



**HAL**  
open science

# Un lien entre les triades et les microtubules dans la cellule musculaire : Rôle de la triadine et de CLIMP-63

Alexis Osseni

## ► To cite this version:

Alexis Osseni. Un lien entre les triades et les microtubules dans la cellule musculaire : Rôle de la triadine et de CLIMP-63. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV066 . tel-01692880

**HAL Id: tel-01692880**

**<https://theses.hal.science/tel-01692880>**

Submitted on 25 Jan 2018

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Neurosciences et Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Alexis OSSENI**

Thèse codirigée par **Anne FOUREST-LIEUVIN** et par **Isabelle MARTY**

Préparée au sein de l'**Équipe Muscle et Pathologies** dirigée par le Dr. I. MARTY  
au **Grenoble Institut des Neurosciences - Inserm U836**  
dans l'**École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

# Un lien entre les triades et les microtubules dans la cellule musculaire : Rôle de la triadine et de CLIMP-63

Thèse soutenue publiquement le **23 octobre 2015**, devant le jury composé de :

**Monsieur, François, BOUCHER**

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes, Président

**Monsieur, Marc, BARTOLI**

Chargé de Recherche, Université de Aix-Marseille, Rapporteur

**Monsieur, Laurent, SCHAEFFER**

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Lyon, Rapporteur

**Monsieur, Vincent, GACHE**

Chargé de Recherche Inserm, Université de Lyon, Examineur

**Madame, Anne, FOUREST-LIEUVIN**

Chargée de Recherche CEA, Université de Grenoble Alpes, Directrice de thèse

**Madame, Isabelle, MARTY**

Directrice de Recherche Inserm, Université de Grenoble Alpes, Directrice de thèse



# Remerciements

---

Dans les prochaines lignes, je souhaite remercier celles et ceux qui m'ont aidé, de près comme de loin, dans mon aventure.

J'adresse mes premiers remerciements aux membres du jury de thèse, le Docteur Marc Bartoli, le Professeur Laurent Schaeffer, le Professeur François Boucher et le Docteur Vincent Gache. Je suis très honoré de l'enthousiasme de tous les membres pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et de participer à ce jury.

Je remercie l'A.F.M. et j'espère avoir contribué aux missions primordiales que l'association défend.

Je remercie Eric, mon 'parrain', qui me suit depuis mes premiers oraux en master pour ses coup de main avec ImageJ et pour ses questions qui remettent tout en cause (avec la fameuse phrase 'j'ai rien compris !'). Et merci pour ce fou rire avec Chantal Remy.

Durant ces années de thèse, j'ai eu l'opportunité de faire quelques vacances en licence. Je remercie ainsi toutes les personnes qui m'ont aidé et permis de faire ces vacances, en particulier Fiona et Catherine.

Je remercie Monsieur le Professeur de neuro-international Remy ! J'espère qu'il n'est pas trop déçu de ne pas être dans mon jury. Pour la soutenance de ma prochaine thèse, je penserai à lui !

Je remercie le phénoménale Monsieur. Jacques pour sa culture, ses réflexions, ses questions (il faut continuer à 'bouger' les premières années au neurodoc !) et son enthousiasme quand il s'agit de parler 'd'un bout' de biologie.

Je remercie l'ensemble du personnel du GIN que j'ai pu côtoyer et qui m'a patiemment supporté pendant ces 5 ans à l'institut. Je ne peux pas tous les citer car la liste serait trop longue mais je souhaite quand même une bonne et heureuse future retraite à mon ami George qui pourra se consacrer au basket.

Je souhaite remercier aussi tous les thésards du GIN qui ont terminé, ou qui sont en train de finir leur dur ‘labeur’ et en particulier : Vincent, Romain, Benoit, Eléa, Julie-Anne, Charlotte, Christelle, Mélina, Julie, Lucie et Marc.

Spéciale dédicace à une thésarde particulièrement douée mais qui s’obstine à travailler sur un organe peu utile : Marine L. Merci donc pour le soutien en cette fin de thèse, pour ses fous rires, ses invitation en cours de master, son soutien inébranlable et sa sympathie. Je pense vraiment qu’elle est faite pour être une biologiste ‘vrai de vrai’ ! Je garderai toujours en mémoire nos longues discussions scientifiques (ou non). Je lui souhaite de rester elle-même et de garder toujours cette étincelle lorsqu’on prononce le mot ‘science’ (qu’elle ne s’inquiète pas, nous réaliserons bientôt ces ‘Nature, Cell & Science’).

Je remercie tous les amis qui m’ont soutenu et en particulier Crousti, Tony et Bilou. Comme dirait Bazon ‘On te voit plus. Vivement que ça se termine...’

Je remercie mon ami Jakupédia, un ‘frère’ qui vient de partir aux Etats Unis, mais avec qui nous parlions autant de films et jeux que de science.

Un grand merci à ma famille. Désolé mon frère, mais nous y sommes. Maintenant un ‘fossé’ (académique ou non) nous sépare.

Bien sûr, je souhaite remercier tous les membres de l’équipe 4 ‘Muscle et Pathologies’, qui soit dit en passant, est LA meilleur équipe au monde. Merci pour ses moments de plaisir et de joie que nous avons vécus ensemble. J’ai profondément aimé travailler sur ma thèse. Je remercie tout le monde pour les sourires, la sympathie et le soutien permanent. Notre équipe est une ‘Famille’ où j’ai rencontré des gens fabuleux.

Pour changer, je commencerai par remercier les garçons (car sans ‘la pénurie de garçon en 2010’, jamais je n’aurai été pris dans LA meilleur équipe...). Merci donc : à Julien pour sa bonne humeur, les soirées jeux, sa motivation (l’homme qui propose de faire/d’analyser/et de discuter une manip plus vite que son ombre !) et toutes ses idées débordantes ; à Joël pour ses conseils avisés et ses histoires de retraite qui nous donnent tant envie de voyager ; à Klaus pour son calme et sa sympathie quotidienne ; à John pour ses remarques toujours aussi distinguées et ses manip toujours aussi loufoques ; à Laurent pour ses gâteaux/erreurs et ses séance de bonne bouffe ; à Didier pour ses phrases toujours aussi

révolutionnaires et son amour pour la microscopie ; à Brice ‘le double docteur’ avec qui j’ai pu partager mon bureau et qui, je pense, deviendra un très bon scientifique à condition qu’il suive bien les protocoles (et bien faire les dilutions !) ; à Stéphane, ancien thésard du labo qui est devenu un scientifique brillant. Je souhaite remercier aussi La journée de la femme qui nous a permis de passer des agréables moments en équipe notamment avec Guillaume et Anne-Sophie. Je remercie également : Diane pour sa bonne humeur quotidienne et ses tiramisus ; Nathalie pour son calme, sa sagesse et ses questions pertinentes ; Margaret pour ses ‘commandes’ et son caractère bien trempé (il lui faudra se trouver un autre ‘p’tit jeune’ !).

Je vais remercier particulièrement quatre personnes ‘Exceptionnelles’ avec qui il a été facile de travailler, rigoler et même trahir (pour mieux gagner à ‘Résistance’ !). Merci à vous pour ces débats sur nos manip’, sur les derniers films vus, sur nos échanges culinaires, sur les potins, sur les bandes annonces vues dans le bureau, sur les séances de shopping estivales et sur nos séances ‘langues de p...- de vipère-’... J’ai aimé travailler dans ces conditions, créées en grande partie grâce à vous !

Je remercie donc Oriana, ma deuxième paire de mains. Merci pour ces 16 mois (même si au final nous avons attendu les dernières semaines pour que ça marche !). Même si je l’ai déjà dit une centaine de fois, elle a de grandes capacités, il est facile de travailler avec elle et je suis honoré d’avoir pu travailler avec ses cotés. Je remercie aussi Mumu, qui est déjà la nouvelle star de l’équipe (et oui je pars !!!). Merci pour toutes les petites attentions, nos discussions sur nos projets, pour son investissement et pour notre entre-aide permanente ! Il est évident qu’Iron man me suivra vers ma prochaine destination ! Je remercie aussi celle qui a été *El locomotiv* : Marine C. Elle a été au début de ma thèse ma référence. Son travail, son assurance, sa joie de vivre et nos débats, m’ont vraiment inspiré. Elle est aussi brillante en salsa qu’en science. Tout au long de ma thèse, j’ai eu comme seul objectif de faire aussi bien qu’elle. Merci pour tout, j’espère que NY se porte bien et qu’elle s’éclate toujours autant. (petit rappel, qu’elle n’oublie pas les copains quand elle sera hyper connue avec *Danse avec les Stars US* !!!). Je remercie enfin le Pilier de cette équipe : Julie, la fille la plus stylée de l’institut ! Elle m’a souvent comparé à ses frères mais je sais que j’ai trouvé une ‘sœur spirituelle’ ! En effet, elle m’a toujours compris quand il s’agissait d’acheter une nouvelle paire de chaussures. Je la remercie pour son aide permanente, pour toutes ces soirées ou nos fous rires, nos séances de cinéma, nos séances web-shopping et j’en passe... Ce fut un réel plaisir de travailler avec elle.

Je remercie maintenant les deux femmes qui m'ont permis de réaliser cette aventure : Anne et Isabelle. Je les remercie pour la confiance placée en moi il y a maintenant cinq ans. Elles ont toujours cru en moi et m'ont toujours soutenu (jusqu'à me faire passer en master2, me trouver un financement de thèse et m'aider pour trouver un post-doc !). Il est vrai que j'ai trouvé 'deux mères' qui se sont toujours inquiétées de mon avenir ! Je voudrais les remercier pour m'avoir fait découvrir et aimé le monde de la recherche. Certes, certains moments ont été plus difficiles que d'autres mais je ne garde en mémoire que d'excellents souvenirs. J'ai la chance d'avoir eu deux encadrantes exceptionnelles et complémentaires (certes, il faut parfois se battre corps et âme pour défendre ses idées contre deux personnes qui y sont fermement opposées !). Je rends hommage à leur bonne humeur, leur disponibilité quotidienne, leur enthousiasme et leur implication permanente. Avoir deux co-directrices de thèse n'est pas facile, mais je pense avoir eu les deux meilleures !

Pour conclure, je remercie celle qui m'a toujours soutenu.

Tu as toujours su être patiente, à mon écoute (et je sais que je parle beaucoup !), compréhensive (même quand je rentre tard !) et disponible. Merci pour tous ces moments (nos voyages et nos moments ensemble ou en famille). Tu as été mon moteur au quotidien, grâce à toi durant ces années j'ai pu trouver mon équilibre. Tu as toujours su me remonter le moral même quand la flamme était petite ! Je ne sais pas encore quelle est notre destination mais je sais que je ne pars pas seul !

Merci à toi ma belle. Merci à toi Marine.

*A Mahé, Icare et Zéphyr qui seront, je l'espère,  
la prochaine génération de scientifiques*





# Résumé:

---

La contraction musculaire est provoquée par un relâchement massif de calcium à partir du reticulum sarcoplasmique (RS) des cellules musculaires. Ce relâchement de calcium réalisé par le récepteur de la ryanodine (RyR1), s'effectue dans des structures membranaires spécialisées et très organisées : les triades. Cette architecture spécifique est essentielle à l'activité correcte de RyR1. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la formation et le maintien des triades ne sont pas connus. La triadine, qui est une protéine localisée dans la membrane du RS et qui est associée à RyR1, pourrait jouer un rôle dans la structure du reticulum sarcoplasmique pour permettre un relâchement de calcium efficace. L'équipe a montré que l'ablation du gène de la triadine chez la souris induisait une altération des relâchements de calcium et une modification de la forme des triades.

Nous avons montré que la triadine pouvait indirectement interagir avec les microtubules et qu'elle pourrait ancrer le RS aux microtubules (Fourest-Lieuvain, J Cell Science, 2012). Par analyse en spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec la triadine, nous avons identifié un nouveau partenaire de la triadine, CLIMP-63 qui pourrait être impliqué dans cette fonction. CLIMP-63 est décrite comme une protéine capable d'ancrer le reticulum aux microtubules et de maintenir la forme du reticulum endoplasmique. Nous avons ensuite confirmé son interaction avec la triadine par différentes approches dans différents modèles cellulaires. L'étude et la caractérisation de CLIMP-63 dans le muscle sont tout à fait innovantes et nous avons étudié les conséquences de l'association triadine/CLIMP-63 pour la fonction du muscle et dans la formation ou la maintenance des triades.

# Abstract:

---

Muscle contraction is achieved when an efficient excitation signal at the plasma membrane triggers intracellular calcium release. This process called “excitation-contraction (E-C) coupling” relies on a macromolecular protein complex, spanning the plasma membrane and the sarcoplasmic reticulum (SR), containing the calcium channel of the SR, the ryanodine receptor (RyR1). This calcium release complex is present exclusively in highly organized membrane structures called triads. A triad is composed of two SR terminal cisternae surrounding a plasma membrane transverse-tubule. This architecture is essential to sustain the activity of the calcium channel RyR1, which is located in the membrane of SR terminal cisternae. However, little is known about the molecular mechanisms allowing the formation and maintenance of SR terminal cisternae. Triadin is a member of this complex, present in the SR membrane and interacting with RyR1. Deletion of the triadin gene leads to partial disorganisation of SR membranes in skeletal muscles, with abnormal orientation of part of the triads. Triadin could play a role in the structure of sarcoplasmic reticulum to allow efficient E-C coupling.

