non spécifique est constante et représente moins de 8% de la liaison totale de ryanodine. La MCa-D n'a pas d'effet sur la liaison de Ry-3H. L'expérience est réalisée en triplicate.

Comme cela a déjà été montré à plusieurs reprises, la MCa-L augmente fortement la liaison de ryanodine sur RyR1. La MCa-L augmente au maximum 6,2 fois la liaison de ryanodine tritiée par rapport à la valeur initiale et son EC50 est de 17,8 nM. Contrairement à la MCa-L, des concentrations de l'ordre du  $\mu$ M de MCa-D n'ont aucun effet sur la liaison de ryanodine (figure 64).

### Effet sur le relâchement de $\text{Ca}^{2+}$



**Figure 65: Effet des MCa-D et -L sur le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir de vésicules de HSR**

Le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  est mesuré en utilisant un colorant sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  libre (l'antipyrylazo III). L'Absorbance à 710 nm de l'antipyrylazo III est suivie.

Les vésicules de HSR ont été chargées avec du  $\text{Ca}^{2+}$  via 5 injections de 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la chambre d'enregistrement. L'ajout d' 1  $\mu\text{M}$  de MCa-D n'a aucun effet sur le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$ , alors que l'ajout subséquent de 60 nM de MCa-L produit un relâchement massif et persistant de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ajout de 0.5 mM d'EGTA chélaté le  $\text{Ca}^{2+}$  relâché et provoque une diminution de l'absorbance.

De la même manière, la figure 65 montre qu'une concentration de 60 nM de MCa-L induit un relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  massif à partir de vésicules de HSR alors que l'ajout dans le milieu extra vésiculaire de 1  $\mu\text{M}$  de MCa-D ne provoque aucune libération de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'addition de MCa-L étant réalisée juste après celle de MCa-D, on peut en déduire que la MCa-D n'interagit plus avec RyR1.

Ces résultats démontrent clairement que l'isoforme D de la MCa a perdu toutes ses capacités d'activation du RyR1. Ils confirment ainsi que la structure 3D de la MCa joue un rôle primordial pour son action sur le RyR. Cet isoforme pourra servir dans l'étude du site d'interaction du domaine A sur RyR1.

Plusieurs études ont été menées pour rechercher un analogue de la MCa n'ayant pas d'effet sur RyR1 mais conservant leur capacité de pénétrer dans les cellules (Mabrouk et al., 2007; Ram et al., 2008b). Cependant, les tentatives pour obtenir un tel analogue ont jusque-là conduit à des peptides moins efficaces pour la pénétration cellulaire.

Les propriétés de pénétration cellulaire de la MCa-D ont donc été étudiées grâce au marquage de cette molécule à l'aide de 5(6)-carboxyfluorescein (FAM). Cette approche a permis de montrer que la MCa-D conserve des propriétés de pénétration identique à celles de la MCa-L. les résultats présentés ci-dessus qui montrent que l'isoforme D de la MCa a perdu sa capacité à activer RyR1 y ont été associés et publiés dans un article (voir article Poillot et al. 2010) (annexe 3).

## DISCUSSION GENERALE



# DISCUSSION GENERALE

Au cours de ma thèse, j'ai donc caractérisé plusieurs interactions inter et intramoléculaires au sein du complexe de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  qui réunit le RyR et le DHPR. J'ai d'abord montré l'existence d'interactions intramoléculaires entre les différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1\text{S}$  du DHPR centrées autour du domaine A de la boucle II-III. J'ai également localisé le site d'interaction de la cavéoline-3 sur la boucle I-II. Ce domaine est différent du domaine AID de la boucle I-II impliqué dans l'interaction avec la sous-unité  $\beta 1\text{a}$ . L'étude de l'interaction de la sous-unité  $\beta 1\text{a}$  avec RyR1 a mis en évidence (1) que l'affinité apparente de  $\beta 1\text{a}$  pour le RyR est fortement augmentée par l'interaction de  $\beta 1\text{a}$  avec  $\alpha 1\text{S}$  (2) que la région C-terminale de  $\beta 1\text{a}$  contrôle l'interaction  $\beta 1\text{a}/\text{RyR1}$ , et (3) que l'interaction  $\beta 1\text{a}/\text{RyR1}$  régule la fermeture de RyR1. J'ai aussi identifié un domaine minimum de RyR1 responsable de la fixation de la M $\text{Ca}$  et du domaine A. Son étude structurale par RMN a permis de démontrer qu'il présente des structures secondaires stables et que l'interaction avec la M $\text{Ca}$  implique 12 acides aminés. Enfin, l'étude de l'effet de la M $\text{Ca}$  sur RyR1 dans des myotubes dysgéniques m'a permis de montrer que la M $\text{Ca}$  est capable de restaurer, en absence de DHPR, une augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique induite par la dépolarisation de la membrane plasmique.

Les modèles tridimensionnelles du RyR et du DHPR suggèrent l'existence d'une large surface de contact entre le DHPR et le RyR1. De même, les différentes études fonctionnelles montrent que la mise en place d'un couplage efficace entre RyR1 et DHPR (orthograde et rétrograde) nécessite la mise en place d'interactions multi-points qui ne se limite pas à une simple interaction entre la boucle II-III et RyR1. Les résultats que j'ai obtenus confirment l'implication de plusieurs domaines ou protéines cytoplasmiques dans la régulation du couplage DHPR/RyR.

Cependant, la recherche sur le couplage DHPR/RyR souffre du manque de données cristallographique ou de résonance magnétique nucléaire concernant les deux canaux impliqués. Principalement en raison de la grande taille de ces derniers, notamment celle du RyR. D'où la stratégie que nous avons adoptée, qui consiste à réaliser une étude structurale d'un domaine précis, dont on sait qu'il est impliqué dans le processus de couplage. Notre travail présente la particularité d'être la première étude structurale d'un site fonctionnel du RyR en interaction avec une toxine et représente une étape très importante dans la compréhension de l'effet de la M $\text{Ca}$  et du domaine A sur le RyR.

Les récentes données structurales obtenues par RMN ont permis de déterminer la structure de plusieurs des régions de la boucle II-III ainsi que celle de la boucle entière (Casarotto et al., 2000; Cui et al., 2005; Cui et al., 2009; Tae et al., 2009). Ces résultats permettent 3 constats principaux : 1) les structures déterminées pour les différents fragments peptidiques de la boucle II-III sont les mêmes que celles de ces domaines dans la boucle entière, 2) globalement la boucle II-III est non structurée, la région la plus structurée correspondant au domaine A qui forme une hélice  $\alpha$ ; le reste de la boucle adopte plutôt une conformation aléatoire (pelote statistique ou « *random coil* »), et 3) le domaine A se fixe sur un domaine de RyR1 appelé SPRY2. Ce domaine SPRY2 qui montre également une interaction de faible affinité avec le domaine C (Cui et al., 2009) est situé dans la partie N-terminale du domaine F3 identifié comme un site de fixation du domaine A et de la MCa comme évoqué à plusieurs reprises dans ce manuscrit (voir paragraphe 3.3 et figure 29 de la partie introduction). Plusieurs études montrent que les domaines F3 et F7 de RyR1 (figure 29 et 52) jouent un rôle fonctionnel dans la communication entre le DHPR et RyR1. Des expériences utilisant des chimères RyR1/RyR2 ou RyR1/RyR3 ont permis l'identification de régions de RyR1, incluant les domaines F3 et F7, impliquées à la fois dans le couplage orthograde et le couplage rétrograde (Nakai et al., 1998a; Perez et al., 2003a; Proenza et al., 2002) (figure 29). De plus, les reconstitutions tridimensionnelles du RyR1 semblent indiquer que ces deux domaines, bien qu'éloignés l'un de l'autre sur la séquence de RyR1 se retrouvent proche l'un de l'autre dans le RyR1 replié (Samso et al., 1999; Samso & Wagenknecht, 2002; Wagenknecht & Samso, 2002). Le domaine F3 contenant le domaine SPRY2 et le domaine F7 pourraient donc former ensemble une poche d'interaction correspondant au site de fixation du domaine A et de la MCa. Le domaine F7 présente une interaction plus forte avec la MCa et le domaine A que celle observé avec le domaine F3. De plus, son absence provoque à la fois une perte des interactions et la disparition de l'effet de la MCa sur la liaison de ryanodine sur RyR1 (Altafaj et al., 2005). Nous avons donc décidé de caractériser plus précisément la zone d'interaction avec F7. Dans la poche d'interaction formée par F3 et F7, la région F7.2.3 que nous avons identifiée comme zone minimale d'interaction avec la MCa et le domaine A pourrait être le point d'ancrage principale du domaine A et de la MCa. Le domaine F3 pourrait alors jouer un rôle stabilisateur de cette interaction. L'obtention de la structure à l'échelle atomique du complexe F7.2.3/MCa et du complexe F7.2.3/domaine A représente une avancée qui devrait permettre de vérifier la possibilité de l'existence d'un complexe F7/MCa/F3 ou F7/domaine A/F3. De plus, ce résultat va permettre de définir les acides aminés de RyR1 strictement impliqués dans l'interaction avec la MCa et le domaine A. A partir de ces résultats, il deviendra donc possible

de réaliser des mutations ciblées de ces acides aminés de RyR1 afin d'étudier leur importance dans les propriétés de canal calcique de RyR1 ainsi que dans les mécanismes du couplage avec le DHPR.

Le reste de la boucle II-III et notamment le domaine critique (domaine C) est non structuré. Cette caractéristique est intéressante du point de vue fonctionnel puisque certains travaux suggèrent que les domaines non structurés d'une protéine pourraient être particulièrement impliqués dans des interactions protéines-protéines. La conformation de ces domaines pourrait être modifiée au cours de ces interactions. Il est donc possible qu'une interaction du domaine C avec le domaine F3 sur la région SPRY2, induite par la dépolarisation, entraîne un changement de sa conformation et une modification de la structure de la « poche » formée par F3 et F7. Ce schéma pourrait représenter un lien structural et fonctionnel entre le domaine C, le domaine A et RyR1.

Malgré la littérature abondante concernant le rôle des boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1S$  et notamment de la boucle II-III, il est encore aujourd'hui difficile de corréler les résultats obtenus *in vitro* avec ceux obtenus *in situ*. Ainsi, les résultats que j'ai obtenus, placent à nouveau le domaine A dans une position centrale pour les interactions protéine-protéine lors du couplage DHPR/RyR1. Comme nous l'avons vu précédemment les différentes études réalisées sur myotubes amènent à différentes hypothèses sur son rôle dans le CEC. Les unes concluent à l'absence d'implication de ce domaine, alors que d'autres montrent son implication dans la fermeture du RyR lors de la repolarisation. Seules, les études *in vitro* permettent une analyse détaillée des interactions protéines/protéines qui ne peuvent être réalisées que dans un environnement contrôlé et donc forcément incomplet et non physiologique. Les expériences *in vitro* ne peuvent donc pas mimer les situations *in situ* où les protéines ou domaines protéiques peuvent adopter des structures différentes, en partie en raison de leur interaction avec d'autres protéines. C'est le cas pour les boucles cytoplasmiques qui interagissent entre elles et avec la sous-unité  $\beta 1a$  ou le RyR. Les résultats que nous avons obtenus montrant l'influence de l'interaction de la sous-unité  $\beta 1a$  avec la sous-unité  $\alpha 1S$  sur l'interaction  $\beta 1a$ /RyR1 représente un nouvel exemple de la complexité des processus qui régissent l'interaction DHPR/ RyR. Nous avons en effet démontré que la présence de sous-unité  $\alpha 1S$  augmente fortement l'affinité de  $\beta 1a$  pour RyR1 et que la structure tridimensionnelle de la sous-unité  $\beta 1a$  est importante pour son interaction avec RyR1. Ainsi, au sein du complexe  $\alpha 1S/ \beta 1a/ RyR1$ , les différents éléments dépendent les uns des autres pour jouer pleinement leur rôle.