We have shown that triadin could indirectly interact with the microtubules, and therefore anchor the sarcoplasmic reticulum to the microtubule network (Fourest-Lieuvin, J Cell Science, 2012). Using mass spectrometry analysis of proteins co-immunoprecipitated with triadin, we have identified a new partner of triadin, CLIMP-63 which could be involved in this function. CLIMP-63 is a shaping protein able to mediate the anchoring of the reticulum to microtubules and to maintain the shape of endoplasmic reticulum. We have dissected the interacting domains between CLIMP-63 and triadin, and study the consequences of this association for muscle function, and triad formation or maintenance.

# Abréviations

---

**Δcyto-CLIMP**: mutant de CLIMP-63 délété du domaine cytoplasmique

**Δcyto-T95**: mutant de Trisk 95 délété du domaine cytoplasmique

**2C>A**: mutant de Trisk 95 ayant les 2 simples mutations (C270A et C649A)

**Ac**: anticorps

**ADN**: DNA : acide désoxyribonucléique

**Arg**: arginine

**ARN**: RNA : acide ribonucléique

**ATP**: adenosine triphosphate

**BINI**: gène de l'amphiphysine de type 2

**Ca<sup>2+</sup>**: calcium

**C270A**: mutant de Trisk 95 : substitution d'une cystéine en position 270 par une alanine

**C649A**: mutant de Trisk 95 : substitution d'une cystéine en position 649 par une alanine

**CaCl<sub>2</sub>**: chlorure de calcium

**CHAPS**: 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

**CICR**: calcium induced calcium release

**CKAP4**: gène de CLIMP-63

**CLIMP-63**: cytoskeleton-linking membrane protein 63

**CLIMP-Alumen**: mutant de CLIMP-63 délété du domaine lumineuse

**CLIMP-MT(+)**: mutant de CLIMP-63 qui lie toujours les microtubules

**CLIMP-MT(-)**: mutant de CLIMP-63 incapable de lier les microtubules

**CMC**: 4-chloro-m cresol

**co-IP**: co-immunoprécipitation

**COS-7**: CV-1 in origin and carrying the SV40 genetic material

**Couplage-EC**: couplage excitation-contraction

**CRC**: complexe de relâchement du calcium

**CSQ**: calséquestrine

**Cter**: C-terminal

**Ctrl**: contrôle

**DHPR**: récepteur des dihydropyridines

**DMSO**: diméthylsulfoxyde

**DMEM**: dulbecco's modified eagle medium

**DNM2**: dynamine 2

**DTT**: dithiothréitol

**EDTA**: acide éthylène diamine tétracétique

**EDL**: extensor digitorum longus

**EGTA**: acide éthylène glycol tétracétique

**ERAD**: ER associated protein degradation

**ERGIC**: compartiment entre le golgi et le RE

**FDB**: flexor digitorum brevis

**FRAP**: redistribution de fluorescence après photoblanchiment

**GFP**: protéine fluorescente verte

**GTP**: guanosine triphosphate

**h**: heure(s)

**H<sub>2</sub>O**: eau

**HCl**: chlorure d'hydrogène

**HEK**: human embryonic kidney

**HM**: hyperthermies malignes *per* anesthésique

**HRP**: horseradish peroxydase

**HSP**: paraplégies spastiques familiales

**IC**: intracellulaire

**IF**: immunofluorescence

**IRMa**: interprétation des résultats Mascot

**IP**: immunoprécipitation

**jNM**: jonction neuromusculaire

**KCl**: chlorure de potassium

**kDa**: kilo Dalton

**KEKE**: domaine riche en lysine et glutamate

**KO**: knocked-out

**KO-tria**: souris invalidées pour le gène de la triadine

**MAP**: microtubule-associated protein

**ME**: EM : microscopie électronique

**MetOH**: méthanol

**MG23**: mitsugumine 23

**MgCl<sub>2</sub>**: chlorure de magnésium

**MOI**: multiplicity of infection

**MTM1**: myotubularine 1

**MTs**: MT : microtubules

**MTOC**: centre organisateur des microtubules

**MS**: spectrométrie de masse

**MS/MS**: spectrométrie de masse en tandem

**NaCl**: chlorure de sodium

**nanoLC**: chromatographie liquide à nano débit

**min**: minute(s)

**Nter**: N-terminal

**PBS**: phosphate buffer saline

**PBSTw**: PBS 0.1% Tween20

**PCR**: réaction en chaîne par polymérase

**PEI**: polyéthylèneimine

**PMSF**: fluorure de phenylméthanesulfonyle

**PNS**: surageant post-nucléaire

**pH**: potentiel hydrométrique

**PS**: pénicilline-streptomycine

**RE**: reticulum endoplasmique

**REEP**: receptor expression-enhancing protein

**REL**: RE lisse

**RER**: RE rugueux

**RLS**: rope-like structure

**RS**: reticulum sarcoplasmique

**RT**: température ambiante

**RyR1**: isoforme squelettique du récepteur à la ryanodine

**sec**: seconde(s)

**SERCA**: sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase

**SDS**: sodum dodécyl sulphate

**SDS PAGE**: électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

**siRNA**: small interfering RNA

**SOCE**: store operated calcium channel

**STIM**: stromal interaction molecule

**SVF**: sérum de veau foetal

**T95-lumen**: T95L

**tampon de SPM**: tampon de solubilisation de protéines membranaires

**tampon RIPA**: radio immuno precipitation assay buffer

**T95-ΔRLS**: mutant de Trisk 95 délété des séquences spécifiques induisant des RLS

**T95-mini**: TM : Tmini

**TRIA**: triadine

**TRDN**: gène de la triadine

**Trisk**: triadin skeletal

**Trisk 95**: triadine 95 : T95

**Tubules-T**: tubules transverses

**TVPC**: tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique

**U.I**: unite infectieuse

**VICR**: voltage induced calcium release

**WB**: Western blot

**WT**: wt: wild type



---

<b>I. Le muscle</b>	<b>5</b>
<i>I-1-Généralités</i>	5
<i>I-1-1-Muscle : types et structure</i>	6
<i>I-2-Le muscle squelettique strié</i>	7
<i>I-2-1-Développement du muscle strié</i>	7
<i>I-2-2-Organisation anatomique</i>	8
<i>I-2-3-Trois types d'unités motrices</i>	9
<i>I-2-4-Organisation cellulaire</i>	11
<i>I-2-4-1-Le motoneurone</i>	11
<i>I-2-4-2-L'appareil contractile du muscle squelettique</i>	12
<i>I-3-Les relâchements de calcium</i>	15
<i>I-3-1-Le rôle du calcium</i>	15
<i>I-3-2-Le couplage Excitation-Contraction</i>	15
<i>I-3-3-Le complexe de relâchement du calcium</i>	17
<i>I-3-4-Les modes de couplage : VICR versus CICR</i>	19
<i>I-4-Les protéines du complexe de relâchement du calcium</i>	20
<i>I-4-1-Le RyR</i>	21
<i>I-4-1-1-Topologies et localisations du RyR</i>	21
<i>I-4-1-2-Gènes et isoformes du RyR</i>	23
<i>I-4-1-3-Les régulateurs de RyR</i>	23
<i>I-4-1-4-Le RyR et ses partenaires protéiques</i>	23
<i>I-4-1-5-Les modèles de souris KO-RyR</i>	24
<i>I-4-1-6-Les maladies humaines liées à RyR1</i>	24
<i>I-4-2-Le DHPR</i>	26
<i>I-4-2-1-Topologie et localisation du DHPR</i>	26
<i>I-4-2-2-Les interactions avec RyR1</i>	27
<i>I-4-3-La calséquestrine</i>	27
<i>I-4-3-1-Gènes, localisation et structure de la CSQ</i>	27
<i>I-4-3-2-'L'éponge' à calcium du RS</i>	28
<i>I-4-3-3-Les fonctions et les modèles KO-CSQ</i>	28
<i>I-4-3-4-Les maladies humaines liées à CSQ</i>	29
<i>I-4-4-La junctine</i>	30
<i>I-4-4-1-Localisation et isoformes de la junctine</i>	30
<i>I-4-4-2-Topologie et structure de la junctine</i>	30
<i>I-4-4-3-Les fonctions et les modèles KO-junctine</i>	31
<b>II. La Triadine</b>	<b>33</b>
<i>II-1-La triadine</i>	33
<i>II-2-Historique, isoformes, gène et localisations de la triadine</i>	33
<i>II-3-Topologie et structures de la triadine</i>	34
<i>II-4-Oligomérisation et les domaines fonctionnels de la triadine</i>	35
<i>II-5-Les modifications post-traductionnelles de la triadine</i>	35
<i>II-6-La triadine et ses partenaires protéiques</i>	36
<i>II-7-Les modèle de souris KO-triadine</i>	36
<i>II-8-La triadine est une protéine structurante</i>	38
<i>II-9-Les maladies humaines liées à la triadine</i>	38

### III. Les Microtubules

39

---

<i>III-1-Généralités sur le Cytosquelette</i>	39
<i>III-2-La structure des microtubules</i>	40
<i>III-2-1-Les tubulines</i>	40
<i>III-2-2-Les microtubules</i>	41
<i>III-3-Dynamique des microtubules in vitro</i>	43
<i>III-3-1-Treadmiling : effet du 'tapis roulant'</i>	43
<i>III-3-2-L'instabilité dynamique</i>	44
<i>III-4-Les microtubules dans les cellules non différenciées</i>	45
<i>III-4-1-Le centre organisateur des microtubules</i>	45
<i>III-4-2-Les modifications post-traductionnelles (PTMs)</i>	46
<i>III-4-3-Les protéines associées aux microtubules (MAPs)</i>	47
<i>III-4-3-1-Les MAPs structurales stabilisatrices</i>	47
<i>III-4-3-2-Les MAPs déstabilisatrices</i>	47
<i>III-4-3-3-Les moteurs moléculaires</i>	47
<i>III-4-3-4-Les protéines de bouts 'plus' (+TIPs)</i>	48
<i>III-5-Les microtubules dans les cellules musculaires</i>	49
<i>III-5-1-Les microtubules durant la myogenèse</i>	49
<i>III-5-1-1-Fusion des myoblastes grâce aux +TIPs</i>	50
<i>III-5-1-2-Modifications post-traductionnelles des microtubules durant la différenciation myogénique</i>	50
<i>III-5-1-3-Mouvement des noyaux microtubules-dépendant</i>	51
<i>III-5-1-4-Protéines régulant la myogenèse musculaire via les microtubules</i>	52
<i>III-5-2-Les microtubules dans les cellules musculaires matures</i>	52
<i>III-5-2-1-Organisation en 'quadrillage'</i>	52
<i>III-5-2-2-Les microtubules, les triades et les noyaux</i>	54
<i>III-5-2-3-La dynamique des microtubules</i>	56
<i>III-5-2-4-La jonction neuromusculaire (jNM)</i>	56
<i>III-5-2-5-Les microtubules au cours du temps</i>	58
<i>III-5-2-6-Les microtubules et les maladies musculaires</i>	58

### IV. Le Reticulum

59

---

<i>IV-1-Le RE dans les cellules non différenciées</i>	59
<i>IV-1-1-Structure générale du RE</i>	59
<i>IV-1-1-1-L'enveloppe nucléaire (EN)</i>	59
<i>IV-1-1-2-Le reticulum endoplasmique lisse (REL)</i>	60
<i>IV-1-1-3- Le reticulum endoplasmique rugueux (RER)</i>	60
<i>IV-1-1-4-Les feuillettes ou les tubules de reticulum</i>	62
<i>IV-1-2-Les protéines impliquées dans les différentes structures de reticulum</i>	62
<i>IV-1-2-1-La structuration des tubules de RE</i>	63
<i>IV-1-2-2-La structuration des feuillettes de RE</i>	65
<i>IV-1-2-3-Les autres mécanismes importants pour la structuration du RE</i>	65
<i>IV-1-3-Dynamique et ancrage du reticulum</i>	66
<i>IV-1-3-1-Dynamique grâce aux microtubules</i>	66
<i>IV-1-3-2-les mécanismes de remodelage du RE</i>	67
<i>IV-1-3-3-L'ancrage du reticulum sur les microtubules</i>	69
<i>IV-2-Le RS dans les cellules musculaires</i>	69
<i>IV-2-1-Structure générale</i>	70
<i>IV-2-2-Le RS = le réservoir du calcium</i>	71
<i>IV-2-3-RE/RS, la formation du RS</i>	71
<i>IV-2-4-Les triades</i>	73
<i>IV-2-5-La formation des triades</i>	74