Ainsi, l'utilisation de la MCa pour modifier le CEC dans des fibres musculaires de souris adultes a amené des résultats suggérant une implication du domaine A dans le contrôle de la

fermeture du RyR1 pendant la phase de repolarisation de la membrane plasmique (Pouvreau et al., 2006). Ici, l'implication du domaine A dans des interactions interboucles au sein de la sous-unité  $\alpha 1S$  pourrait jouer un rôle dans la mise en place du courant de type L lors du couplage rétrograde. Mais on peut supposer un rôle plus large pour ce domaine. En effet, les travaux de Lorenzon et Beam (2004, 2007) suggèrent que la mobilité de la boucle II-III est nécessaire pour avoir un CEC fonctionnel (Lorenzon & Beam, 2007; Lorenzon et al., 2004). Nous pouvons donc proposer le mécanisme suivant pour expliquer une partie des interactions mises en jeu lors du couplage : le domaine A est engagé dans des interactions intramoléculaires dans  $\alpha 1S$  avec les boucles I-II et III-IV et intermoléculaires avec RyR1, la boucle II-III est alors stabilisée dans une conformation qui empêche l'ouverture du RyR et la libération de  $Ca^{2+}$ . Dans cette situation, ni le couplage orthograde, ni le couplage rétrograde ne sont possibles et les deux canaux sont dans un état fermé. Lors de la dépolarisation, le domaine A est libéré de ces interactions. La boucle II-III change alors de conformation, et le domaine C peut interagir avec le RyR1 sur un site activateur à la fois du couplage orthograde et rétrograde. Ce schéma ne tient cependant pas compte de toutes les autres interactions régulatrices qui existent au sein du complexe de mobilisation du  $Ca^{2+}$ , notamment avec la sous-unité  $\beta 1a$ .

Le fait que la sous-unité  $\beta 1a$  déléetée de son domaine C-terminal n'interagissent plus avec RyR1 et que le domaine C-terminal seul n'interagisse pas non plus avec RyR1 montre que la conformation tridimensionnelle adoptée par la  $\beta 1a$  endogène influe sur sa capacité à interagir avec le RyR. Ainsi, comme je l'explique ci-dessus pour le domaine C de la boucle II-III, le domaine C-terminal qui présente aussi une absence de structure secondaire stable (figure 51) pourrait changer de conformation lors de son interaction avec RyR1. Un exemple de ce type d'adaptation structurale est le domaine AID de la sous-unité  $\alpha 1S$  qui, lorsqu'il interagit avec  $\beta 1a$ , se structure en hélice  $\alpha$  (Van Petegem et al., 2004).

Nous savons que la formation des tétrades est un préalable indispensable à la mise en place du CEC (Flucher & Franzini-Armstrong, 1996), et que la sous-unité  $\beta 1a$  intervient dans cette organisation (Schredelseker et al., 2005). La sous-unité  $\beta 1a$  pourrait donc jouer plusieurs rôles dans le cadre du couplage DHPR/RyR1. De la même manière, que la boucle II-III est requise à la fois pour le couplage orthograde et pour le couplage rétrograde (Grabner et al., 1999), on peut proposer : (1) que la sous-unité  $\beta 1a$  participe à la fois à la formation des tétrades et à la mise en place d'une conformation de la sous-unité  $\alpha 1S$  qui permettent la transmission du changement conformationnel de la sous-unité  $\alpha 1S$  au RyR1 après le mouvement de charge et (2) qu'elle joue aussi un rôle dans le couplage rétrograde RyR1/DHPR en transmettant ou en maintenant des changements

conformationnels permettant l'activation de la fonction canal du DHPR. Ces mécanismes pourraient être complémentaires. La prochaine étape de l'étude du rôle de cette sous-unité dans le couplage sera d'identifier précisément le domaine structural de  $\beta 1a$  qui intervient dans l'interaction avec le RyR1. Le scénario de mise en place des interactions  $\alpha 1S/ \beta 1a/RyR1$  et de transmission des signaux reste aussi à déterminer. Il serait notamment intéressant de regarder comment les interactions impliquant le domaine A, influent ou non sur celles impliquant la sous-unité  $\beta 1a$ .

Les études structurales menées sur le domaine A et la MCa, ont montré des différences de structure non négligeables (Mosbah et al., 2000; Tae et al., 2009) bien que l'alignement d'une séquence d'acides aminés chargés positivement sur une face soit similaire pour les deux molécules. En modifiant la structure de la surface chargée positivement du domaine A pour mimer plus précisément celle de la MCa, Green et ses collaborateurs (2003) ont réussi à améliorer l'effet agoniste du domaine A sur RyR1 (Green et al., 2003). Tout en démontrant l'importance de ce groupe d'acides aminés chargés, cette étude suggère que la structure de la MCa pourrait représenter la structure optimale (la plus stable) adoptée *in vivo* par le domaine A lors de sa fixation sur RyR1.

Dans notre étude sur l'effet de la MCa sur des myotubes dysgéniques, nous montrons pour la première fois que la MCa peut mimer le DHPR dans son rôle de senseur de voltage lors de l'activation du RyR. En effet, elle induit une libération de  $Ca^{2+}$  en réponse à une dépolarisation de la membrane plasmique en absence de sous-unité  $\alpha 1S$ . Ce résultat peut paraître en contradiction avec nos autres résultats qui montrent qu'*in situ* l'interaction DHPR/RyR1 à la base du processus de CEC nécessite et est régulée par la présence de plusieurs protéines ou domaines protéiques. Cependant, on peut noter que le relâchement de  $Ca^{2+}$  induit par la dépolarisation observé sur des myotubes dysgéniques en présence de MCa est différent de celui observé dans des myotubes normaux. En effet, ce dernier à une amplitude plus faible et il a un caractère oscillatoire. Cela démontre que dans cette situation, l'action de la MCa ne mime pas totalement celle du DHPR *in situ*. Elle recrée un mécanisme de relâchement de  $Ca^{2+}$  déclenché par la dépolarisation, mais ce dernier n'a pas les caractéristiques d'un transitoire classique. Cela montre qu'il manque des éléments importants à la mise en place d'un CEC normal. Deux hypothèses permettent d'expliquer l'apparition de ce relâchement de  $Ca^{2+}$  contrôlé par la dépolarisation dans les myotubes dysgéniques:

- (1). une hypersensibilisation de RyR1 au  $Ca^{2+}$  cytoplasmique via la MCa. En effet, en pénétrant dans les myotubes dysgéniques la MCa pourrait se fixer sur les RyR1 et augmenter leur sensibilité au  $Ca^{2+}$  cytoplasmique. Ainsi, lors de la dépolarisation, une entrée de  $Ca^{2+}$  via des canaux  $Ca^{2+}$  dépendant du voltage, autres que les DHPR, pourrait alors induire l'activation de

RyR1 et le déclenchement du relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les courants portés par les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type T représenteraient une voie d'entrée privilégiée pour le  $\text{Ca}^{2+}$ .

(2). Un rôle direct de la M<sub>Ca</sub> dans l'activation de RyR1, en réponse à la dépolarisation. La M<sub>Ca</sub> pénètre dans les myotubes, se fixe sur RyR1 et joue un rôle de détecteur de potentiel. Cet effet pourrait impliquer son groupe d'acides aminés chargés positivement, ces derniers changeraient de conformation lors de la dépolarisation de la membrane plasmique et passeraient dans une conformation activatrice pour le RyR1. Le  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi relâché par cette activation pourrait alors induire à son tour un processus de CICR.

Les données que nous apportons concernant l'interaction de la Cav-3 avec la boucle I-II de la sous-unité  $\alpha 1S$  et celles récemment publiées (Vassilopoulos et al., 2010) confirment que cette protéine fait partie intégrante du complexe macromoléculaire formé par le DHPR, le RyR et les triadines. Aussi, le lien fonctionnel observé entre la Cav-3 et le DHPR pourrait être due à cette interaction directe. Nous pouvons ainsi proposer un mécanisme de régulation possible. En effet, le site de fixation de la sous-unité  $\beta 1a$  est présent sur cette boucle (domaine AID) et nous savons que cette sous-unité régule à la fois les propriétés canaux de la sous-unité  $\alpha 1S$  et a un rôle dans l'organisation ultrastructurale des sous-unités  $\alpha 1S$  en tétrades. De même, nous montrons que ni AID ni la sous-unité  $\beta 1a$  n'interagissent avec la Cav-3, le site d'interaction de la Cav-3 sur la boucle I-II est donc situé sur un autre domaine de la boucle. Ainsi, l'interaction Cav-3/I-II pourrait moduler positivement ou négativement l'interaction  $\alpha 1S/\beta 1a$  et réguler indirectement les propriétés canaux d' $\alpha 1S$ .

De même, il semble que la Cav-3 joue aussi un rôle structural dans la formation des triades et l'assemblage du complexe de mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, sur les fibres musculaires de souris n'exprimant plus la Cav-3, un marquage anormal pour le RyR et le DHPR a été observé (Parton et al, 1997; Hernandez-Deviez et al, 2006). Ainsi, la Cav-3 pourrait via son interaction avec la sous-unité  $\alpha 1S$  jouer un rôle dans l'adressage et la stabilisation du DHPR dans la membrane plasmique. Ce rôle a déjà été rapporté pour d'autres membres de la famille des cavéolines sur différents canaux ioniques (Alioua et al., 2008; Brazer et al., 2003; McEwen et al., 2008). Enfin, des mutations de la Cav-3 étant impliquées dans plusieurs myopathies, des études des effets de ces mutations sur l'interaction avec la sous-unité  $\alpha 1S$  et sur la régulation de ses propriétés canaux pourraient apporter des éléments de compréhension du contrôle de l'activité du DHPR et des pistes de recherches pour comprendre la physiopathologie de ces maladies.

# ANNEXES



# ANNEXES

**ANNEXE 1: Revue parut dans le livre *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, “Maurocalcine, a tool for the study of the excitation-contraction coupling process”**

Hicham Bichraoui, Maud Barbado, Florence Appaix, Michel De Waard et Michel Ronjat.



**ANNEXE 2: Article parut dans International Journal of Biochemistry and Cell Biology, “Caveolin-3 is a direct molecular partner of the Ca<sub>v</sub>1.1 subunit of the skeletal muscle L-type calcium channel”**

Harold COUCHOUX, Hicham BICHRAOUI, Xavier ALTAF AJ, Christophe CHOUABE, Robert BONVALLET, Bruno ALLARD, Michel RONJAT et Christine BERTHIER



**ANNEXE 3: Article parut dans Journal of Biological Chemistry, “D-maurocalcine, a pharmacologically-inert efficient cell penetrating peptide analogue”**

Cathy Poillot, Kaouthar Dridi, Hicham Bichraoui, Julien Pêcher, Sebastien Alphonse, Badreddine Douzi, Michel Ronjat, Hervé Darbon, et Michel De Waard



**ANNEXE 4: Article parut dans Journal of Physiology, “In vivo expression of G-protein beta1gamma2 dimer in adult mouse skeletal muscle alters L-type calcium current and excitation-contraction coupling”.**

Weiss N, Legrand C, Pouvreau S, Bichraoui H, Allard B, Zamponi GW, De Waard M, Jacquemond V.



**ANNEXE 5: Article parut dans Journal of Biological Chemistry, “Direct Peptide Interaction with Surface Glycosaminoglycans Contributes to the Cell Penetration of Maurocalcine”**

Narendra Ram, Sonia Aroui, Emilie Jaumain, Hicham Bichraoui, Kamel Mabrouk, Michel Ronjat, Hugues Lortat-Jacob, and Michel De Waard.



## ANNEXE 6: Liste des acides aminés

ACIDES AMINES

<b>Alanine</b>	Ala	A	<b>Cystéine</b>	Cys	C
<b>Acide aspartique</b>	Asp	D	<b>Acide glutamique</b>	Glu	E
<b>Phénylalanine</b>	Phe	F	<b>Glycine</b>	Gly	G
<b>Histidine</b>	His	H	<b>Isoleucine</b>	Ile	I
<b>Lysine</b>	Lys	K	<b>Leucine</b>	Leu	L
<b>Méthionine</b>	Met	M	<b>Asparagine</b>	Asn	N
<b>Proline</b>	Pro	P	<b>Glutamine</b>	Gln	Q
<b>Arginine</b>	Arg	R	<b>Sérine</b>	Ser	S
<b>Thréonine</b>	Thr	T	<b>Valine</b>	Val	V
<b>Tryptophane</b>	Try	W	<b>Tyrosine</b>	Tyr	Y

ANNEXE 7 : Composition du milieu minimum enrichi en  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ 

- À préparer la veille de la purification :

	Pour 1 L
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Disodium Phosphate anhydre)</b>	<b>6g</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Dihydrogénophosphate de potassium)</b>	<b>3g</b>
<b>NaCl (Chlorure de sodium)</b>	<b>0.5g</b>
<b>ajuster à pH 7.4 et autoclaver.</b>	

Tableau : composition en sels du milieu minimum

- Le jour de la mise en culture des bactéries, ajouté :

	concentration finale	Pour 1 L
<b><math>^{15}\text{NH}_4\text{Cl}</math> 15%</b>	<b>0.05%</b>	<b>0.5 g</b>
<b>CaCl<sub>2</sub> 1M</b>	<b>0.1 mM</b>	<b>100 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>MgSO<sub>4</sub> 1M</b>	<b>4 mM</b>	<b>4 mL</b>
<b><math>^{13}\text{C}</math>-glycérol 100%</b>	<b>0.4%</b>	<b>4 mL</b>

Tableau : Composants du milieu minimum

## ANNEXE 8 : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Cav1.2

<b>Nom du Canal</b>	Ca <sub>v</sub> 1.2
<b>Description</b>	Canal calcique sensible au potentiel de membrane
<b>Autres noms</b>	α <sub>1C</sub> , canal calcique de type L du muscle cardiaque / lisse, récepteur aux dihydropyridines du muscle cardiaque / lisse
<b>Informations moléculaires</b>	Homme: 2169aa, L29529 (cardiaque) ; 2138aa, Z34815 (fibroblaste) ; 2138aa, AF465484 (jéjunum), chr.12p13.3, <i>CACNA1C</i> Rat: 1146aa (séquence partielle), L04684, chr.13, <i>Cacna1S</i> Souris: 1861aa, L06234, chr.1, <i>Cacna1Sb1a</i> (voir "Commentaires")
<b>Sous-unités associées</b>	α <sub>2δ</sub> , β, γ
<b>Études fonctionnelles</b>	Patch-clamp (cellule entière, canal unitaire), imagerie calcique, contraction du muscle cardiaque / lisse, sécrétion hormonale
<b>Courant</b>	I <sub>Ca,L</sub>
<b>Conductance</b>	Ba <sup>2+</sup> (25 pS) > Sr <sup>2+</sup> = Ca <sup>2+</sup> (pS)
<b>Sélectivité ionique</b>	Ca <sup>2+</sup> > Sr <sup>2+</sup> > Ba <sup>2+</sup> >> Mg <sup>2+</sup>
<b>Activation</b>	V <sub>a</sub> = -17 mV (2 mM Ca <sup>2+</sup> , HEK293) ; -4 mV (15 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293) à -18.8 mV (5 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293 et ovocyte de Xénope) ; τ <sub>a</sub> 1 ms à 10 mV
<b>Inactivation</b>	V <sub>h</sub> = -50 à -60 mV (2 mM Ca <sup>2+</sup> , HEK293) ; -18 à -42 mV (5-15 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293) ; τ <sub>fast</sub> = 150 ms, τ <sub>slow</sub> = 1100 ms ; 61% du courant inactif après 250 ms (à V <sub>max</sub> , 15 mM Ba <sup>2+</sup> , HEK293) ; ~70% d'inactivation après 1 sec (à V <sub>max</sub> , 2 mM Ca <sup>2+</sup> ) ; l'inactivation est accélérée en présence de Ca <sup>2+</sup> (inactivation dépendante du Ca <sup>2+</sup> : 86% d'inactivation après 250 ms)
<b>Activateurs</b>	BayK8644, agonistes des dihydropyridines, FPL64176
<b>Modulateurs de gating</b>	Antagonistes des dihydropyridines (e.g., (+)- isradipine, IC <sub>50</sub> = 7 nM à -60 mV ; nimodipine, IC <sub>50</sub> = 139 nM à -80 mV)
<b>Bloqueurs</b>	Non sélectifs: cadmium Sélectifs de Ca <sub>v</sub> 1.x: devapamile (IC <sub>50</sub> = 50 nM en 10 mM Ba <sup>2+</sup> à -60 mV) et autres phénylalkylamines ; (+)- <i>cis</i> -diltiazem (IC <sub>50</sub> = 33 μM en 10 mM Ba <sup>2+</sup> à -60 mV et 0.05Hz)
<b>Radioligands</b>	(+)-[ <sup>3</sup> H]isradipine (K <sub>d</sub> < 0.1 nM) et autres dihydropyridines ; (-)-[ <sup>3</sup> H]devapamile (K <sub>d</sub> = 2.5 nM), (+)- <i>cis</i> -[ <sup>3</sup> H]diltiazem (K <sub>d</sub> = 50 nM)
<b>Fonctions physiologiques</b>	Couplage excitation contraction dans les muscles lisses et cardiaque, propagation du potentiel d'action dans le nœud sinoatrial et atrioventriculaire, plasticité synaptique, sécrétion hormonale (e.g., insuline)
<b>Distribution du canal</b>	Muscle cardiaque, muscle lisse (incluant vaisseaux sanguins, intestin, poumon, utérus), cellules endocrines (cellules β pancréatiques et pituitaires), neurones
<b>Commentaires</b>	Le gène codant la sous-unité Ca <sub>v</sub> 1.2 a été isolé et caractérisé pour la première fois dans le cœur de lapin (2171aa, P15381, X15539). En plus de l'isoforme cardiaque, des variants d'épissage ont été clonés dans le muscle lisse et le cerveau.

Tableau III Bis : Propriétés moléculaires, biophysiques et pharmacologiques de la sous-unité Cav1.2.

Tiré et adaptée de (Catterall et al., 2005).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADACHI, T., WEISBROD, R. M., PIMENTEL, D. R., YING, J., SHAROV, V. S., SCHONEICH, C. & COHEN, R. A. (2004). S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* **10**, 1200-7.
- ADAMS, B. A., TANABE, T., MIKAMI, A., NUMA, S. & BEAM, K. G. (1990). Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature* **346**, 569-72.
- AHERN, C. A., ARIKKATH, J., VALLEJO, P., GURNETT, C. A., POWERS, P. A., CAMPBELL, K. P. & CORONADO, R. (2001a). Intramembrane charge movements and excitation-contraction coupling expressed by two-domain fragments of the Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6935-40.
- AHERN, C. A., BHATTACHARYA, D., MORTENSON, L. & CORONADO, R. (2001b). A component of excitation-contraction coupling triggered in the absence of the T671-L690 and L720-Q765 regions of the II-III loop of the dihydropyridine receptor alpha(1s) pore subunit. *Biophys J* **81**, 3294-307.
- 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. (2001c). Modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current but not activation of Ca<sup>2+</sup> release by the gamma1 subunit of the dihydropyridine receptor of skeletal muscle. *BMC Physiol* **1**, 8.
- AHERN, C. A., SHERIDAN, D. C., CHENG, W., MORTENSON, L., NATARAJ, P., ALLEN, P., DE WAARD, M. & CORONADO, R. (2003). Ca<sup>2+</sup> current and charge movements in skeletal myotubes promoted by the beta-subunit of the dihydropyridine receptor in the absence of ryanodine receptor type 1. *Biophys J* **84**, 942-59.
- ALIOUA, A., LU, R., KUMAR, Y., EGHBALI, M., KUNDU, P., TORO, L. & STEFANI, E. (2008). Slo1 caveolin-binding motif, a mechanism of caveolin-1-Slo1 interaction regulating Slo1 surface expression. *J Biol Chem* **283**, 4808-17.
- ALTAFAJ, X., CHENG, W., ESTEVE, E., URBANI, J., GRUNWALD, D., SABATIER, J. M., CORONADO, R., DE WAARD, M. & RONJAT, M. (2005). Maurocalcine and domain A of the II-III loop of the dihydropyridine receptor Cav 1.1 subunit share common binding sites on the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem* **280**, 4013-6.
- 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, A. A., ALTAFAJ, X., ZHENG, Z., WANG, Z. M., DELBONO, O., RONJAT, M., TREVES, S. & ZORZATO, F. (2006). The junctional SR protein JP-45 affects the functional expression of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel Cav1.1. *J Cell Sci* **119**, 2145-55.
- ARIKKATH, J. & CAMPBELL, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 298-307.
- ARMSTRONG, C. M., BEZANILLA, F. M. & HOROWICZ, P. (1972). Twitches in the presence of ethylene glycol bis( -aminoethyl ether)-N,N'-tetracetic acid. *Biochim Biophys Acta* **267**, 605-8.
- AVILA, G. & DIRKSEN, R. T. (2000). Functional impact of the ryanodine receptor on the skeletal muscle L-type Ca(2+) channel. *J Gen Physiol* **115**, 467-80.
- BALNAVE, C. D. & ALLEN, D. G. (1998). Evidence for Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *Am J Physiol* **274**, C940-6.