<b>V. CLIMP-63</b>	<b>75</b>
<i>V-1-Découverte de CLIMP-63</i>	75
<i>V-2-Topologie et structure de CLIMP-63</i>	75
<i>V-3-Localisation cellulaire de CLIMP-63</i>	77
<i>V-4-Oligomérisation et fonction sur les feuilletts de RE</i>	78
<i>V-5-Liaison avec les microtubules et fonction d'ancrage du RE</i>	79
<i>V-6-Les maladies liées à CLIMP-63.</i>	80
<i>V-7- CLIMP-63 dans les cellules différenciées.</i>	81
<b>EXPOSE DES RECHERCHES REALISEES</b>	<b>83</b>
<i>OBJECTIFS DE THESE</i>	83
<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>85</b>
<i>A-Ethique et modèles animaux.</i>	87
1. <i>Ethique et bonnes pratiques</i>	87
2. <i>La souris KO-triadine.</i>	87
<i>B-Les cellules</i>	88
1. <i>Les lignées cellulaires</i>	88
2. <i>Les cellules primaires</i>	89
3. <i>Stockage et congélation des cellules satellites</i>	89
4. <i>Les fibres dissociées</i>	90
5. <i>Culture cellulaire et Transfection</i>	90
6. <i>L'imagerie calcique sur des cellules en culture</i>	92
<i>C-Les anticorps, Immunomarquage et microscopie</i>	92
1. <i>Les Anticorps</i>	92
2. <i>Immunomarquage</i>	93
3. <i>La microscopie</i>	94
4. <i>Analyse de colocalisation des images d'IF sur des cellules musculaires FDB</i>	94
5. <i>Les statistiques</i>	94
<i>D-Les virus</i>	95
<i>Les adénovirus-associated virus</i>	95
<i>Les lentivirus</i>	95
1. <i>Clonage des plasmides viraux pour lentivirus</i>	95
2. <i>Production de lentivirus</i>	96
3. <i>Titration des vecteurs lentiviraux</i>	97
4. <i>Infection des cellules en cultures</i>	97
<i>E-La biochimie</i>	98
1. <i>Lyse des cellules en culture</i>	98
2. <i>Préparation d'homogénat et de microsomes de muscle squelettique</i>	98
3. <i>Dosage des protéines : méthode de Folin Lowry</i>	99
4. <i>Essai de co-sédimentation avec les microtubules</i>	99
5. <i>Immunoprécipitation (IP)</i>	100
6. <i>SDS-PAGE et Western Blot (WB)</i>	101
<i>F-La protéomique</i>	102
<i>G-La biologie moléculaire</i>	103
1. <i>Les constructions triadines</i>	103
2. <i>La construction T95-mini-GFP</i>	103
3. <i>La construction T95-lumen</i>	103
4. <i>Les constructions CLIMP-63 et siRNAs</i>	104

## Chapitre 1 : Le rôle de la triadine dans l'organisation de la membrane du reticulum à la triade. 107

<i>A) L'expression de Trisk 95 dans des cellules COS-7 induit des déformations du RE.</i>	109
<i>B) La déformation du RE par Trisk 95 est accompagnée d'une désorganisation du réseau de microtubules.</i>	111
<i>C) Le domaine luminal de Trisk 95 est structurant pour le RE et les microtubules.</i>	120
<i>D) Les deux cystéines et le motif coiled-coil sont responsables des propriétés structurantes de Trisk 95.</i>	123
<i>E) Les deux cystéines et le motif coiled-coil sont responsables de l'ancrage de Trisk 95 dans une cellule musculaire.</i>	125
<i>F) Les triades établissent des contacts avec les microtubules dans les cellules musculaires.</i>	126

## Chapitre 2 : Identification et caractérisation du partenaire de la triadine faisant le lien entre les microtubules et la triade. 129

<i>Identification et caractérisation du partenaire de la triadine capable d'associer Trisk 95 aux microtubules.</i>	131
<i>A) Recherche de partenaires de Trisk 95 par spectrométrie de masse comparative.</i>	131
<i>B) Caractérisation des cinq protéines sélectionnées dans des cellules COS-7.</i>	140
<i>C) Trisk 95 est associée avec CLIMP-63 endogène dans des cellules HEK293.</i>	143
<i>D) Le domaine luminal de Trisk 95 est indispensable pour son association avec CLIMP-63.</i>	144
<i>E) Les différentes isoformes de la triadine sont associées avec CLIMP-63.</i>	147
<i>F) Le domaine luminal de CLIMP-63 s'associe à Trisk 95.</i>	151
<i>G) Le phénotype RLS induit par Trisk 95 dépend de CLIMP-63 et de sa capacité à lier les microtubules.</i>	154
<i>H) Trisk 95 et CLIMP-63 sont associées dans des cellules musculaires</i>	158
<i>I) La présence de CLIMP-63 aux triades dépend de Trisk 95.</i>	161
<i>J) L'organisation des microtubules dépend de Trisk 95 via CLIMP-63.</i>	164
<i>Annexe : Chapitre 2.</i>	168

## Perspectives et Discussions 169

<i>Formation et maintien des triades : Actine / Microtubule ?</i>	171
<i>Le rôle de CLIMP-63 dans les cellules musculaires</i>	175
<i>Utilisation du dominant négatif : CLIMP-MT(-)</i>	175
<i>La souris KO-MSK-ind-CLIMP-63</i>	180
<i>Quels sont les mécanismes qui permettent de structurer le RS ?</i>	182

## Publications 187

<i>Article 1: Role of triadine in the organization of reticulum membrane at the muscle triad</i>	189
<i>Article 2: A link between microtubules and triads in muscle cells: role of triadin and CLIMP-63</i>	191

## Références 193



*'Une chose est sûre, les muscles ne servent pas qu'à faire joli l'été sur la plage' LS*



# Introduction

---



# I. Le muscle

---

## *I-1-Généralités*

Les muscles permettent les mouvements vitaux de la vie. Ils contrôlent le système respiratoire, le système sanguin, les battements cardiaques, régulent le tractus gastro-intestinal et les mouvements. La contraction musculaire permet aussi de soulever des charges, de contrôler les ouvertures du corps via les sphincters, de générer de la chaleur et de maintenir une posture.

Le tissu musculaire possède plusieurs propriétés physiologiques. Ces propriétés lui permettent de remplir ses fonctions. Le muscle est excitable. En effet, le muscle a la faculté de percevoir un stimulus et d'y répondre. Le muscle est un organe contractile et extensible. En effet, il a la capacité de se contracter avec force en présence de la stimulation appropriée. Cette propriété est spécifique au tissu musculaire. Il peut aussi s'étirer. Lorsque les fibres musculaires sont relâchées, on peut les étirer au-delà de la longueur de repos. L'élasticité est aussi une propriété physique du muscle. C'est la capacité qu'ont les fibres musculaires de s'étirer et de reprendre leur longueur de repos, après l'étirement. L'élasticité joue également un rôle d'amortisseur lors de variations brutales de la contraction. Enfin, le muscle a la propriété de modifier sa structure selon le travail qu'il effectue (notion de plasticité). Selon le type d'entraînement ou son type d'utilisation, le muscle s'adapte au type d'effort et on peut rendre ainsi un muscle plus résistant ou plus endurant.

### *1-1-1-Muscle : types et structure*

Trois types de cellules contractiles spécialisées existent:

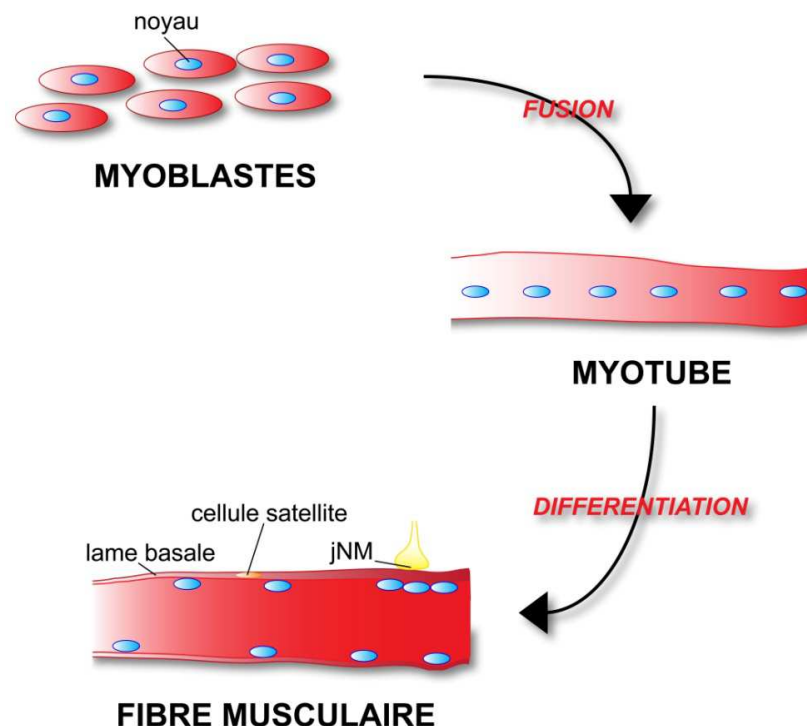
- 1- Le muscle strié squelettique est généralement associé au squelette. Il est à contraction volontaire.
- 2- Le tissu musculaire cardiaque est composé de cardiomyocytes et se situe uniquement au niveau du myocarde. Il se caractérise par son aptitude à se contracter rythmiquement et harmonieusement de façon spontanée. Il est innervé par le système nerveux végétatif. Le rythme des battements cardiaques est déterminé par l'activité du nœud sino-auriculaire.
- 3- Le muscle lisse est localisé dans la paroi des viscères et des vaisseaux. La contraction des muscles lisses, sous la dépendance du système nerveux végétatif est involontaire. Les nerfs, les hormones et les signaux intrinsèques contrôlent l'activité des muscles lisses, qui se contractent lentement.

Le système nerveux (influx sympathiques et parasympathiques) contrôle la durée, la vitesse et la force des trois types de muscle. Ces muscles présentent de nombreuses caractéristiques communes, mais différent par leurs mécanismes d'activation, l'arrangement de leurs filaments contractiles et leurs ressources en énergies.

## I-2-Le muscle squelettique strié

### I-2-1-Développement du muscle strié

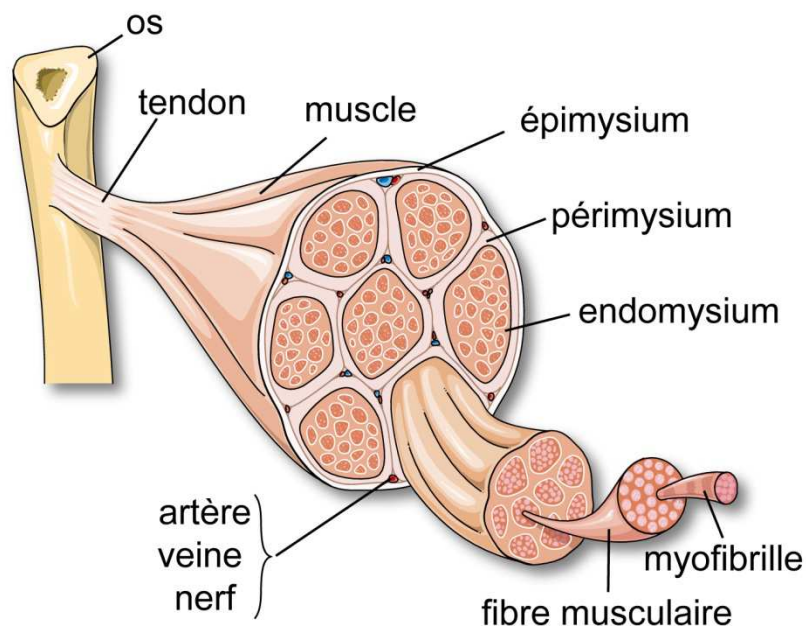
Née du feuillet moyen de l'embryon (mésoderme), la cellule musculaire passe par plusieurs stades de développement. Le myotube, issu de la fusion de plusieurs myoblastes, se différencie en fibre musculaire mature avec des noyaux multiples en périphérie (Figure 1). Des axones venus des neurones de la moelle épinière créent une jonction neuromusculaire (jNM) vers la dixième semaine de la vie embryonnaire. Pendant l'enfance et la puberté, la croissance va entraîner une augmentation du volume du corps musculaire d'environ vingt fois. La croissance du muscle après la naissance ne dépend pas d'une augmentation du nombre des fibres musculaires, mais d'une augmentation de leur diamètre et de leur longueur. Ces modifications sont soumises à des facteurs nerveux, mécaniques et hormonaux. Avec l'âge, les muscles s'amincissent et leur force diminue. Une non-utilisation ou une sous-utilisation du muscle joue un rôle important dans l'atrophie des fibres musculaires. Il y a perte de fibres musculaires et une diminution de leur taille. Un facteur de dénervation peut s'ajouter à ces lésions musculaires.



**Figure 1 : Myogenèse d'une fibre musculaire.** Représentation schématique des différentes étapes de la différenciation myogénique. Les myoblastes, cellules fusiformes avec un seul noyau, fusionnent pour former un myotube présentant initialement des noyaux centraux. La différenciation du myotubes se termine en fibre musculaire. Les noyaux migrent à la périphérie. La lame basale entoure la fibre et accueille les cellules satellites. Une accumulation de noyaux est visible sous la jonction neuromusculaire (jNM). *Adapté d'après 'Repère Savoir & Comprendre' AFM.*

## *I-2-2-Organisation anatomique*

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Chaque muscle est inséré sur l'os par l'intermédiaire de tendons constitués essentiellement de tissu fibreux, élastique et solide (Figure 2). Un muscle squelettique est entouré de plusieurs couches de tissu conjonctif. L'endomysium entoure chaque fibre musculaire alors que le périmysium assemble les différentes fibres musculaires en faisceau de fibres musculaire et que l'épimysium recouvre l'ensemble du muscle.