- BANNISTER, R. A. & BEAM, K. G. (2005). The alpha1S N-terminus is not essential for bi-directional coupling with RyR1. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 134-41.
- BANNISTER, R. A. & BEAM, K. G. (2009a). The cardiac alpha(1C) subunit can support excitation-triggered Ca<sup>2+</sup> entry in dysgenic and dyspedic myotubes. *Channels (Austin)* **3**, 268-73.
- BANNISTER, R. A. & BEAM, K. G. (2009b). Ryanodine modification of RyR1 retrogradely affects L-type Ca(2+) channel gating in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.*
- BANNISTER, R. A., GRABNER, M. & BEAM, K. G. (2008). The alpha(1S) III-IV loop influences 1,4-dihydropyridine receptor gating but is not directly involved in excitation-contraction coupling interactions with the type 1 ryanodine receptor. *J Biol Chem* **283**, 23217-23.
- BANNISTER, R. A., PAPADOPOULOS, S., HAARMANN, C. S. & BEAM, K. G. (2009a). Effects of inserting fluorescent proteins into the alpha1S II-III loop: insights into excitation-contraction coupling. *J Gen Physiol* **134**, 35-51.
- BANNISTER, R. A., PESSAH, I. N. & BEAM, K. G. (2009b). The skeletal L-type Ca(2+) current is a major contributor to excitation-coupled Ca(2+) entry. *J Gen Physiol* **133**, 79-91.
- BARBADO, M., FABLET, K., RONJAT, M. & DE WAARD, M. (2009). Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1096-104.
- BAYLOR, S. M., CHANDLER, W. K. & MARSHALL, M. W. (1983). Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from Arsenazo III calcium transients. *J Physiol* **344**, 625-66.
- BEAM, K. G., ADAMS, B. A., NIIDOME, T., NUMA, S. & TANABE, T. (1992). Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel. *Nature* **360**, 169-71.
- BEAM, K. G. & KNUDSON, C. M. (1988). Effect of postnatal development on calcium currents and slow charge movement in mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol* **91**, 799-815.
- BEAM, K. G., KNUDSON, C. M. & POWELL, J. A. (1986). A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature* **320**, 168-70.
- 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**, 310-20.
- BEARD, N. A., WEI, L. & DULHUNTY, A. F. (2009a). Ca(2+) signaling in striated muscle: the elusive roles of triadin, junctin, and calsequestrin. *Eur Biophys J* **39**, 27-36.
- BEARD, N. A., WEI, L. & DULHUNTY, A. F. (2009b). Control of muscle ryanodine receptor calcium release channels by proteins in the sarcoplasmic reticulum lumen. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 340-5.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. & LIPP, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-8.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-29.
- BERRIDGE, M. J., LIPP, P. & BOOTMAN, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.
- BERS, D. M. & STIFFEL, V. M. (1993). Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am J Physiol* **264**, C1587-93.
- BERTHIER, C., MONTEIL, A., LORY, P. & STRUBE, C. (2002). Alpha(1H) mRNA in single skeletal muscle fibres accounts for T-type calcium current transient expression during fetal development in mice. *J Physiol* **539**, 681-91.
- BEURG, M., AHERN, C. A., VALLEJO, P., CONKLIN, M. W., POWERS, P. A., GREGG, R. G. & CORONADO, R. (1999). Involvement of the carboxy-terminus region of the dihydropyridine receptor beta1a subunit in excitation-contraction coupling of skeletal muscle. *Biophys J* **77**, 2953-67.

- BEURG, M., SUKHAREVA, M., STRUBE, C., POWERS, P. A., GREGG, R. G. & CORONADO, R. (1997). Recovery of Ca<sup>2+</sup> current, charge movements, and Ca<sup>2+</sup> transients in myotubes deficient in dihydropyridine receptor beta 1 subunit transfected with beta 1 cDNA. *Biophys J* **73**, 807-18.
- BEZANILLA, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**, 555-92.
- 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**, 1329-36.
- BICHET, D., CORNET, V., GEIB, S., CARLIER, E., VOLSEN, S., HOSHI, T., MORI, Y. & DE WAARD, M. (2000). The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* **25**, 177-90.
- BICHRAOUI, H., BARBADO, M., APPAIX, F., DEWAARD, M. & RONJAT, M. (2009). Maurocalcine, a tool for the study of the excitation-contraction coupling process. *Book: Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology* v. **1**, 219-234
- BIEDERER, C. H., RIES, S. J., MOSER, M., FLORIO, M., ISRAEL, M. A., MCCORMICK, F. & BUETTNER, R. (2000). The basic helix-loop-helix transcription factors myogenin and Id2 mediate specific induction of caveolin-3 gene expression during embryonic development. *J Biol Chem* **275**, 26245-51.
- BLEUNVEN, C., TREVES, S., JINYU, X., LEO, E., RONJAT, M., DE WAARD, M., KERN, G., FLUCHER, B. E. & ZORZATO, F. (2008). SRP-27 is a novel component of the supramolecular signalling complex involved in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Biochem J* **411**, 343-9.
- 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**, 2587-600.
- BRAZER, S. C., SINGH, B. B., LIU, X., SWAIM, W. & AMBUDKAR, I. S. (2003). Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem* **278**, 27208-15.
- BRINI, M., BANO, D., MANNI, S., RIZZUTO, R. & CARAFOLE, E. (2000). Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca(2+) signalling. *EMBO J* **19**, 4926-35.
- CAMPBELL, K. P., KNUDSON, C. M., IMAGAWA, T., LEUNG, A. T., SUTKO, J. L., KAHL, S. D., RAAB, C. R. & MADSON, L. (1987). Identification and characterization of the high affinity [3H]ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Biol Chem* **262**, 6460-3.
- CAMPBELL, K. P. & MACLENNAN, D. H. (1981). Purification and characterization of the 53,000-dalton glycoprotein from the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **256**, 4626-32.
- CARBONNEAU, L., BHATTACHARYA, D., SHERIDAN, D. C. & CORONADO, R. (2005). Multiple loops of the dihydropyridine receptor pore subunit are required for full-scale excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Biophys J* **89**, 243-55.
- CASAROTTO, M. G., CUI, Y., KARUNASEKARA, Y., HARVEY, P. J., NORRIS, N., BOARD, P. G. & DULHUNTY, A. F. (2006). Structural and functional characterization of interactions between the dihydropyridine receptor II-III loop and the ryanodine receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**, 1114-7.
- CASAROTTO, M. G., GIBSON, F., PACE, S. M., CURTIS, S. M., MULCAIR, M. & DULHUNTY, A. F. (2000). A structural requirement for activation of skeletal ryanodine receptors by peptides of the dihydropyridine receptor II-III loop. *J Biol Chem* **275**, 11631-7.
- CATTERALL, W. A. (1980). Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **20**, 15-43.
- CATTERALL, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 521-55.

- CATTERALL, W. A., PEREZ-REYES, E., SNUTCH, T. P. & STRIESSNIG, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 411-25.
- CHEN, L., ESTEVE, E., SABATIER, J. M., RONJAT, M., DE WAARD, M., ALLEN, P. D. & PESSAH, I. N. (2003). Maurocalcine and peptide A stabilize distinct subconductance states of ryanodine receptor type 1, revealing a proportional gating mechanism. *J Biol Chem* **278**, 16095-106.
- CHEN, Y. H., LI, M. H., ZHANG, Y., HE, L. L., YAMADA, Y., FITZMAURICE, A., SHEN, Y., ZHANG, H., TONG, L. & YANG, J. (2004). Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* **429**, 675-80.
- CHENG, W., ALTAFAJ, X., RONJAT, M. & CORONADO, R. (2005). Interaction between the dihydropyridine receptor Ca<sup>2+</sup> channel beta-subunit and ryanodine receptor type 1 strengthens excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 19225-30.
- CHEREDNICHENKO, G., HURNE, A. M., FESSENDEN, J. D., LEE, E. H., ALLEN, P. D., BEAM, K. G. & PESSAH, I. N. (2004). Conformational activation of Ca<sup>2+</sup> entry by depolarization of skeletal myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15793-8.
- CHEREDNICHENKO, G., WARD, C. W., FENG, W., CABRALES, E., MICHAELSON, L., SAMSO, M., LOPEZ, J. R., ALLEN, P. D. & PESSAH, I. N. (2008). Enhanced excitation-coupled calcium entry in myotubes expressing malignant hyperthermia mutation R163C is attenuated by dantrolene. *Mol Pharmacol* **73**, 1203-12.
- CHIEN, A. J., ZHAO, X., SHIROKOV, R. E., PURI, T. S., CHANG, C. F., SUN, D., RIOS, E. & HOSEY, M. M. (1995). Roles of a membrane-localized beta subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* **270**, 30036-44.
- CHU, A., DIAZ-MUNOZ, M., HAWKES, M. J., BRUSH, K. & HAMILTON, S. L. (1990). Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol* **37**, 735-41.
- CORNEA, R. L., NITU, F. R., SAMSO, M., THOMAS, D. D. & FRUEN, B. R. (2010). Mapping the ryanodine receptor FK506-binding protein subunit using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **285**, 19219-26.
- CORONADO, R., KAWANO, S., LEE, C. J., VALDIVIA, C. & VALDIVIA, H. H. (1992). Planar bilayer recording of ryanodine receptors of sarcoplasmic reticulum. *Methods Enzymol* **207**, 699-707.
- CORONADO, R., MORRISSETTE, J., SUKHAREVA, M. & VAUGHAN, D. M. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* **266**, C1485-504.
- COSTELLO, B., CHADWICK, C., SAITO, A., CHU, A., MAURER, A. & FLEISCHER, S. (1986). Characterization of the junctional face membrane from terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **103**, 741-53.
- 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**, 745-54.
- CSERNOCH, L., SZENTESI, P. & KOVACS, L. (1999). Differential effects of caffeine and perchlorate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* **520 Pt 1**, 217-30.
- CUI, Y., KARUNASEKARA, Y., HARVEY, P. J., BOARD, P. G., DULHUNTY, A. F. & CASAROTTO, M. G. (2005). 1H, 13C and 15N assignments for the II-III loop region of the skeletal dihydropyridine receptor. *J Biomol NMR* **32**, 89-90.
- CUI, Y., TAE, H. S., NORRIS, N. C., KARUNASEKARA, Y., POULIQUIN, P., BOARD, P. G., DULHUNTY, A. F. & CASAROTTO, M. G. (2009). A dihydropyridine receptor alpha1s loop region critical for skeletal muscle contraction is intrinsically unstructured and binds to a SPRY domain of the type 1 ryanodine receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 677-86.

- DE JONGH, K. S., MERRICK, D. K. & CATTERALL, W. A. (1989). Subunits of purified calcium channels: a 212-kDa form of alpha 1 and partial amino acid sequence of a phosphorylation site of an independent beta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8585-9.
- DE SMEDT, H., MISSIAEN, L., PARYS, J. B., HENNING, R. H., SIENAERT, I., VANLINGEN, S., GIJSENS, A., HIMPENS, B. & CASTEELS, R. (1997). Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem J* **322** ( Pt 2), 575-83.
- DE WAARD, M., PRAGNELL, M. & CAMPBELL, K. P. (1994). Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* **13**, 495-503.
- DE WAARD, M., SCOTT, V. E., PRAGNELL, M. & CAMPBELL, K. P. (1996). Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett* **380**, 272-6.
- DIAZ-MUNOZ, M., HAMILTON, S. L., KAETZEL, M. A., HAZARIKA, P. & DEDMAN, J. R. (1990). Modulation of Ca<sup>2+</sup> release channel activity from sarcoplasmic reticulum by annexin VI (67-kDa calcimedien). *J Biol Chem* **265**, 15894-9.
- DIRKSEN, R. T., NAKAI, J., GONZALEZ, A., IMOTO, K. & BEAM, K. G. (1997). The S5-S6 linker of repeat I is a critical determinant of L-type Ca<sup>2+</sup> channel conductance. *Biophys J* **73**, 1402-9.
- DIVET, A., PAESANTE, S., BLEUNVEN, C., ANDERSON, A., TREVES, S. & ZORZATO, F. (2005). Novel sarco(endo)plasmic reticulum proteins and calcium homeostasis in striated muscles. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 7-12.
- DOLPHIN, A. C. (2009). Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol*.
- DOYLE, D. A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T. & MACKINNON, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- DUCRET, T., VANDEBROUCK, C., CAO, M. L., LEBACQ, J. & GAILLY, P. (2006). Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres. *J Physiol* **575**, 913-24.
- DULHUNTY, A. F. & GAGE, P. W. (1988). Effects of extracellular calcium concentration and dihydropyridines on contraction in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* **399**, 63-80.
- DULHUNTY, A. F., LAVER, D. R., GALLANT, E. M., CASAROTTO, M. G., PACE, S. M. & CURTIS, S. (1999). Activation and inhibition of skeletal RyR channels by a part of the skeletal DHPR II-III loop: effects of DHPR Ser687 and FKBP12. *Biophys J* **77**, 189-203.
- EBASHI, S. (1968). [Molecular mechanism of muscle contraction]. *Nippon Ishikai Zasshi* **59**, 239-57.
- EISENBERG, R. S., MCCARTHY, R. T. & MILTON, R. L. (1983). Paralysis of frog skeletal muscle fibres by the calcium antagonist D-600. *J Physiol* **341**, 495-505.
- EL-HAYEK, R., ANTONIU, B., WANG, J., HAMILTON, S. L. & IKEMOTO, N. (1995). Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* **270**, 22116-8.
- EL-HAYEK, R. & IKEMOTO, N. (1998). Identification of the minimum essential region in the II-III loop of the dihydropyridine receptor alpha 1 subunit required for activation of skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *Biochemistry* **37**, 7015-20.
- ENDO, M. (2009). Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* **89**, 1153-76.
- EPPIG, J. J. & DUMONT, J. N. (1976). Defined nutrient medium for the in vitro maintenance of *Xenopus laevis* oocytes. *In Vitro* **12**, 418-27.
- ERTEL, E. A., CAMPBELL, K. P., HARPOLD, M. M., HOFMANN, F., MORI, Y., PEREZ-REYES, E., SCHWARTZ, A., SNUTCH, T. P., TANABE, T., BIRNBAUMER, L., TSIEN, R. W. & CATTERALL, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-5.
- ESTEVE, E., MABROUK, K., DUPUIS, A., SMIDA-REZGUI, S., ALTAF AJ, X., GRUNWALD, D., PLATEL, J. C., ANDREOTTI, N., MARTY, I., SABATIER, J. M., RONJAT, M. & DE WAARD, M. (2005).

- Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem* **280**, 12833-9.
- ESTEVE, E., SMIDA-REZGUI, S., SARKOZI, S., SZEGEDI, C., REGAYA, I., CHEN, L., ALTAF AJ, X., ROCHAT, H., ALLEN, P., PESSAH, I. N., MARTY, I., SABATIER, J. M., JONA, I., DE WAARD, M. & RONJAT, M. (2003). Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca<sup>2+</sup> release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **278**, 37822-31.
- EU, J. P., SUN, J., XU, L., STAMLER, J. S. & MEISSNER, G. (2000). The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. *Cell* **102**, 499-509.
- FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **245**, C1-14.
- FAJLOUN, Z., KHARRAT, R., CHEN, L., LECOMTE, C., DI LUCCIO, E., BICHET, D., EL AYEB, M., ROCHAT, H., ALLEN, P. D., PESSAH, I. N., DE WAARD, M. & SABATIER, J. M. (2000). Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett* **469**, 179-85.
- FELDER, E. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (2002). Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1695-700.
- FENG, W., TU, J., YANG, T., VERNON, P. S., ALLEN, P. D., WORLEY, P. F. & PESSAH, I. N. (2002). Homer regulates gain of ryanodine receptor type 1 channel complex. *J Biol Chem* **277**, 44722-30.
- FESSENDEN, J. D., WANG, Y., MOORE, R. A., CHEN, S. R., ALLEN, P. D. & PESSAH, I. N. (2000). Divergent functional properties of ryanodine receptor types 1 and 3 expressed in a myogenic cell line. *Biophys J* **79**, 2509-25.
- FILL, M. & COPELLO, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* **82**, 893-922.
- FILL, M., COPELLO JA. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* **82**, 893-922.
- FLEISCHER, S., OGUNBUNMI, E. M., DIXON, M. C. & FLEER, E. A. (1985). Localization of Ca<sup>2+</sup> release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7256-9.
- FLUCHER, B. E., CONTI, A., TAKESHIMA, H. & SORRENTINO, V. (1999). Type 3 and type 1 ryanodine receptors are localized in triads of the same mammalian skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **146**, 621-30.
- FLUCHER, B. E. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1996). Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8101-6.
- FLUCHER, B. E., KASIELKE, N. & GRABNER, M. (2000). The triad targeting signal of the skeletal muscle calcium channel is localized in the COOH terminus of the alpha(1S) subunit. *J Cell Biol* **151**, 467-78.
- FLUCHER, B. E., OBERMAIR, G. J., TULUC, P., SCHREDELSEKER, J., KERN, G. & GRABNER, M. (2005). The role of auxiliary dihydropyridine receptor subunits in muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 1-6.
- FLUCHER, B. E., WEISS, R. G. & GRABNER, M. (2002). Cooperation of two-domain Ca(2+) channel fragments in triad targeting and restoration of excitation- contraction coupling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10167-72.
- FONG, P. Y., TURNER, P. R., DENETCLAW, W. F. & STEINHARDT, R. A. (1990). Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* **250**, 673-6.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970). STUDIES OF THE TRIAD : I. Structure of the Junction in Frog Twitch Fibers. *J Cell Biol* **47**, 488-499.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (2004). Functional implications of RyR-dHPR relationships in skeletal and cardiac muscles. *Biol Res* **37**, 507-12.

- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & JORGENSEN, A. O. (1994). Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu Rev Physiol* **56**, 509-34.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C., KENNEY, L. J. & VARRIANO-MARSTON, E. (1987). The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J Cell Biol* **105**, 49-56.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & KISH, J. W. (1995). Alternate disposition of tetrads in peripheral couplings of skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **16**, 319-24.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C., PINCON-RAYMOND, M. & RIEGER, F. (1991). Muscle fibers from dysgenic mouse in vivo lack a surface component of peripheral couplings. *Dev Biol* **146**, 364-76.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C., PROTASI, F. & RAMESH, V. (1999). Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J* **77**, 1528-39.
- FREISE, D., HELD, B., WISSENBACH, U., PFEIFER, A., TROST, C., HIMMERKUS, N., SCHWEIG, U., FREICHEL, M., BIEL, M., HOFMANN, F., HOTH, M. & FLOCKERZI, V. (2000). Absence of the gamma subunit of the skeletal muscle dihydropyridine receptor increases L-type Ca<sup>2+</sup> currents and alters channel inactivation properties. *J Biol Chem* **275**, 14476-81.
- FULLER-BICER, G. A., VARADI, G., KOCH, S. E., ISHII, M., BODI, I., KADEER, N., MUTH, J. N., MIKALA, G., PETRASHEVSKAYA, N. N., JORDAN, M. A., ZHANG, S. P., QIN, N., FLORES, C. M., ISAACSOHN, I., VARADI, M., MORI, Y., JONES, W. K. & SCHWARTZ, A. (2009). Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel alpha2/delta-1-subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H117-24.
- FUTATSUGI, A., KUWAJIMA, G. & MIKOSHIBA, K. (1995). Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing in mouse skeletal muscle ryanodine receptor mRNA. *Biochem J* **305 ( Pt 2)**, 373-8.
- GACH, M. P., CHEREDNICHENKO, G., HAARMANN, C., LOPEZ, J. R., BEAM, K. G., PESSAH, I. N., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & ALLEN, P. D. (2008). Alpha2delta1 dihydropyridine receptor subunit is a critical element for excitation-coupled calcium entry but not for formation of tetrads in skeletal myotubes. *Biophys J* **94**, 3023-34.
- 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**, 21425-33.
- GALBIATI, F., VOLONTE, D., MINETTI, C., BREGMAN, D. B. & LISANTI, M. P. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C) mutants of caveolin-3 undergo ubiquitination and proteasomal degradation. Treatment with proteasomal inhibitors blocks the dominant negative effect of LGMD-1C mutant and rescues wild-type caveolin-3. *J Biol Chem* **275**, 37702-11.
- GARCIA, M. L., HANNER, M., KNAUS, H. G., KOCH, R., SCHMALHOFER, W., SLAUGHTER, R. S. & KACZOROWSKI, G. J. (1997). Pharmacology of potassium channels. *Adv Pharmacol* **39**, 425-71.
- GAZZERRO, E., SOTGIA, F., BRUNO, C., LISANTI, M. P. & MINETTI, C. (2009). Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Hum Genet* **18**, 137-45.
- GISSEL, H. & CLAUSEN, T. (1999). Excitation-induced Ca<sup>2+</sup> uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **276**, R331-9.
- 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**, 365-78.

- GRABNER, M., DIRKSEN, R. T., SUDA, N. & BEAM, K. G. (1999). The II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor is responsible for the Bi-directional coupling with the ryanodine receptor. *J Biol Chem* **274**, 21913-9.
- GREEN, D., PACE, S., CURTIS, S. M., SAKOWSKA, M., LAMB, G. D., DULHUNTY, A. F. & CASAROTTO, M. G. (2003). The three-dimensional structural surface of two beta-sheet scorpion toxins mimics that of an alpha-helical dihydropyridine receptor segment. *Biochem J* **370**, 517-27.
- GREENBERG, M. E., ZIFF, E. B. & GREENE, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* **234**, 80-3.
- 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**, 13961-6.
- 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**, 12278-83.
- GRUNWALD, R. & MEISSNER, G. (1995). Lumenal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* **270**, 11338-47.
- 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**, 229-35.
- HAMILTON, S. L. & REID, M. B. (2000). RyR1 modulation by oxidation and calmodulin. *Antioxid Redox Signal* **2**, 41-5.
- HAMILTON, S. L., SERYSHEVA, I. & STRASBURG, G. M. (2000). Calmodulin and Excitation-Contraction Coupling. *News Physiol Sci* **15**, 281-284.
- HEILBRUNN, L. V. (1943). *An outline of general physiology*. W. B. Saunders, Philadelphia.
- HIDALGO, C. (2005). Cross talk between Ca<sup>2+</sup> and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/Ca<sup>2+</sup> release channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 2237-46.
- HOFMANN, F., BIEL, M. & FLOCKERZI, V. (1994). Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu Rev Neurosci* **17**, 399-418.
- HULME, J. T., KONOKI, K., LIN, T. W., GRITSENKO, M. A., CAMP, D. G., 2ND, BIGELOW, D. J. & CATTERALL, W. A. (2005). Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5274-9.
- HURNE, A. M., O'BRIEN, J. J., WINGROVE, D., CHEREDNICHENKO, G., ALLEN, P. D., BEAM, K. G. & PESSAH, I. N. (2005). Ryanodine receptor type 1 (RyR1) mutations C4958S and C4961S reveal excitation-coupled calcium entry (ECCE) is independent of sarcoplasmic reticulum store depletion. *J Biol Chem* **280**, 36994-7004.
- HUXLEY, H. E. (1975). The structural basis of contraction and regulation in skeletal muscle. *Kaibogaku Zasshi* **50**, 310-25.
- IKEMOTO, N. & EL-HAYEK, R. (1998). Signal transmission and transduction in excitation-contraction coupling. *Adv Exp Med Biol* **453**, 199-207.
- IKEMOTO, N. & YAMAMOTO, T. (2000). Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in Ca(2+) channel regulation. *Trends Cardiovasc Med* **10**, 310-6.
- 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.
- JACQUEMOND, V. (1997). Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys J* **73**, 920-8.
- JENDEN, D. J. & FAIRHURST, A. S. (1969). The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol Rev* **21**, 1-25.