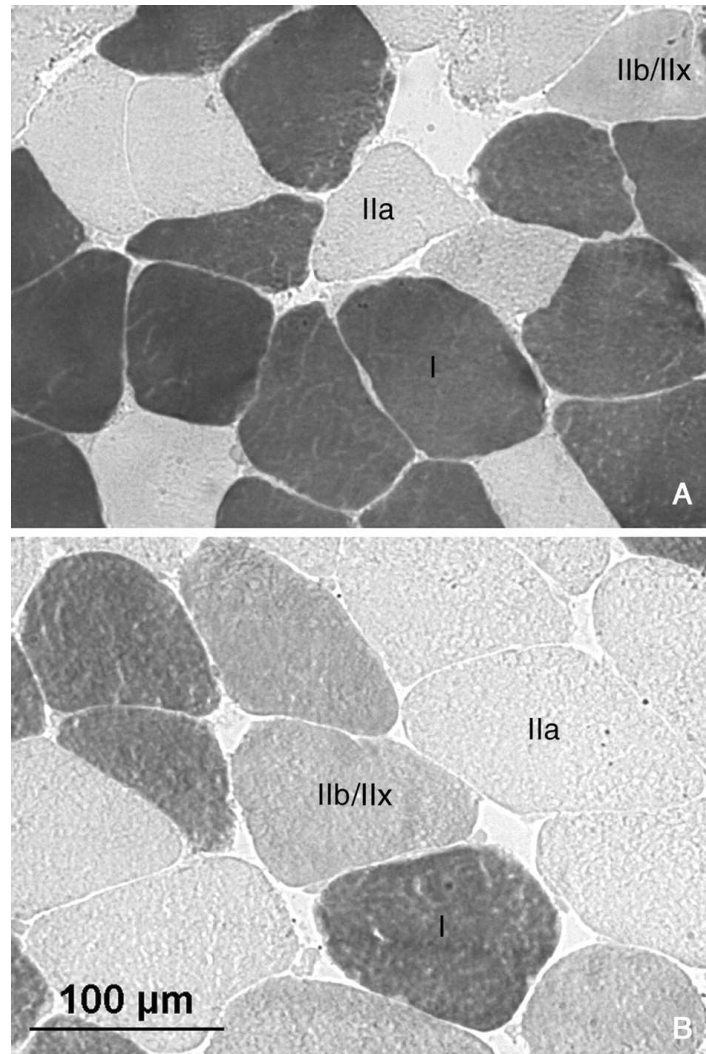
**Figure 2 : Organisation du muscle squelettique.**

Chaque fibre musculaire a une forme cylindrique allongée. Les cellules musculaires peuvent mesurer jusqu'à 50 cm de longueur d'une extrémité tendineuse à l'autre. Contrairement aux autres cellules de l'organisme, la cellule musculaire squelettique possède plusieurs noyaux, elles sont dites plurinucléées. Le muscle est aussi une véritable usine métabolique consommant de l'énergie et de nombreuses mitochondries y sont présentes. Ce sont elles qui produisent de l'énergie (ATP) directement utilisable par la fibre musculaire pour contracter les myofibrilles. La cellule musculaire est délimitée par une membrane plasmique ou sarcolemme qui présente de fines invaginations tubulaires réparties régulièrement le long de la fibre et y pénétrant profondément. Ces invagination de la membrane plasmique sont appelées tubules transverses ou tubule-T. Cette membrane est entourée par un réseau constituant la lame basale. C'est sous cette lame basale que sont situées les cellules satellites ou myoblastes dormants.



### *I-2-3-Trois types d'unités motrices*

Les muscles squelettiques sont formés de fibres musculaires de trois types : les fibres de type I, IIa et IIb (ou IIx) (Figure 3).



**Figure 3 : Coupe transversale de muscle de quadriceps humain.** Représentations des trois types de fibres : les fibres de type I, de types IIb (ou IIx) et de types IIa, par un marquage ATPase. (A) Tissu musculaires issu d'un sujet âgé. (B) Tissu musculaires issu d'un sujet jeune. Images d'après (Verdijk et al., 2007).

Les fibres de type I apparaissent sombre tandis que les fibres de type IIa et IIb/IIx dont l'activité ATPasique est faible, apparaissent respectivement en blanc et en rose. Les fibres musculaires innervées par un même motoneurone sont toutes du même type. On peut ainsi parler de type de fibres musculaires de type I, IIa et IIb/IIx, qui diffèrent par leurs propriétés structurales et fonctionnelles (Tableau 1).

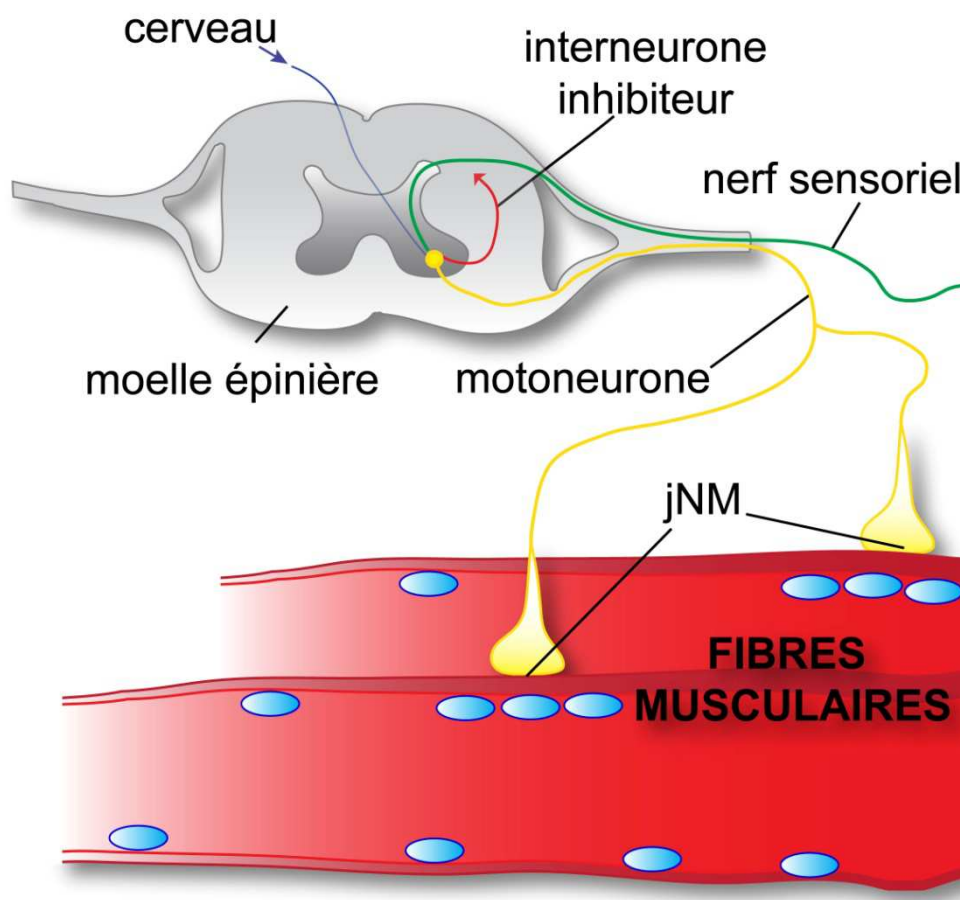
type de fibres musculaires	I	II b (IIx)	II a
vitesse de contraction	lente	rapide	très rapide
temps de contraction	long	court	très court
motoneurones	petit	moyen	grand
taille des axones	petit (10 $\mu\text{m}$ )	grand/moyen (15 $\mu\text{m}$ )	grand (17 $\mu\text{m}$ )
présence de mitochondries	☺☺☺	☹	☹☹☹
taille des mitochondries	0,9 $\mu\text{m}$	0,6 $\mu\text{m}$	0,3 $\mu\text{m}$
présence de myoglobine	☺☺☺	☹	☹☹☹
présence de glycogène	☹	☹	☺
type d'effort	endurance	résistance	explosif
durée moyenne de l'effort	heures	minutes	secondes
métabolisme	aérobique	anaérobique lactique et alactique	anaérobique lactique et alactique

**Tableau 1 : Les trois types de fibres du muscle strié.** Représentations des trois types de fibres : les fibres de type I (**rouge**), les fibres de types IIb/IIx (**rose**) et les fibres de types IIa (**blanc**). ☹ = très peu ou pas présent, ☹ = peu présent et ☺ = présent.

## I-2-4-Organisation cellulaire

### I-2-4-1-Le motoneurone

Les différents arcs réflexes comme le contrôle des actes moteurs s'expriment, de fait, par une seule voie finale commune : les motoneurones (Sherrington, 1906). Les motoneurones (ou nerfs moteurs) sont localisés dans la corne antérieure grise. Leurs axones myélinisés quittent la moelle épinière par la racine ventrale. Avant de quitter la moelle, ces axones se ramifient et donnent une collatérale, qui retourne dans la substance grise pour établir des contacts synaptiques excitateurs avec un inter-neurone inhibiteur. Cette cellule inhibitrice permet aux motoneurones d'être inexcitables et limite ainsi la fréquence maximale de leur décharge. Les motoneurones innervent les fibres musculaires squelettiques. À leur arrivée dans le muscle, leurs axones se ramifient pour établir des contacts synaptiques avec plusieurs fibres musculaires, on parle ainsi d'unité motrice. Le contact neurone moteur/fibre est appelé jonctions neuromusculaires (jNM) (Figure 4).

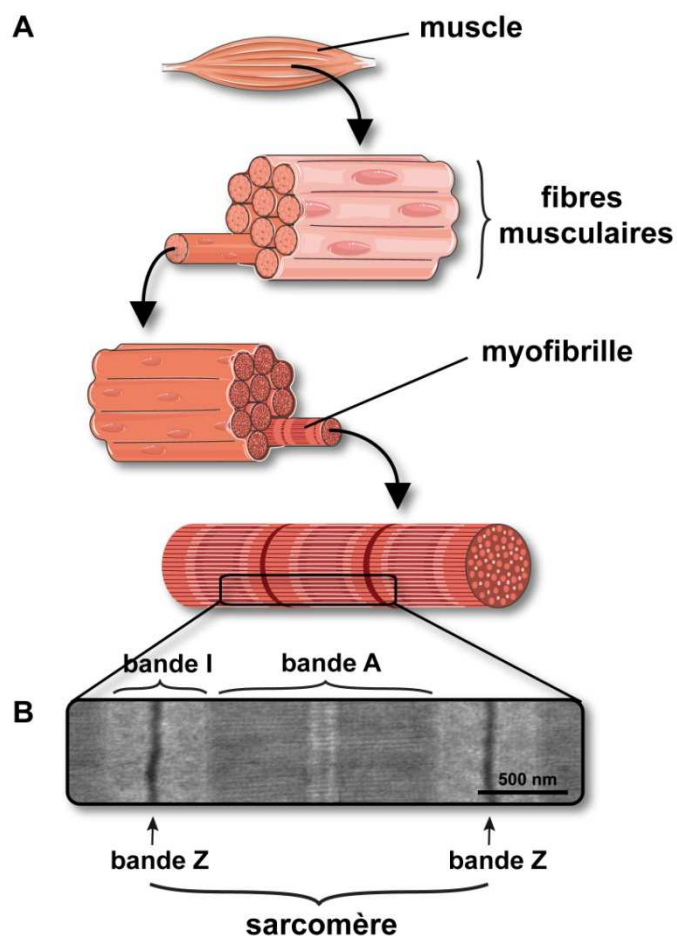


**Figure 4 : L'unité motrice.** Représentation schématique de l'innervation de plusieurs fibres musculaires. Deux voies nerveuses contrôlent les neurones moteurs. Le cerveau est l'une de ces voies. Il permet le contrôle volontaire du muscle. D'autres stimuli proviennent par le nerf sensoriel via des circuits de réflexes locaux. Les inter-neurones inhibiteurs régulent ces voies. Jonction neuromusculaire (jNM).

Une fibre musculaire n'est innervée que par un seul motoneurone (Figure 4). L'ensemble constitué par un motoneurone et les fibres musculaires qu'il innerve constitue l'unité motrice. Plus la taille d'un motoneurone est grande, plus le diamètre de son axone est grand et plus grand est le nombre de fibres musculaires qu'il innerve. Il existe ainsi des unités motrices de différentes tailles. La taille des unités motrices est proportionnelle à la précision du mouvement lié au muscle envisagé. Les muscles du globe oculaire contrôlant des mouvements très fins de l'œil sont composés de très petites unités motrices, environ 3 à 4 fibres musculaires pour un motoneurone. Les unités motrices du biceps brachial contrôlant des mouvements puissants et relativement moins précis comprennent une centaine de fibres musculaires pour un motoneurone et les unités motrices du quadriceps près de 2000 fibres musculaires par motoneurone.