- JORGENSEN, A. O., SHEN, A. C., ARNOLD, W., LEUNG, A. T. & CAMPBELL, K. P. (1989). Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol* **109**, 135-47.
- JORGENSEN, A. O., SHEN, A. C., ARNOLD, W., MCPHERSON, P. S. & CAMPBELL, K. P. (1993). The Ca<sup>2+</sup>-release channel/ryanodine receptor is localized in junctional and corbular sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. *J Cell Biol* **120**, 969-80.
- KARUNASEKARA, Y., DULHUNTY, A. F. & CASAROTTO, M. G. (2009). The voltage-gated calcium-channel beta subunit: more than just an accessory. *Eur Biophys J* **39**, 75-81.
- KIM, S. J., KIM, Y. S., YUAN, J. P., PETRALIA, R. S., WORLEY, P. F. & LINDEN, D. J. (2003). Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* **426**, 285-91.
- KIMURA, T., LUECK, J. D., HARVEY, P. J., PACE, S. M., IKEMOTO, N., CASAROTTO, M. G., DIRKSEN, R. T. & DULHUNTY, A. F. (2009). Alternative splicing of RyR1 alters the efficacy of skeletal EC coupling. *Cell Calcium* **45**, 264-74.
- KIMURA, T., PACE, S. M., WEI, L., BEARD, N. A., DIRKSEN, R. T. & DULHUNTY, A. F. (2007). A variably spliced region in the type 1 ryanodine receptor may participate in an inter-domain interaction. *Biochem J* **401**, 317-24.
- KISTNER, U., GARNER, C. C. & LINIAL, M. (1995). Nucleotide binding by the synapse associated protein SAP90. *FEBS Lett* **359**, 159-63.
- KLAUS, M. M., SCORDILIS, S. P., RAPALUS, J. M., BRIGGS, R. T. & POWELL, J. A. (1983). Evidence for dysfunction in the regulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in excitation-contraction uncoupled dysgenic muscle. *Dev Biol* **99**, 152-65.
- 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**, 1345-8.
- KOFUJI, P., HADLEY, R. W., KIEVAL, R. S., LEDERER, W. J. & SCHULZE, D. H. (1992). Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues: a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger. *Am J Physiol* **263**, C1241-9.
- KRUGER, J., KUNERT-KEIL, C., BISPING, F. & BRINKMEIER, H. (2008). Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle. *Neuromuscul Disord* **18**, 501-13.
- KUGLER, G., GRABNER, M., PLATZER, J., STRIESSNIG, J. & FLUCHER, B. E. (2004a). The monoclonal antibody mAB 1A binds to the excitation-contraction coupling domain in the II-III loop of the skeletal muscle calcium channel alpha(1S) subunit. *Arch Biochem Biophys* **427**, 91-100.
- KUGLER, G., WEISS, R. G., FLUCHER, B. E. & GRABNER, M. (2004b). Structural requirements of the dihydropyridine receptor alpha1S II-III loop for skeletal-type excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* **279**, 4721-8.
- KUREBAYASHI, N. & OGAWA, Y. (2001). Depletion of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca<sup>2+</sup> entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* **533**, 185-99.
- LAI, F. A., ERICKSON, H. P., ROUSSEAU, E., LIU, Q. Y. & MEISSNER, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* **331**, 315-9.
- LAMB, G. D. & STEPHENSON, D. G. (1994). Effects of intracellular pH and [Mg<sup>2+</sup>] on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* **478** ( Pt 2), 331-9.
- LAMB, G. D. & STEPHENSON, D. G. (1996). Effects of FK506 and rapamycin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* **494** ( Pt 2), 569-76.
- LAVIER, D. R. (2005). Coupled calcium release channels and their regulation by luminal and cytosolic ions. *Eur Biophys J* **34**, 359-68.
- LAVIER, D. R., BAYNES, T. M. & DULHUNTY, A. F. (1997). Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: evidence for two independent mechanisms. *J Membr Biol* **156**, 213-29.

- LAVER, D. R., LENZ, G. K. & LAMB, G. D. (2001). Regulation of the calcium release channel from rabbit skeletal muscle by the nucleotides ATP, AMP, IMP and adenosine. *J Physiol* **537**, 763-78.
- 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**, 7791-4.
- 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**, 29958-64.
- LEURANGUER, V., PAPADOPOULOS, S. & BEAM, K. G. (2006). Organization of calcium channel beta1a subunits in triad junctions in skeletal muscle. *J Biol Chem* **281**, 3521-7.
- LORENZON, N. M. & BEAM, K. G. (2007). Accessibility of targeted DHPR sites to streptavidin and functional effects of binding on EC coupling. *J Gen Physiol* **130**, 379-88.
- LORENZON, N. M., HAARMANN, C. S., NORRIS, E. E., PAPADOPOULOS, S. & BEAM, K. G. (2004). Metabolic biotinylation as a probe of supramolecular structure of the triad junction in skeletal muscle. *J Biol Chem* **279**, 44057-64.
- LORY, P. & NARGEOT, J. (2004). [Genetic diversity of voltage-gated calcium channels]. *Rev Neurol (Paris)* **160**, S7-15.
- LU, X., XU, L. & MEISSNER, G. (1994). Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* **269**, 6511-6.
- LU, X., XU, L. & MEISSNER, G. (1995). Phosphorylation of dihydropyridine receptor II-III loop peptide regulates skeletal muscle calcium release channel function. Evidence for an essential role of the beta-OH group of Ser687. *J Biol Chem* **270**, 18459-64.
- LUDTKE, S. J., SERYSHEVA, II, HAMILTON, S. L. & CHIU, W. (2005). The pore structure of the closed RyR1 channel. *Structure* **13**, 1203-11.
- LYTTON, J. (2007). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochem J* **406**, 365-82.
- MABROUK, K., RAM, N., BOISSEAU, S., STRAPPAZZON, F., REHAIM, A., SADOUL, R., DARBON, H., RONJAT, M. & DE WAARD, M. (2007). Critical amino acid residues of maurocalcine involved in pharmacology, lipid interaction and cell penetration. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 2528-40.
- MACKRILL, J. J. (1999). Protein-protein interactions in intracellular Ca<sup>2+</sup>-release channel function. *Biochem J* **337** ( Pt 3), 345-61.
- MACLENNAN, D. H. (2000). Ca<sup>2+</sup> signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* **267**, 5291-7.
- MACLENNAN, D. H., RICE, W. J. & GREEN, N. M. (1997). The mechanism of Ca<sup>2+</sup> transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *J Biol Chem* **272**, 28815-8.
- 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**, 2270-4.
- MARX, S. O., GABURJAKOVA, J., GABURJAKOVA, M., HENRIKSON, C., ONDRIAS, K. & MARKS, A. R. (2001). Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res* **88**, 1151-8.
- MARX, S. O., ONDRIAS, K. & MARKS, A. R. (1998). Coupled gating between individual skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors). *Science* **281**, 818-21.
- MCDONALD, T. F., PELZER, S., TRAUTWEIN, W. & PELZER, D. J. (1994). Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev* **74**, 365-507.
- MCEWEN, D. P., LI, Q., JACKSON, S., JENKINS, P. M. & MARTENS, J. R. (2008). Caveolin regulates kv1.5 trafficking to cholesterol-rich membrane microdomains. *Mol Pharmacol* **73**, 678-85.

- MEISSNER, G. (1994). Ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* **56**, 485-508.
- MEISSNER, G., EL-HASHEM A. (1992). Ryanodine as a functional probe of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel. *Mol Cell Biochem.* **114**, 119-23.
- MELLSTROM, B. & NARANJO, J. R. (2001). Mechanisms of Ca(2+)-dependent transcription. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 312-9.
- MENG, X., WANG, G., VIERO, C., WANG, Q., MI, W., SU, X. D., WAGENKNECHT, T., WILLIAMS, A. J., LIU, Z. & YIN, C. C. (2009). CLIC2-RyR1 interaction and structural characterization by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* **387**, 320-34.
- MINETTI, C., BADO, M., BRODA, P., SOTGIA, F., BRUNO, C., GALBIATI, F., VOLONTE, D., LUCANIA, G., PAVAN, A., BONILLA, E., LISANTI, M. P. & CORDONE, G. (2002). Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol* **160**, 265-70.
- MITCHELL, R. D., SAITO, A., PALADE, P. & FLEISCHER, S. (1983). Morphology of isolated triads. *J Cell Biol* **96**, 1017-29.
- 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**, 1316-25.
- MOORE, R. A., NGUYEN, H., GALCERAN, J., PESSAH, I. N. & ALLEN, P. D. (1998). A transgenic myogenic cell line lacking ryanodine receptor protein for homologous expression studies: reconstitution of Ry1R protein and function. *J Cell Biol* **140**, 843-51.
- MOSBAH, A., KHARRAT, R., FAJLOUN, Z., RENISIO, J. G., BLANC, E., SABATIER, J. M., EL AYEB, M. & DARBON, H. (2000). A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins* **40**, 436-42.
- NABAUER, M., CALLEWAERT, G., CLEEMANN, L. & MORAD, M. (1989). Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* **244**, 800-3.
- NAKAI, J., DIRKSEN, R. T., NGUYEN, H. T., PESSAH, I. N., BEAM, K. G. & ALLEN, P. D. (1996). Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* **380**, 72-5.
- NAKAI, J., IMAGAWA, T., HAKAMAT, Y., SHIGEKAWA, M., TAKESHIMA, H. & NUMA, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* **271**, 169-77.
- NAKAI, J., OGURA, T., PROTASI, F., FRANZINI-ARMSTRONG, C., ALLEN, P. D. & BEAM, K. G. (1997). Functional nonequality of the cardiac and skeletal ryanodine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1019-22.
- NAKAI, J., SEKIGUCHI, N., RANDO, T. A., ALLEN, P. D. & BEAM, K. G. (1998a). Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* **273**, 13403-6.
- NAKAI, J., TANABE, T., KONNO, T., ADAMS, B. & BEAM, K. G. (1998b). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* **273**, 24983-6.
- 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**, 5015-20.
- NIGGLI, E. & LEDERER, W. J. (1990). Voltage-independent calcium release in heart muscle. *Science* **250**, 565-8.

- O'REILLY, F. M., ROBERT, M., JONA, I., SZEGEDI, C., ALBRIEUX, M., GEIB, S., DE WAARD, M., VILLAZ, M. & RONJAT, M. (2002). FKBP12 modulation of the binding of the skeletal ryanodine receptor onto the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *Biophys J* **82**, 145-55.
- OBERMAIR, G. J., KUGLER, G., BAUMGARTNER, S., TULUC, P., GRABNER, M. & FLUCHER, B. E. (2005). The Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta-1 subunit determines Ca<sup>2+</sup> current kinetics in skeletal muscle but not targeting of alpha1S or excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* **280**, 2229-37.
- OBERMAIR, G. J., TULUC, P. & FLUCHER, B. E. (2008). Auxiliary Ca(2+) channel subunits: lessons learned from muscle. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 311-8.
- OPATOWSKY, Y., CHEN, C. C., CAMPBELL, K. P. & HIRSCH, J. A. (2004). Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron* **42**, 387-99.
- OTSU, K., WILLARD, H. F., KHANNA, V. K., ZORZATO, F., GREEN, N. M. & MACLENNAN, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **265**, 13472-83.
- 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 Ca<sup>2+</sup> release. *J Biol Chem* **279**, 19387-90.
- 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**, 379-83.
- PAOLINI, C., FESSENDEN, J. D., PESSAH, I. N. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (2004a). Evidence for conformational coupling between two calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12748-52.
- PAOLINI, C., PROTASI, F. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (2004b). The relative position of RyR feet and DHPR tetrads in skeletal muscle. *J Mol Biol* **342**, 145-53.
- 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**, 767-84.
- PAPADOPOULOS, S., LEURANGUER, V., BANNISTER, R. A. & BEAM, K. G. (2004). Mapping sites of potential proximity between the dihydropyridine receptor and RyR1 in muscle using a cyan fluorescent protein-yellow fluorescent protein tandem as a fluorescence resonance energy transfer probe. *J Biol Chem* **279**, 44046-56.
- PAPE, P. C., KONISHI, M., BAYLOR, S. M. & SOMLYO, A. P. (1988). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers injected with the InsP3 blocker, heparin. *FEBS Lett* **235**, 57-62.
- PAREKH, A. B. (2003). Mitochondrial regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling: more than just simple Ca<sup>2+</sup> buffers. *News Physiol Sci* **18**, 252-6.
- PARTON, R. G., WAY, M., ZORZI, N. & STANG, E. (1997). Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* **136**, 137-54.
- PEREZ-REYES, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**, 117-61.
- PEREZ, C. F., MUKHERJEE, S. & ALLEN, P. D. (2003a). Amino acids 1-1,680 of ryanodine receptor type 1 hold critical determinants of skeletal type for excitation-contraction coupling. Role of divergence domain D2. *J Biol Chem* **278**, 39644-52.
- PEREZ, C. F., VOSS, A., PESSAH, I. N. & ALLEN, P. D. (2003b). RyR1/RyR3 Chimeras Reveal that Multiple Domains of RyR1 Are Involved in Skeletal-Type E-C Coupling. *Biophys J* **84**, 2655-63.
- PESSAH, I. N., FRANCINI, A. O., SCALES, D. J., WATERHOUSE, A. L. & CASIDA, J. E. (1986). Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* **261**, 8643-8.