## *1-2-4-2-L'appareil contractile du muscle squelettique*

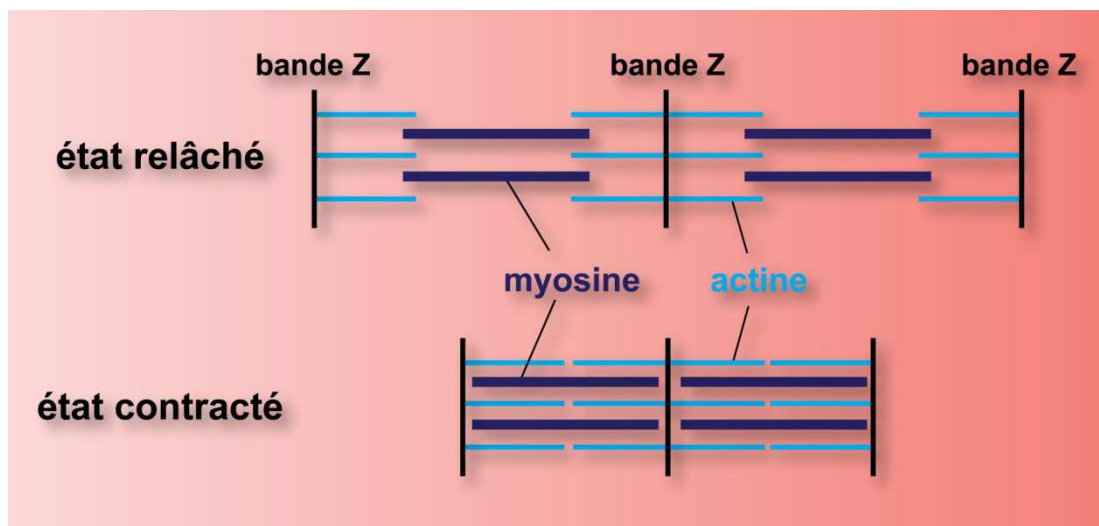
Les cellules du muscle squelettique sont toutes organisées spécifiquement pour optimiser l'efficacité des contractions (Figure 5).



**Figure 5 : L'appareil contractile des muscles squelettiques.** Représentation d'un muscle jusqu'à l'unité contractile. (A) La fonction de contraction du muscle composé de plusieurs fibres musculaires, est assurée par les myofibrilles, composées par la succession de sarcomères. (B) Image de microscopie électronique réalisée par Sarah Oddoux, d'une coupe longitudinale montrant l'arrangement des filaments minces ancrés aux bandes Z et disposés le long des filaments épais.

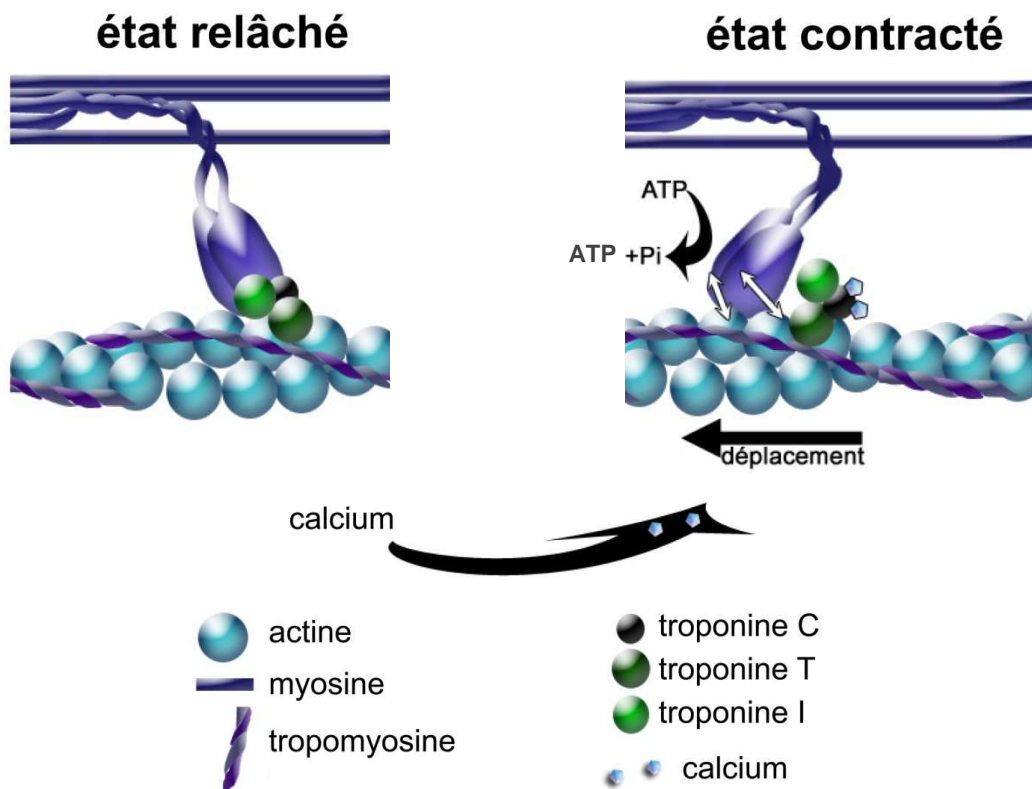
Le cytoplasme renferme principalement les myofibrilles, l'élément contractile des cellules musculaires. Les myofibrilles sont regroupées en faisceaux ce qui donne à la fibre sa striation longitudinale. La striation transversale caractéristique est due à la succession régulière dans les fibrilles de bandes alternativement sombres (anisotropes, bandes A) et claires (isotropes, bandes I) vue en microscopie électronique à transmission (Figure 5B). L'analyse de ses bandes révèle l'unité de contraction élémentaire des myofibrilles, le sarcomère. La succession des sarcomères compose une myofibrille. Les sarcomères donnent aux cellules cet aspect strié au microscope. La contraction est le résultat du glissement des filaments fins le long des filaments épais. Le sarcomère est défini anatomiquement par l'espace entre deux bandes Z.

Lors d'une stimulation du muscle, de manière simultanée dans tous les sarcomères, la distance entre deux bandes Z diminue entraînant un raccourcissement global de la cellule musculaire (Figure 6). L'actine et les protéines régulatrices qui lui sont associées composent les filaments fins. L'extrémité de chaque filament d'actine est ancrée à la bande Z par un réseau de protéines spécifiquement localisées à ce niveau, comme par exemple la protéine  $\alpha$ -actinine (Granger and Lazarides, 1978; Puszkin et al., 1977). La myosine compose les filaments épais. Lors de la contraction des sarcomères, les filaments épais de myosine glissent sur les filaments fins d'actine. Cette contraction est régulée par le calcium via le complexe troponines/tropomyosine.



**Figure 6 : Glissement des filaments épais de myosine sur les filaments fins d'actine de l'état relâché jusqu'à la contraction.** Deux sarcomères sont schématisés à l'état relâché et à l'état contracté. La myosine est représentée en **bleu foncé**, l'actine en **bleu ciel** et les bandes Z en noir.

La tropomyosine et le complexe des troponines permettent la fixation du calcium sur les filaments d'actine (Figure 7). Cet ensemble de protéines est responsable du glissement des filaments. Le complexe des troponines se compose de la troponine C qui lie le calcium, de la troponine T qui se lie à la tropomyosine et de la troponine I qui se lie à l'actine. Au repos, la troponine C ne fixe pas de calcium et le duo tropomyosine/troponine I masquent le site de liaison de la myosine sur l'actine. Lors d'une contraction, la troponine C fixe les ions calcium et change de conformation ce qui produit plusieurs événements. D'abord, la tropomyosine et la troponine I libèrent le site de fixation de la myosine sur l'actine. Ensuite, les têtes de myosine se fixent à l'actine et les filaments de myosine glissent le long de l'actine. Puis, l'hydrolyse de l'ATP permet le mouvement des têtes de myosine permettant le glissement des filaments épais de myosine sur les filaments d'actine. Enfin, la troponine C perd son calcium et ce dernier est recapté dans le RS. Le duo tropomyosine/troponine I inhibent de nouveau le site d'interaction entre l'actine et la myosine induisant la relaxation musculaire.



**Figure 7 : Régulation de la contraction via le complexe tropomyosine/troponines.** En absence de calcium, blocage du site de liaison de la myosine sur l'actine. En présence de calcium, les têtes de myosine se fixent sur les filaments d'actine et l'hydrolyse de l'ATP permet le repliement des têtes de myosine et ainsi le glissement des filaments épais sur les filaments d'actine. L'action simultanée des hydrolyses d'ATP permet le raccourcissement du sarcomère. *Schéma adapté de S. Oddoux*

## *I-3-Les relâchements de calcium*

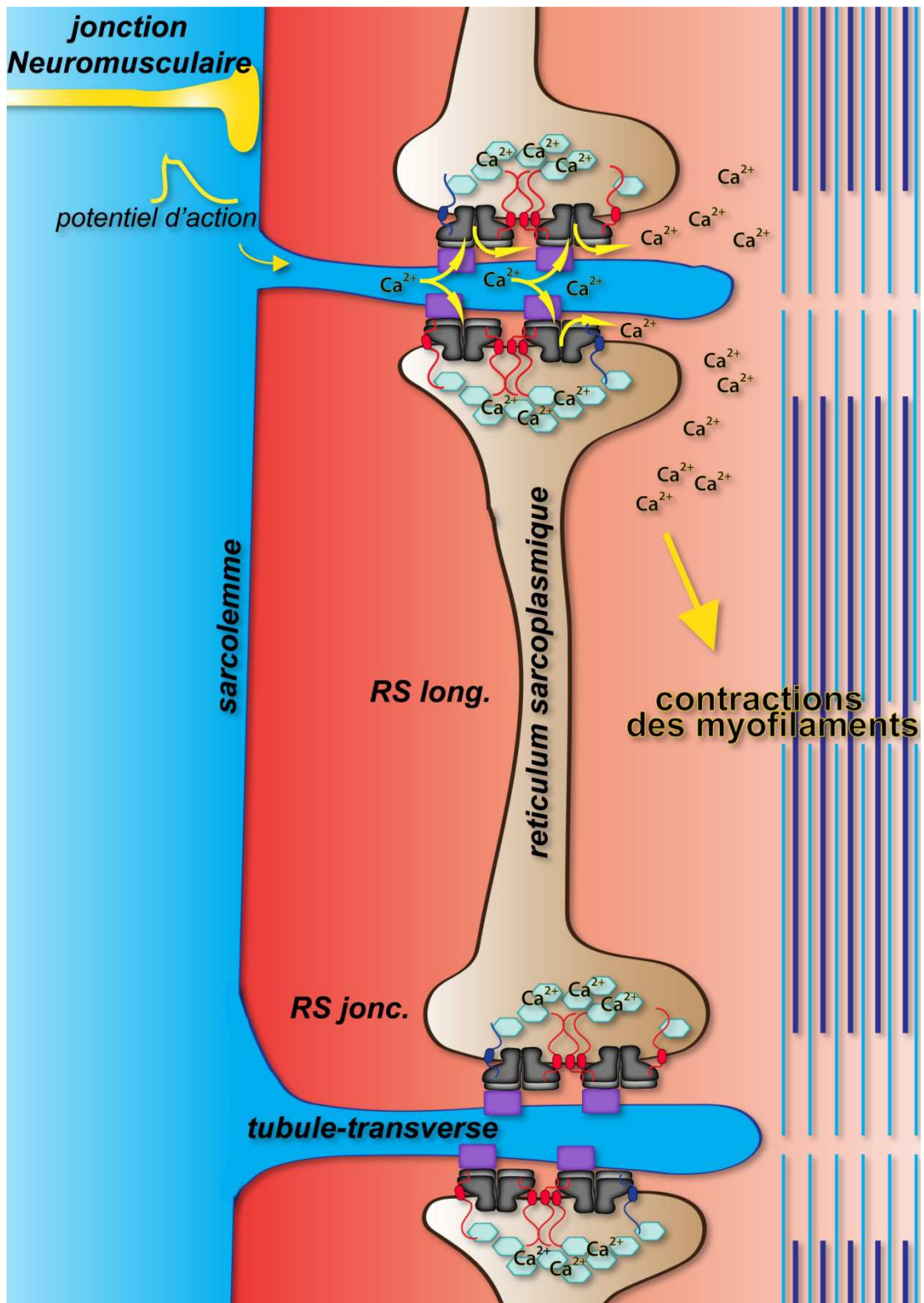
### *I-3-1-Le rôle du calcium*

Le calcium est donc l'élément clé de la contraction musculaire. En effet, le contrôle de la concentration calcique est central dans le déclenchement de la contraction musculaire. En réponse à une stimulation électrique, la sortie massive de calcium du reticulum sarcoplasmique (RS, réservoir principal de calcium) vers le cytoplasme permet la contraction des cellules musculaires. Ce processus est appelé couplage Excitation-Contraction (couplage E-C). Le mode de couplage est différent dans les muscles squelettique et cardiaque (cf chapitre I-3-4). La régulation précise du calcium nécessite une organisation et un développement de structures particulières spécifiques. Les triades dans les fibres musculaires squelettiques assurent ce rôle.

### *I-3-2-Le couplage Excitation-Contraction*

La jonction neuromusculaire est une zone privilégiée au niveau de laquelle s'effectue une neuro-transmission spécifique. C'est une synapse particulière entre une terminaison axonale motrice et une fibre musculaire. Le neurotransmetteur, l'acétylcholine, libéré par la terminaison nerveuse se lie au récepteur de l'acétylcholine, au niveau de la membrane plasmique et déclenche un courant électrique : le potentiel d'action. Celui-ci se propage le long de la membrane plasmique jusqu'au réseau de tubules-transverses (tubules-T) qui s'invaginent au cœur des fibres musculaires et provoque ainsi au niveau de la triade une libération des ions calcium. Le calcium libéré déclenche la contraction des unités sarcomériques provoquant la contraction des myofibrilles. Ce processus est appelé le couplage excitation-contraction (Figure 8) car il permet la transformation d'un signal électrique en un travail mécanique (Bers and Stiffel, 1993; Garcia et al., 1994; Lamb, 2000; Rios and Brum, 1987).

Figure 8 : L'organisation schématique du couplage excitation-contraction.



Légendes

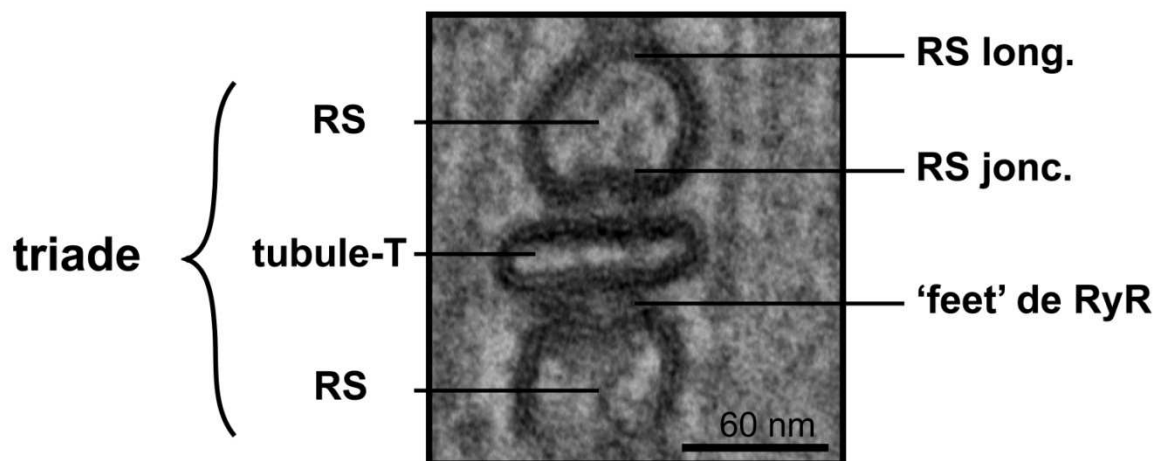
- |                                                                                     |         |                                                                                     |          |                                                                                     |              |                                                                                       |                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|  | RyR1    |  | Triadine |  | junctine     |  | DHPR                                                    |
| $Ca^{2+}$                                                                           | calcium |  | CSQ      |  | myofilaments |    | actino-myosine                                          |
|                                                                                     |         |                                                                                     |          |                                                                                     |              |                                                                                       | RS long. : RS longitudinal<br>RS jonc. : RS jonctionnel |



### *I-3-3-Le complexe de relâchement du calcium*

La contraction du muscle squelettique se produit lors d'une libération massive de calcium dans l'espace cytoplasmique. Cette libération de calcium est réalisée au sein d'un complexe : le complexe de relâchement du calcium (CRC) (cf Figure 12).

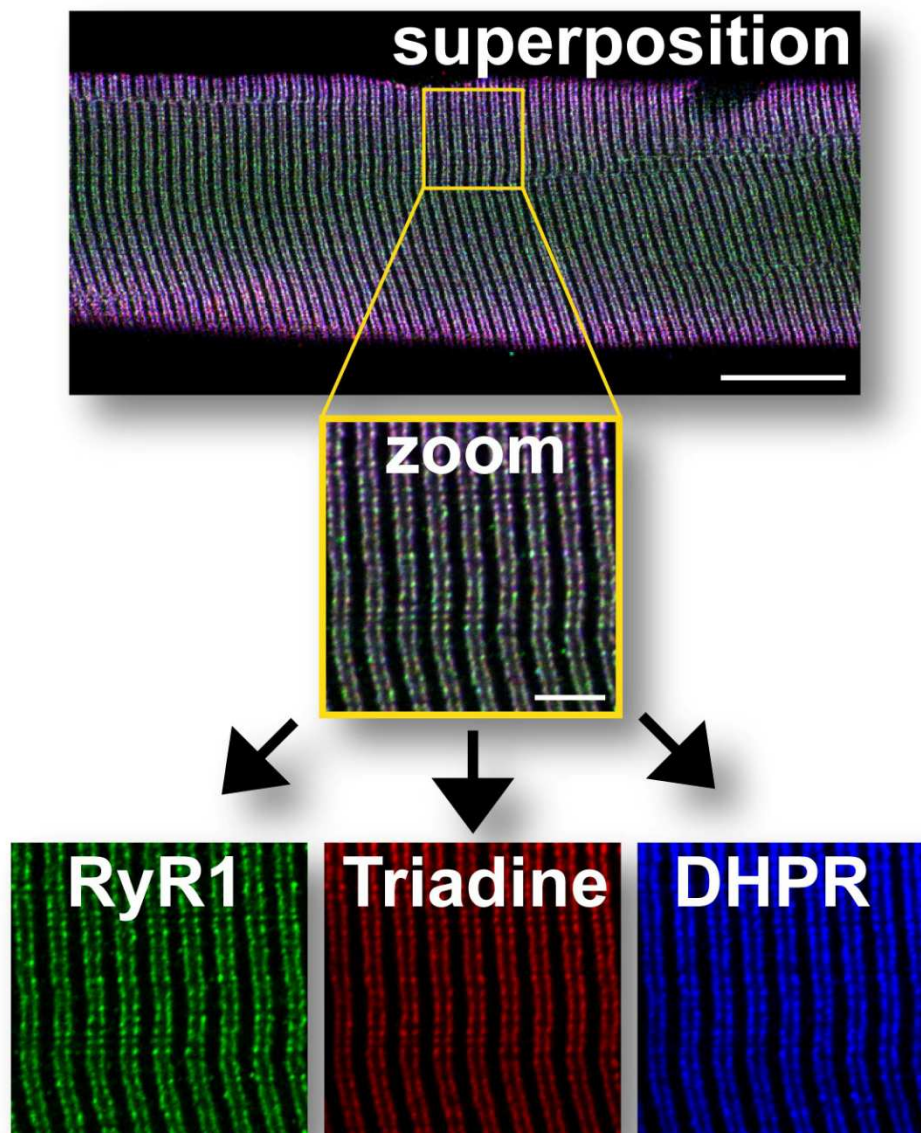
Dans le muscle squelettique, le complexe de relâchement du calcium est localisé au niveau d'une structure très particulière et très organisée que l'on nomme triade. La triade est le lieu de libération du calcium. Elle est composée de l'apposition de trois systèmes membranaires : deux appartenant aux citernes terminales du reticulum sarcoplasmique (RS) et une appartenant au tubule-T. La structure très spécifique de la triade (Figure 9) permet le couplage physique entre les deux principaux canaux calciques indispensable pour la libération de calcium (Protasi et al., 1997).



**Figure 9 : Triade musculaire observé en microscopie électronique.** tubule-T : tubule transverse, RS : citerne terminale de reticulum sarcoplasmique, RS long. : RS longitudinal, RS jonc. : RS jonctionnel. *Image réalisée par S. Oddoux.*

Ces deux canaux sont le récepteur des dihydropyridines (DHPR) situé dans les invaginations de la membrane plasmiques et le récepteur de la Ryanodine (RyR) situé dans la membrane du reticulum sarcoplasmique. La triade est une structure unique, spécifique et se localise précisément tout le long de la fibre musculaire (Figure 10).

La morphologie des triades est cruciale pour l'efficacité du complexe de relâchement du calcium. En effet la délétion de plusieurs protéines au niveau des citernes terminales du reticulum sarcoplasmique induit des défauts de relâchement de calcium et des modifications morphologiques au niveau des triades. Pour exemple, les souris invalidées pour le gène de la junctophiline-1, protéine décrite comme pouvant faire le pont entre la membrane du tubule-T et la membrane de RS, meurent à la naissance de dénutrition et montre des triades réduites et désorganisés (Ito et al., 2001). La forme de la triade est essentielle comme base structurale au couplage E-C.

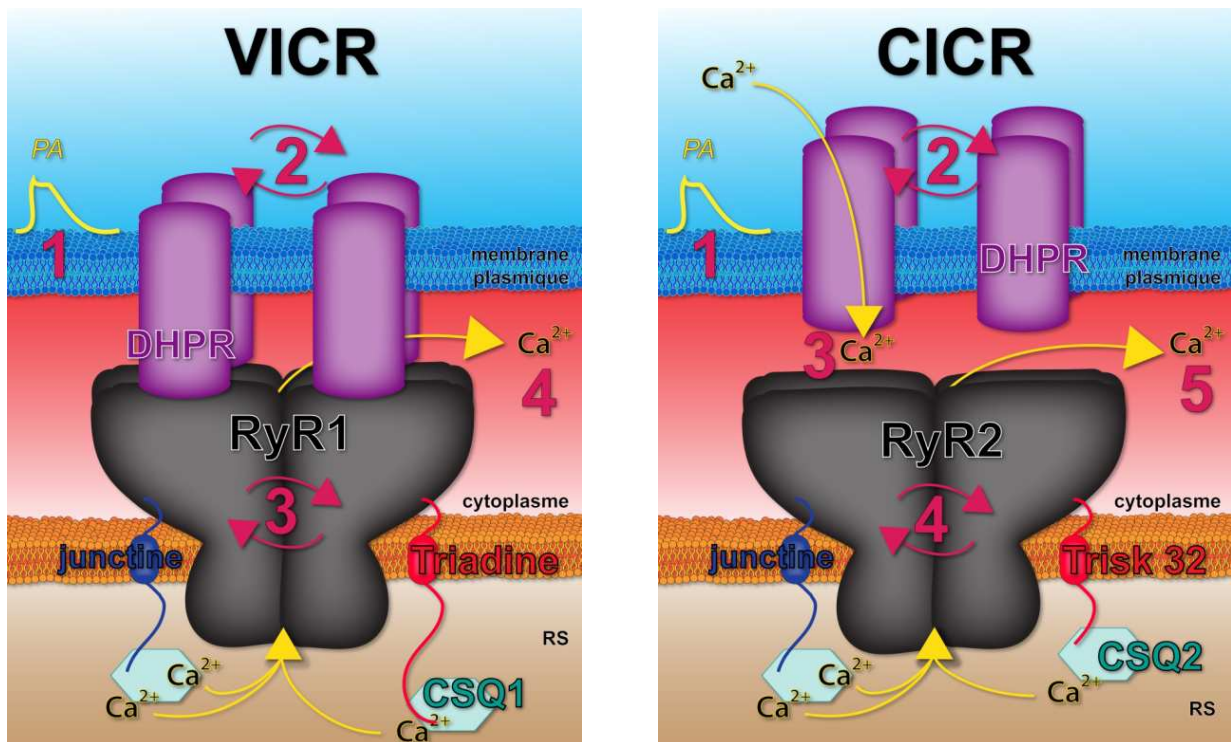


**Figure 10 : Localisation des protéines du complexe de relâchement du calcium dans une cellule musculaire par microscopie confocale.** Dans des fibres dissociées de muscle EDL de souris, la localisation de RyR1 (vert), de la triadine (Trisk 95, rouge) et du DHPR (bleu) ont été mis en évidence par marquage immunofluorescent. La superposition des trois marquages indique que RyR1, la triadine et le DHPR se trouve dans le même complexe, la triade. Les barres d'échelle de haut en bas sont respectivement de 20 et 5  $\mu\text{m}$ .

### I-3-4-Les modes de couplage : VICR versus CICR

Le mécanisme du couplage E-C est fondamentalement différent entre les cellules musculaires squelettiques et cardiaques (Bers and Stiffel, 1993; Garcia et al., 1994; Lamb, 2000; Rios and Brum, 1987) (Figure 11). Dans le muscle squelettique, une interaction physique entre RyR1 et le DHPR permet la libération du calcium (Marty et al., 1994a). Lors de l'arrivée du potentiel d'action au niveau des DHPR, ces récepteurs changent de conformation. Grâce à l'interaction physique entre le DHPR et RyR1, ce changement de conformation conduit à l'ouverture du canal RyR1 et à la libération du calcium. Ce mécanisme est appelé le 'Voltage Induced Calcium Release' (VICR) (Lamb, 2000). Au contraire, dans le muscle cardiaque, les deux canaux DHPR et RyR2 ne sont pas couplés physiquement. Seule la proximité spatiale des deux canaux est nécessaire. L'arrivée du potentiel d'action au niveau des DHPR provoque un influx de calcium extracellulaire qui va activer RyR2 et induire ainsi une libération de calcium hors des stocks calciques. Ce mécanisme est appelé 'Calcium Induced Calcium Release' (CICR) (Bers, 2002).