- PESSAH, I. N., WATERHOUSE, A. L. & CASIDA, J. E. (1985). The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **128**, 449-56.
- PESSAH, I. N. & ZIMANYI, I. (1991). Characterization of multiple [3H]ryanodine binding sites on the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Mol Pharmacol* **39**, 679-89.
- PHILIPSON, K. D., NICOLL, D. A. & LI, Z. (1993). The cardiac sodium-calcium exchanger. *Soc Gen Physiol Ser* **48**, 187-91.
- PONTING, C., SCHULTZ, J. & BORK, P. (1997). SPRY domains in ryanodine receptors (Ca<sup>2+</sup>-release channels). *Trends Biochem Sci* **22**, 193-4.
- PORTER, K. R. & PALADE, G. E. (1957). Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol* **3**, 269-300.
- POULIQUIN, P. & DULHUNTY, A. F. (2009). Homer and the ryanodine receptor. *Eur Biophys J* **39**, 91-102.
- POUVREAU, S., CSERNOCH, L., ALLARD, B., SABATIER, J. M., DE WAARD, M., RONJAT, M. & JACQUEMOND, V. (2006). Transient loss of voltage control of Ca<sup>2+</sup> release in the presence of maurocalcine in skeletal muscle. *Biophys J* **91**, 2206-15.
- 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.
- PROENZA, C., O'BRIEN, J., NAKAI, J., MUKHERJEE, S., ALLEN, P. D. & BEAM, K. G. (2002). Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the alpha(1S) (Ca(V)1.1) II-III loop. *J Biol Chem* **277**, 6530-5.
- PROENZA, C., WILKENS, C., LORENZON, N. M. & BEAM, K. G. (2000a). A carboxyl-terminal region important for the expression and targeting of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* **275**, 23169-74.
- PROENZA, C., WILKENS, C. M. & BEAM, K. G. (2000b). Excitation-contraction coupling is not affected by scrambled sequence in residues 681-690 of the dihydropyridine receptor II-III loop. *J Biol Chem* **275**, 29935-7.
- PROTASI, F. (2002). Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci* **7**, d650-8.
- PROTASI, F., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & ALLEN, P. D. (1998). Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J Cell Biol* **140**, 831-42.
- PROTASI, F., TAKEKURA, H., WANG, Y., CHEN, S. R., MEISSNER, G., ALLEN, P. D. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (2000). RYR1 and RYR3 have different roles in the assembly of calcium release units of skeletal muscle. *Biophys J* **79**, 2494-508.
- RALSTON, E. & PLOUG, T. (1999). Caveolin-3 is associated with the T-tubules of mature skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* **246**, 510-5.
- RAM, N., AROUI, S., JAUMAIN, E., BICHRAOUI, H., MABROUK, K., RONJAT, M., LORTAT-JACOB, H. & DE WAARD, M. (2008a). Direct peptide interaction with surface glycosaminoglycans contributes to the cell penetration of maurocalcine. *J Biol Chem* **283**, 24274-84.
- RAM, N., WEISS, N., TEXIER-NOGUES, I., AROUI, S., ANDREOTTI, N., PIROLLET, F., RONJAT, M., SABATIER, J. M., DARBON, H., JACQUEMOND, V. & DE WAARD, M. (2008b). Design of a disulfide-less, pharmacologically inert, and chemically competent analog of maurocalcine for the efficient transport of impermeant compounds into cells. *J Biol Chem* **283**, 27048-56.
- RAZANI, B., WOODMAN, S. E. & LISANTI, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* **54**, 431-67.
- REID, M. B. (2001). Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* **90**, 724-31.
- RICHARDS, M. W., BUTCHER, A. J. & DOLPHIN, A. C. (2004). Ca<sup>2+</sup> channel beta-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 626-32.

- RIGOARD, P., BAUCHE, S., BUFFENOIR, K., GIOT, J. P., FAURE, J. P., SCEPI, M., RICHER, J. P., LAPIERRE, F. & WAGER, M. (2009a). [The anatomical substrate of muscle contractility]. *Neurochirurgie* **55 Suppl 1**, S69-82.
- RIGOARD, P., BUFFENOIR, K., WAGER, M., BAUCHE, S., GIOT, J. P. & LAPIERRE, F. (2009b). [Molecular architecture of the sarcoplasmic reticulum and its role in the ECC]. *Neurochirurgie* **55 Suppl 1**, S83-91.
- RINGER, S. (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* **4**, 29-42 3.
- RINGER, S. (1886). Further Experiments Regarding the Influence of small quantities of Lime Potassium and other Salts on Muscular Tissue. *J Physiol* **7**, 291-308.
- RINGER, S. & BUXTON, D. W. (1887). Concerning the Action of Calcium, Potassium, and Sodium Salts upon the Eel's Heart and upon the Skeletal Muscles of the Frog. *J Physiol* **8**, 15-9.
- RIOS, E. & BRUM, G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* **325**, 717-20.
- 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**, 673-82.
- SAGARA, Y., WADE, J. B. & INESI, G. (1992). A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum ATPase with thapsigargin. *J Biol Chem* **267**, 1286-92.
- SAIKI, Y., EL-HAYEK, R. & IKEMOTO, N. (1999). Involvement of the Glu724-Pro760 region of the dihydropyridine receptor II-III loop in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* **274**, 7825-32.
- SAITO, A., SEILER, S., CHU, A. & FLEISCHER, S. (1984). Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol* **99**, 875-85.
- SALIDO, G. M., SAGE, S. O. & ROSADO, J. A. (2009). TRPC channels and store-operated Ca(2+) entry. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 223-30.
- SAMSO, M., TRUJILLO, R., GURROLA, G. B., VALDIVIA, H. H. & WAGENKNECHT, T. (1999). Three-dimensional location of the imperatoxin A binding site on the ryanodine receptor. *J Cell Biol* **146**, 493-9.
- SAMSO, M. & WAGENKNECHT, T. (1998). Contributions of electron microscopy and single-particle techniques to the determination of the ryanodine receptor three-dimensional structure. *J Struct Biol* **121**, 172-80.
- SAMSO, M. & WAGENKNECHT, T. (2002). Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor. *J Biol Chem* **277**, 1349-53.
- SAMSO, M., WAGENKNECHT, T. & ALLEN, P. D. (2005). Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 539-44.
- SANTILLAN, G., BALDI, C., KATZ, S., VAZQUEZ, G. & BOLAND, R. (2004). Evidence that TRPC3 is a molecular component of the 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-activated capacitative calcium entry (CCE) in muscle and osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **89-90**, 291-5.
- SCHLEGEL, A. & LISANTI, M. P. (2000). A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem* **275**, 21605-17.
- SCHNEIDER, M. F. & CHANDLER, W. K. (1973). Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**, 244-6.
- SCHREDELSEKER, J., DAYAL, A., SCHWERTE, T., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & GRABNER, M. (2009). Proper restoration of excitation-contraction coupling in the dihydropyridine receptor beta 1-null zebrafish relaxed is an exclusive function of the beta 1a subunit. *J Biol Chem*.

- 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*.
- SENCER, S., PAPANENI, R. V., HALLING, D. B., PATE, P., KROL, J., ZHANG, J. Z. & HAMILTON, S. L. (2001). Coupling of RYR1 and L-type calcium channels via calmodulin binding domains. *J Biol Chem* **276**, 38237-41.
- SERYSHEVA, II. (2004). Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry (Mosc)* **69**, 1226-32.
- SERYSHEVA, II, CHIU, W. & LUDTKE, S. J. (2007). Single-particle electron cryomicroscopy of the ion channels in the excitation-contraction coupling junction. *Methods Cell Biol* **79**, 407-35.
- SERYSHEVA, II, ORLOVA, E. V., CHIU, W., SHERMAN, M. B., HAMILTON, S. L. & VAN HEEL, M. (1995). Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel. *Nat Struct Biol* **2**, 18-24.
- SHERIDAN, D. C., CHENG, W., AHERN, C. A., MORTENSON, L., ALSAMMARAE, D., VALLEJO, P. & CORONADO, R. (2003). Truncation of the carboxyl terminus of the dihydropyridine receptor  $\beta$ 1a subunit promotes  $Ca^{2+}$  dependent excitation-contraction coupling in skeletal myotubes. *Biophys J* **84**, 220-37.
- SHERIDAN, D. C., CHENG, W., CARBONNEAU, L., AHERN, C. A. & CORONADO, R. (2004). Involvement of a heptad repeat in the carboxyl terminus of the dihydropyridine receptor  $\beta$ 1a subunit in the mechanism of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Biophys J* **87**, 929-42.
- SHERIDAN, D. C., TAKEKURA, H., FRANZINI-ARMSTRONG, C., BEAM, K. G., ALLEN, P. D. & PEREZ, C. F. (2006). Bidirectional signaling between calcium channels of skeletal muscle requires multiple direct and indirect interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19760-5.
- 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**, 489-92.
- SLAVIK, K. J., WANG, J. P., AGHDASI, B., ZHANG, J. Z., MANDEL, F., MALOUF, N. & HAMILTON, S. L. (1997). A carboxy-terminal peptide of the  $\alpha$ 1-subunit of the dihydropyridine receptor inhibits  $Ca^{2+}$ -release channels. *Am J Physiol* **272**, C1475-81.
- SMITH, J. S., CORONADO, R. & MEISSNER, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by  $Ca^{2+}$  and ATP and modulation by  $Mg^{2+}$ . *J Gen Physiol* **88**, 573-88.
- SMITH, J. S., IMAGAWA, T., MA, J., FILL, M., CAMPBELL, K. P. & CORONADO, R. (1988). Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* **92**, 1-26.
- SORRENTINO, V. & VOLPE, P. (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol Sci* **14**, 98-103.
- STOKES, D. L. & WAGENKNECHT, T. (2000). Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: structure and function of  $Ca^{2+}$ -ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem* **267**, 5274-9.
- STREHLER, E. E. & ZACHARIAS, D. A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* **81**, 21-50.
- STRUBE, C., BEURG, M., POWERS, P. A., GREGG, R. G. & CORONADO, R. (1996). Reduced  $Ca^{2+}$  current, charge movement, and absence of  $Ca^{2+}$  transients in skeletal muscle deficient in dihydropyridine receptor  $\beta$ 1 subunit. *Biophys J* **71**, 2531-43.
- SUN, X. H., PROTASI, F., TAKAHASHI, M., TAKESHIMA, H., FERGUSON, D. G. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1995). Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *J Cell Biol* **129**, 659-71.