Figure 11 : Les modes de couplage dans les muscles squelettiques (VICR) et cardiaques (CICR).



- 1- arrivé du potentiel d'action (PA)
- 2- changement de conformation (↻) du DHPR
- 3- changement de conformation du RyR1
- 4- libération du calcium ( $Ca^{2+}$ ) par RyR1 dans le cytoplasme

- 1- arrivé du potentiel d'action (PA)
- 2- changement de conformation (↻) du DHPR
- 3- faible entrée de calcium ( $Ca^{2+}$ ) extracellulaire par le DHPR
- 4- changement de conformation du RyR2
- 5- libération du calcium par RyR2 dans le cytoplasme

#### *I-4-Les protéines du complexe de relâchement du calcium*

L'arrivée d'un potentiel d'action jusqu'aux tubules-T provoque le relâchement de calcium dans l'espace cytoplasmique à partir des stocks du RS. Le canal calcique RyR est la protéine centrale du complexe de relâchement du calcium et un certain nombre de protéines s'articule autour de lui (Figure 12).

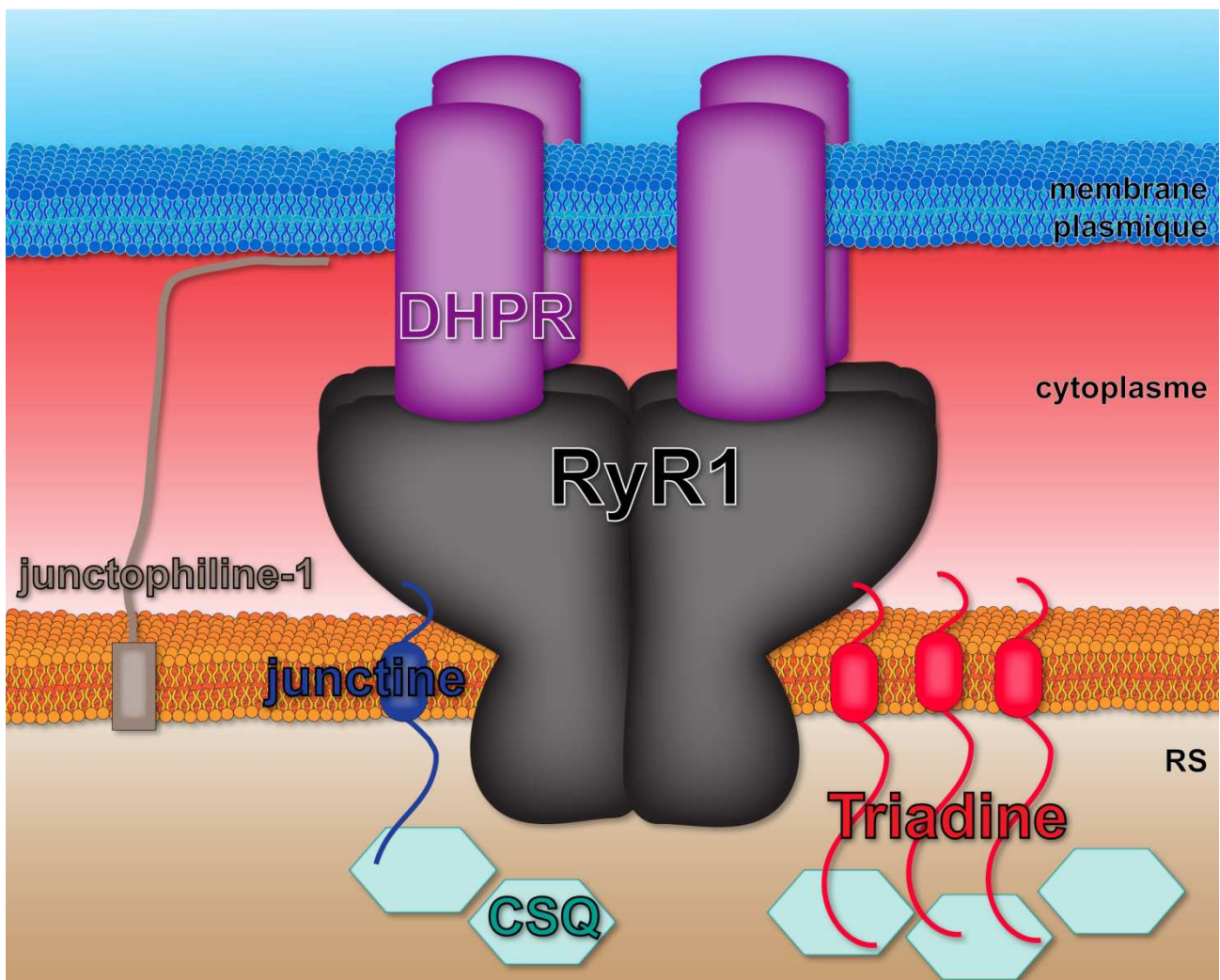
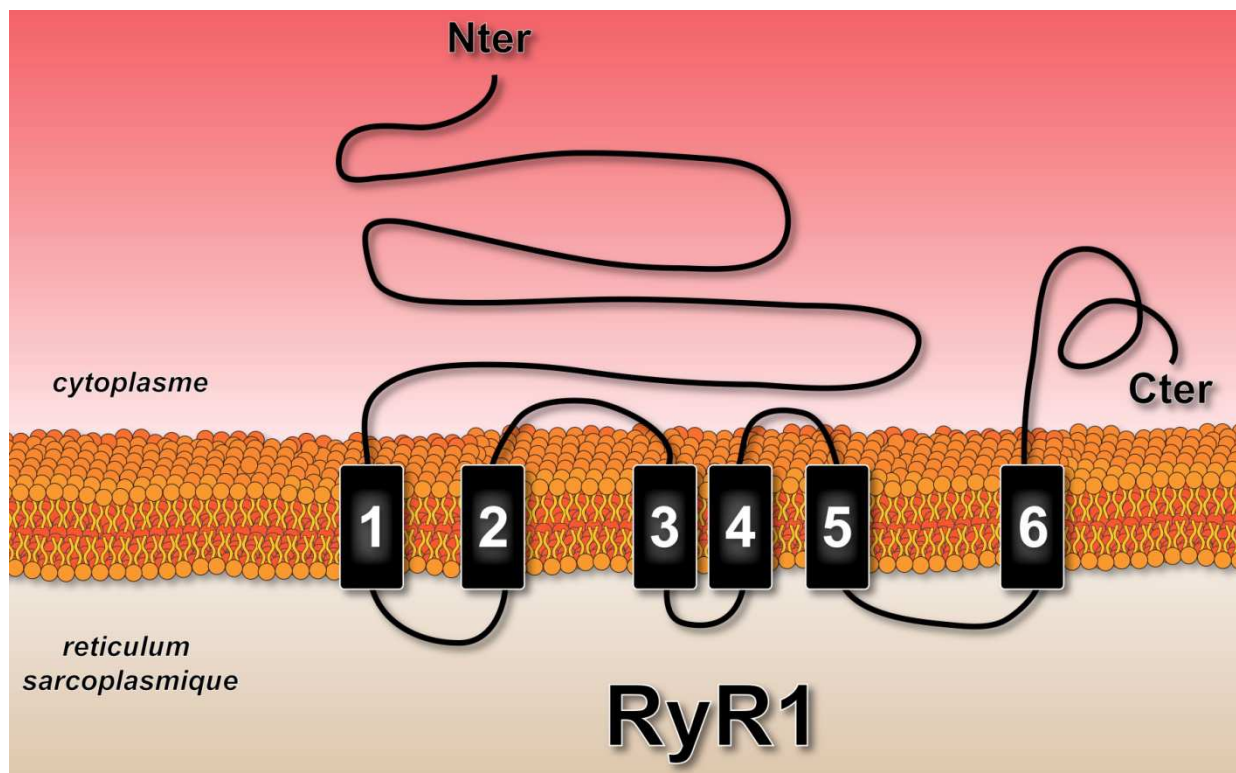


Figure 12 : Organisation schématique du complexe de relâchement du calcium et des protéines le composant.

## I-4-1-Le RyR

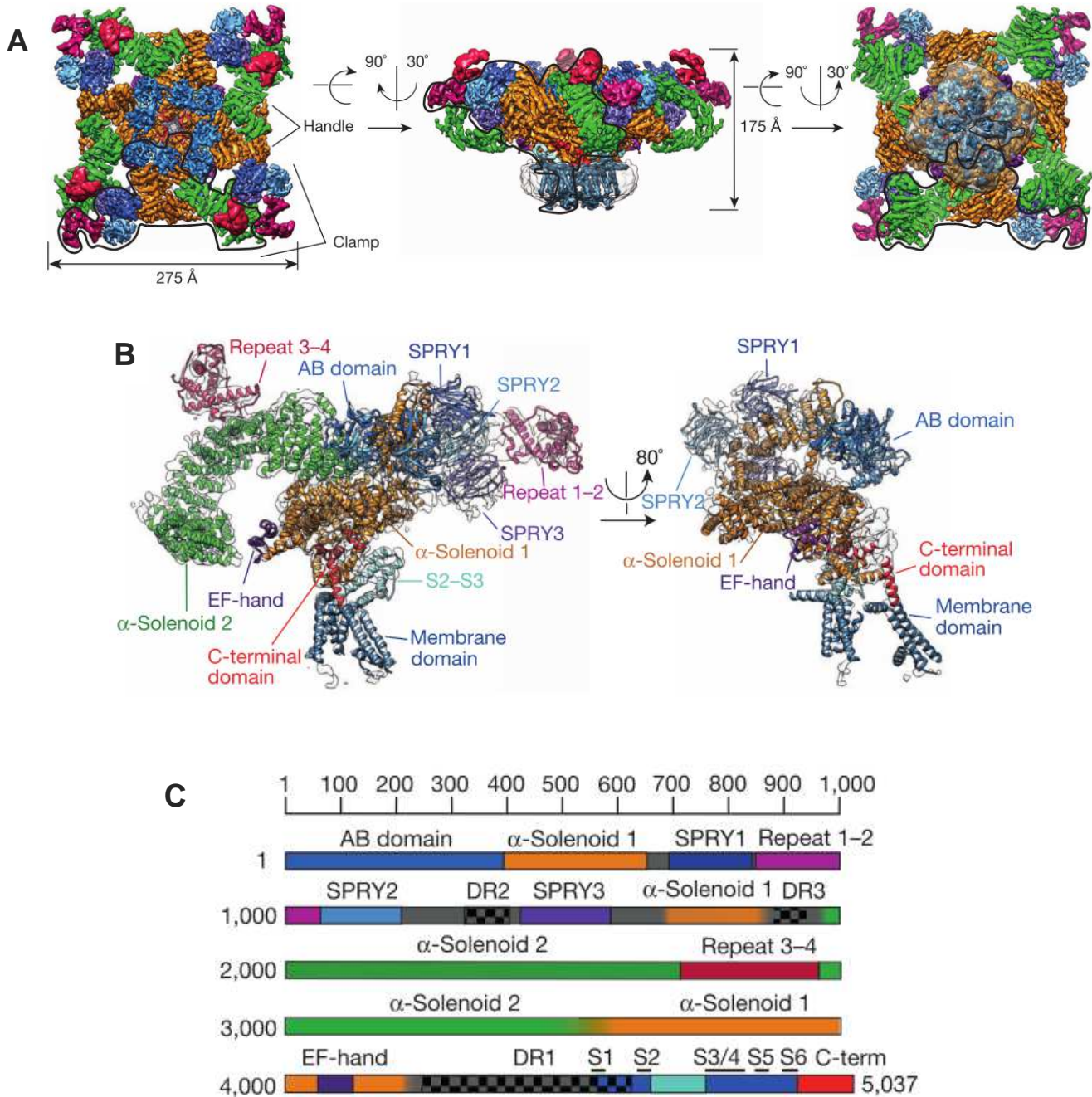
### I-4-1-1-Topologies et localisations du RyR

Le récepteur de la ryanodine (RyR) est un homotétramère d'environ 2,2 MDa constitué de quatre sous-unités. Chaque monomère de RyR d'environ 565 kDa, possède deux domaines. Le domaine C-terminal transmembranaire comporte le pore ionique qui communique avec la lumière du reticulum indispensable à la sortie du calcium vers le cytoplasme. Le domaine N-terminal cytoplasmique constitue environ 80% de la protéine et permet la régulation de cette protéine via son interaction avec d'autres protéines (Figure 13). La taille de cette protéine est tellement importante que le domaine N-terminal est visible en microscopie électronique sous forme de 'pied' dans l'espace cytoplasmique entre les membranes du RS et de la membrane plasmique (Block et al., 1988). Cette protéine est effectivement baptisée 'foot protein'. La protéine RyR se localise exclusivement au niveau du RS jonctionnel.