- SZAPPANOS, H., SMIDA-REZGUI, S., CSERI, J., SIMUT, C., SABATIER, J. M., DE WAARD, M., KOVACS, L., CSERNOCH, L. & RONJAT, M. (2005). Differential effects of maurocalcine on Ca<sup>2+</sup> release events and depolarization-induced Ca<sup>2+</sup> release in rat skeletal muscle. *J Physiol* **565**, 843-53.
- SZEGEDI, C., SARKOZI, S., HERZOG, A., JONA, I. & VARSANYI, M. (1999). Calsequestrin: more than 'only' a luminal Ca<sup>2+</sup> buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* **337** ( Pt 1), 19-22.
- TAE, H. S., NORRIS, N. C., CUI, Y., KARUNASEKARA, Y., BOARD, P. G., DULHUNTY, A. F. & CASAROTTO, M. G. (2009). Molecular recognition of the disordered dihydropyridine receptor II-III loop by a conserved spry domain of the type 1 ryanodine receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 346-9.
- TAKEKURA, H., BENNETT, L., TANABE, T., BEAM, K. G. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1994). Restoration of junctional tetrads in dysgenic myotubes by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys J* **67**, 793-803.
- TAKEKURA, H., NISHI, M., NODA, T., TAKESHIMA, H. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1995). Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3381-5.
- TAKEKURA, H., PAOLINI, C., FRANZINI-ARMSTRONG, C., KUGLER, G., GRABNER, M. & FLUCHER, B. E. (2004). Differential contribution of skeletal and cardiac II-III loop sequences to the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Mol Biol Cell* **15**, 5408-19.
- 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**, 556-9.
- 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**, 439-45.
- TANABE, T., BEAM, K. G., ADAMS, B. A., NIIDOME, T. & NUMA, S. (1990a). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* **346**, 567-9.
- 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**, 134-9.
- TANABE, T., MIKAMI, A., NUMA, S. & BEAM, K. G. (1990b). Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* **344**, 451-3.
- TREVES, S., VUKCEVIC, M., MAJ, M., THURNHEER, R., MOSCA, B. & ZORZATO, F. (2009). Minor sarcoplasmic reticulum membrane components that modulate excitation-contraction coupling in striated muscles. *J Physiol* **587**, 3071-9.
- TRIPATHY, A. & MEISSNER, G. (1996). Sarcoplasmic reticulum luminal Ca<sup>2+</sup> has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel. *Biophys J* **70**, 2600-15.
- TRIPATHY, A., XU, L., MANN, G. & MEISSNER, G. (1995). Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* **69**, 106-19.
- URSU, D., SCHUHMEIER, R. P., FREICHEL, M., FLOCKERZI, V. & MELZER, W. (2004). Altered inactivation of Ca<sup>2+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> release in mouse muscle fibers deficient in the DHP receptor gamma1 subunit. *J Gen Physiol* **124**, 605-18.
- VAN PETEGEM, F., CLARK, K. A., CHATELAIN, F. C. & MINOR, D. L., JR. (2004). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* **429**, 671-5.

- VANDEBROUCK, C., MARTIN, D., COLSON-VAN SCHOOR, M., DEBAIX, H. & GAILLY, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **158**, 1089-96.
- VASSILOPOULOS, S., ODDOUX, S., GROH, S., CACHEUX, M., FAURE, J., BROCARD, J., CAMPBELL, K. P. & MARTY, I. (2010). Caveolin 3 is associated with the calcium release complex and is modified via in vivo triadin modification. *Biochemistry* **49**, 6130-5.
- VAZQUEZ, G., WEDEL, B. J., AZIZ, O., TREBAK, M. & PUTNEY, J. W., JR. (2004). The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 21-36.
- WAGENKNECHT, T., HSIEH, C. E., RATH, B. K., FLEISCHER, S. & MARKO, M. (2002). Electron tomography of frozen-hydrated isolated triad junctions. *Biophys J* **83**, 2491-501.
- WAGENKNECHT, T. & RADERMACHER, M. (1995). Three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS Lett* **369**, 43-6.
- WAGENKNECHT, T., RADERMACHER, M., GRASSUCCI, R., BERKOWITZ, J., XIN, H. B. & FLEISCHER, S. (1997). Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem* **272**, 32463-71.
- WAGENKNECHT, T. & SAMSO, M. (2002). Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Front Biosci* **7**, d1464-74.
- 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.
- WEISS, N., COUCHOUX, H., LEGRAND, C., BERTHIER, C., ALLARD, B. & JACQUEMOND, V. (2008). Expression of the muscular dystrophy-associated caveolin-3(P104L) mutant in adult mouse skeletal muscle specifically alters the Ca(2+) channel function of the dihydropyridine receptor. *Pflugers Arch* **457**, 361-75.
- 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**, C1094-102.
- WILKENS, C. M., KASIELKE, N., FLUCHER, B. E., BEAM, K. G. & GRABNER, M. (2001). Excitation-contraction coupling is unaffected by drastic alteration of the sequence surrounding residues L720-L764 of the alpha 1S II-III loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5892-7.
- WILLIAMS, T. M. & LISANTI, M. P. (2004). The caveolin proteins. *Genome Biol* **5**, 214.
- WRIGHT, N. T., PROSSER, B. L., VARNEY, K. M., ZIMMER, D. B., SCHNEIDER, M. F. & WEBER, D. J. (2008). S100A1 and Calmodulin Compete for the Same Binding Site on Ryanodine Receptor. *J Biol Chem* **283**, 26676-83.
- YAMAMOTO, T., EL-HAYEK, R. & IKEMOTO, N. (2000). Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca(2+) channel regulation. *J Biol Chem* **275**, 11618-25.
- YANO, M., EL-HAYEK, R. & IKEMOTO, N. (1995). Conformational changes in the junctional foot protein/Ca2+ release channel mediate depolarization-induced Ca2+ release from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**, 3017-21.
- YIN, C. C. & LAI, F. A. (2000). Intrinsic lattice formation by the ryanodine receptor calcium-release channel. *Nat Cell Biol* **2**, 669-71.
- YUAN, S. H., ARNOLD, W. & JORGENSEN, A. O. (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.
- ZANOU, N., SHAPOVALOV, G., LOUIS, M., TAJEDDINE, N., GALLO, C., VAN SCHOOR, M., ANGUISH, I., CAO, M. L., SCHAKMAN, O., DIETRICH, A., LEBACQ, J., RUEGG, U., ROULET, E., BIRNBAUMER, L. & GAILLY, P. (2010). Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C149-62.
- ZHU, S., DARBON, H., DYASON, K., VERDONCK, F. & TYTGAT, J. (2003). Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. *FASEB J* **17**, 1765-7.

- ZORZATO, F., ANDERSON, A. A., OHLENDIECK, K., FROEMMING, G., GUERRINI, R. & TREVES, S. (2000). Identification of a novel 45 kDa protein (JP-45) from rabbit sarcoplasmic-reticulum junctional-face membrane. *Biochem J* **351 Pt 2**, 537-43.
- ZORZATO, F., FUJII, J., OTSU, K., PHILLIPS, M., GREEN, N. M., LAI, F. A., MEISSNER, G. & MACLENNAN, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **265**, 2244-56.
- ZORZATO, F., MENEGAZZI, P., TREVES, S. & RONJAT, M. (1996). Role of malignant hyperthermia domain in the regulation of Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **271**, 22759-63.







L'excitation nerveuse d'une cellule musculaire produit une libération massive dans le cytoplasme du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum sarcoplasmique (RS). L'augmentation de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenche la contraction. Ce processus, appelé couplage excitation contraction (CEC), requiert des interactions physiques entre deux canaux calciques : (1) le récepteur des dihydropyridines (DHPR), un canal calcique activé par le voltage ; le DHPR est composé de plusieurs sous-unités, dont la sous-unité  $\alpha 1\text{S}$ , qui forme le canal et le détecteur de potentiel, et la sous-unité  $\beta 1\text{a}$ , entièrement cytoplasmique; (2) le récepteur à la ryanodine (RyR1) responsable de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RS. La sous unité  $\beta 1\text{a}$  interagit avec la sous-unité  $\alpha 1\text{S}$  et RyR1. Au cours de ma thèse, j'ai identifié de nouveaux déterminants moléculaires et structuraux de l'interaction DHPR/RyR1. J'ai ainsi démontré l'existence d'interactions intramoléculaires entre les différentes boucles cytoplasmiques de la sous-unité  $\alpha 1\text{S}$  du DHPR, centrées autour d'un domaine appelé domaine A. J'ai également localisé le site d'interaction de la cavéoline-3 sur une boucle cytoplasmique de la sous-unité  $\alpha 1\text{S}$ . L'étude de l'interaction de la sous-unité  $\beta 1\text{a}$  avec RyR1 a montré (1) que la région C-terminale de  $\beta 1\text{a}$  contrôle cette interaction, (2) que l'affinité apparente de  $\beta 1\text{a}$  pour RyR1 est fortement augmentée par l'interaction de  $\beta 1\text{a}$  avec  $\alpha 1\text{S}$  et (3) que l'interaction  $\beta 1\text{a}/\text{RyR1}$  régule la fermeture du RyR. L'utilisation d'une toxine, la maurocalcine (MCA) qui se comporte comme un analogue du domaine A m'a permis d'identifier un domaine minimal de RyR1 responsable de la fixation de la MCA et du domaine A. Une étude structurale par RMN de ce site a été réalisée. Enfin, j'ai étudié l'effet de la MCA sur des myotubes n'exprimant pas la sous-unité  $\alpha 1\text{S}$ . J'ai montré que la MCA est capable de restaurer, en absence de DHPR, une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique induite par la dépolarisation de la membrane plasmique.

**Mots clefs :** récepteur des dihydropyridines, récepteur à la ryanodine, couplage excitation-contraction, calcium, maurocalcine, muscle, interactions protéine-protéine

---

In skeletal muscle, the action potential triggers muscle contraction through a massive calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR). This process, called excitation-contraction coupling (ECC), requires physical interactions between two calcium channels: (1) the dihydropyridine receptor (DHPR), a voltage-dependent channel composed of four subunits among which the  $\alpha 1\text{S}$  subunit, that forms both the pore and the voltage-sensor, and the  $\beta 1\text{a}$  subunit fully cytoplasmic, and (2) the ryanodine receptor (RyR1) which is responsible of calcium release from SR.  $\beta 1\text{a}$  subunit interacts with both RyR1 and the  $\alpha 1\text{S}$  subunit. The mechanism whereby the DHPR is functionally coupled to RyR1 is still not clearly understood. During my thesis, I identified new molecular and structural determinants of the interaction between RyR and DHPR. I demonstrated the existence of intramolecular interactions between the cytoplasmic loops of the  $\alpha 1\text{S}$  subunit centered on a domain called domain A. I also localized the site of interaction of the caveoline-3 on the I-II loop of  $\alpha 1\text{S}$ . The study of the interaction of the  $\beta 1\text{a}$  subunit with RyR1 showed (1) that the C-terminal region of  $\beta 1\text{a}$  controls this interaction, (2) that the affinity of this interaction is strongly increased by the interaction of  $\beta 1\text{a}$  with  $\alpha 1\text{S}$ , and 3) that the interaction  $\beta 1\text{a}/\text{RyR1}$  regulates the closure of RyR1. The use of a toxin, the maurocalcine (MCA) which behaves as an analogue of the domain A allowed me to identify a minimal domain of RyR1 responsible for the binding of the MCA and the domain A. A structural study by NMR of this domain has been realized. Finally, I studied the effect of the MCA on myotubes not expressing the  $\alpha 1\text{S}$  sub-unit. I showed that the MCA is capable of restoring in absence of DHPR, an increase of the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration triggered by the depolarization of the plasma membrane.

**Key words :** dihydropyridine receptor, ryanodine receptor, excitation-contraction coupling, calcium, maurocalcine, muscle, protein-protein interactions