**Figure 13 : Topologie de RyR1 à six domaines transmembranaires. . Schéma adapté d'après (Meur et al., 2007)**

Avec ses 2.2 MDa, la topographie exacte de RyR n'est pas encore définie. Durant ces 25 dernières années, différents modèles ont été proposés. Le modèle retenu comporte six hélices transmembranaires (Gao et al., 2000; Meur et al., 2007) et ses extrémités N et C terminales sont toutes deux cytoplasmiques (Marty et al., 1994b). Très récemment, des études en cryo-EM ont permis de définir la structure globale de RyR à une échelle entre 4.8 et 6.1 Å définissant les domaines fonctionnels importants (Efremov et al., 2015; Yan et al., 2015; Zalk et al., 2015) (Figure 14).



**Figure 14 : L'architecture de RyR1.** (A) Structure en cryo-EM de RyR1 à une résolution de 6.1 Å. (B) Modèle moléculaire de RyR1. (C) Structures primaires de RyR1 avec les positions des différents domaines. Le code-couleur est identique dans A, B et C. D'après (Efremov et al., 2015).

### *I-4-1-2-Gènes et isoformes du RyR*

Le RyR possède trois isoformes, codées par trois gènes différents (*RYR1*, *RYR2* et *RYR3*, (McPherson and Campbell, 1993b; Meissner, 1994)). *RyR1* est l'isoforme principalement retrouvée dans le muscle squelettique (Giannini et al., 1995; Marks et al., 1989; Neylon et al., 1995; Takeshima et al., 1989; Zorzato et al., 1990). *RyR2* est l'isoforme cardiaque, principalement retrouvée dans le cœur mais c'est également la forme majoritaire dans le cerveau (Giannini et al., 1995; Kuwajima et al., 1992; McPherson and Campbell, 1993a; Nakai et al., 1990; Nakanishi et al., 1992; Otsu et al., 1990). *RyR 3* est décrite comme une isoforme ubiquitaire (Giannini and Sorrentino, 1995; Hakamata et al., 1992). Ces trois isoformes partagent environ 65% d'identité de séquence nucléotidiques (Hakamata et al., 1992).

### *I-4-1-3-Les régulateurs de RyR*

L'activité de RyR peut être directement modulée par des agents pharmacologiques. Deux classes d'agents ont pu être répertoriées : les agents agonistes qui d'une façon générale augmentent les relâchements de calcium et les antagonistes qui d'une façon générale bloquent ses libérations de calcium. Le RyR a été identifié à l'origine par l'utilisation d'un alcaloïde, la ryanodine (Rogers et al., 1948). En effet, ce dernier se fixe de manière spécifique et avec une grande affinité à la protéine RyR. La ryanodine a un effet opposé selon sa concentration. À faible concentration de l'ordre du nM, la ryanodine est un agoniste qui paralyse les muscles car il maintient le RyR dans une conformation ouverte conduisant à un RyR fuyant. Au contraire, à forte concentration (100µM), la ryanodine est un antagoniste qui abolit la conduction ionique, bloquant le RyR. Comme la ryanodine, le calcium lui-même peut activer le RyR à faible concentration (1 µM) alors qu'une concentration plus élevée, de l'ordre du mM, inhibe l'ouverture du RyR (Meissner et al., 1997; Schneider, 1994). La caféine et le 4-chloro-m-crésol sont des activateurs du RyR (Rousseau et al., 1988; Zorzato et al., 1993). Le dantrolène, le magnésium et le rouge de ruthénium sont antagonistes car ils inhibent le canal RyR.

### *I-4-1-4-Le RyR et ses partenaires protéiques*

*RyR1* interagit avec de nombreuses protéines et petites molécules qui assurent sa régulation. La partie cytoplasmique de *RyR1* permet la connexion avec de nombreuses protéines comme la Calmoduline, FKBP12 ou le DHPR alors que via sa partie luminale *RyR1* forme un complexe quaternaire avec la triadine, la junctine et la calséquestrine (Guo and Campbell, 1995; Zhang et al., 1997).

### *I-4-1-5-Les modèles de souris KO-RyR*

Des souris knockout (KO) des trois isoformes de RyR ont été développées et présentent des phénotypes différents. Les souris dyspédiques, invalidées pour le gène *RYR1*, meurent à la naissance d'arrêt respiratoire probablement dû à l'absence de contraction du muscle du diaphragme (Takeshima et al., 1994). Une perte du couplage E-C, ainsi qu'une réduction du courant de calcium entrant par le DHPR est observable dans les myotubes dyspédiques. RyR1 via un signal rétrograde vers le DHPR lui permet d'améliorer son activité fonctionnelle. En effet, la réexpression de RyR1 dans les myotubes dyspédiques rétablit le couplage excitation-contraction et permet le retour à une valeur normale du courant calcique du DHPR (Nakai et al., 1996). Les souris KO pour le gène de *RYR2* meurent *in utero* à environ dix jours de vie embryonnaire (Takeshima et al., 1998a) en présentant des malformations cardiaques suggérant que RyR2 est indispensable au développement du cœur. Au contraire, les souris KO pour le gène de *RYR3* sont viables (Takeshima et al., 1996).

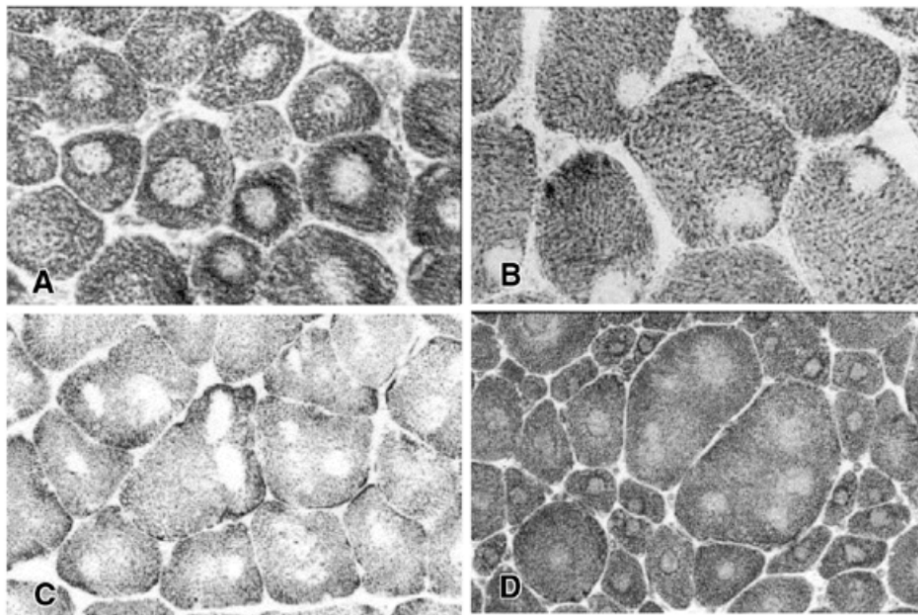
### *I-4-1-6-Les maladies humaines liées à RyR1*

RyR1 est le plus grand canal calcique connu à ce jour. Son rôle crucial dans la physiologie est indispensable pour la connaissance des pathologies liées à cette protéine. Il existe plus de 300 mutations identifiées sur la séquence complète de la protéine RyR (Monnier et al., 2005). Dans le muscle squelettique, les mutations dans RyR1 peuvent principalement conduire à des hyperthermies malignes (HM) *per* anesthésique, ou à des myopathies congénitales (myopathies à cores) (Monnier et al., 2001).

L'HM est une maladie pharmacogénétique héréditaire à transmission autosomique dominante liée à certaines mutations dans le gène *RyR1*. Chez les personnes porteuses de ces mutations, l'exposition à des anesthésiques halogénés comme l'halothane, peut être fatale et conduit à une hyperthermie, une rhabdomyolyse, une hypercapnie, un hypermétabolisme et une contraction généralisée. Seule l'administration rapide de dantrolène peut bloquer l'emballage de ce processus. Sans traitement, la crise est fatale dans 70% des cas. Un test IVCT (pour *in vitro* contracture test) réalisé à partir d'une biopsie peut mesurer la prédisposition d'un patient à l'HM.



Les myopathies à cores sont des maladies à transmission dominante ou récessive. Dans les fibres musculaires, les cores sont des désorganisations au niveau des sarcomères et sont caractérisées par la présence de régions dépourvues d'activité oxydative (Figure 15). La sévérité de la maladie peut aller d'une faiblesse musculaire localisée à des formes néonatales avec hypotonie majeure et insuffisance respiratoire, voir jusqu'à l'akinésie fœtale. Aucune prise en charge n'est disponible actuellement. Seul un dépistage génétique peut être réalisé dans la famille des patients.



**Figure 15 : Coupes transversales de muscle de patients avec différentes mutations dans RyR1.** Les marquages ont été réalisés avec la NADH-tetrazolium réductase (A et D) et la succinate déshydrogénase (B et C). *D'après (Monnier et al., 2001).*

De nombreuses protéines interagissent et modulent le RyR à commencer par le canal calcique lui faisant face sur la membrane plasmique : le DHPR.

## I-4-2-Le DHPR

### I-4-2-1-Topologie et localisation du DHPR

Le récepteur des dihydropyridines (DHPR) est une protéine qui est codée chez l'homme par le gène *CACNA1S*. C'est un canal voltage dépendant de la membrane plasmique identifié dans les muscles squelettiques et cardiaques (Mikami et al., 1989; Nakai et al., 1998; Tanabe et al., 1987). Il se localise spécifiquement et uniquement dans les tubules-T. Le DHPR est aussi appelé  $Ca_v1.1$  dans le muscle squelettique et  $Ca_v1.2$  dans le muscle cardiaque. C'est une protéine majeure dans le complexe de relâchement du calcium. L'intégrité de cette protéine est nécessaire au couplage E-C. Le DHPR est hétéropentamère composé de différentes sous-unités ( $\alpha1s$ ,  $\alpha2/\delta$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dans le muscle squelettique) qui ont chacune une fonction différente (Figure 16). Les souris dysgéniques, déficientes pour la sous-unité  $\alpha1s$  et les souris KO pour le gène de la sous unité  $\beta$ , ne sont pas viables et meurent à la naissance d'un déficit respiratoire (Gregg et al., 1996; Knudson et al., 1989). Au contraire, les souris invalidées pour la sous-unité  $\gamma$  ne semblent pas avoir d'altération sur le couplage excitation-contraction (Ursu et al., 2001).

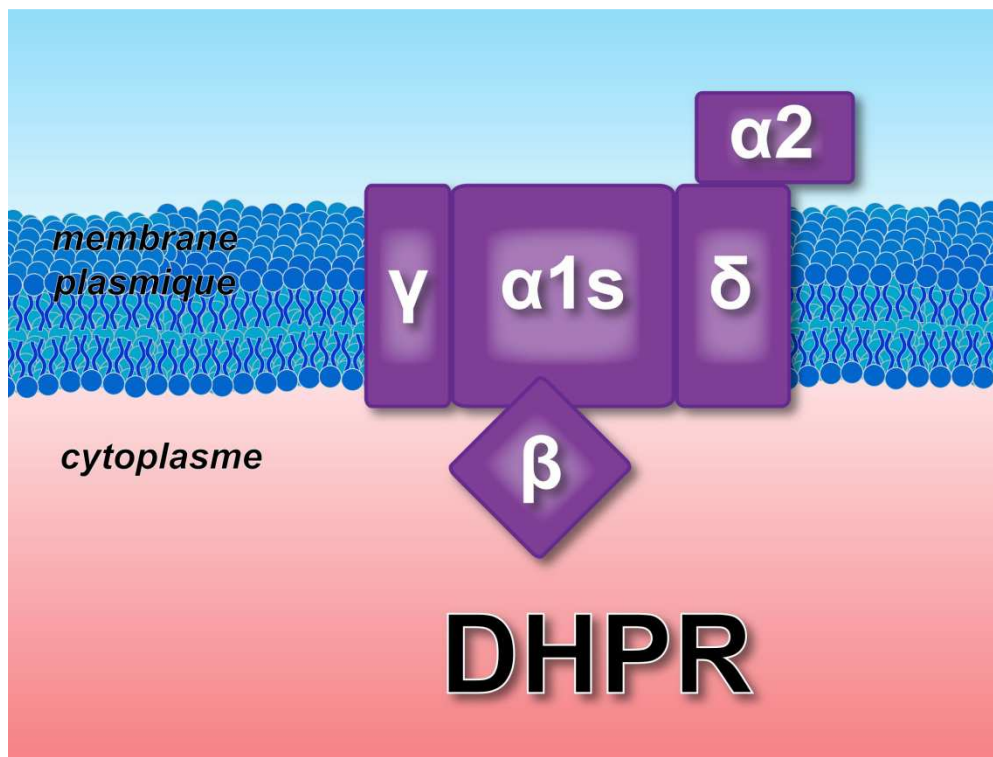


Figure 16 : Schéma de l'hétéropentamère DHPR dans le muscle squelettique.

### *I-4-2-2-Les interactions avec RyR1*

L'interaction physique entre RyR1 et le DHPR a été mise en évidence en 1994 par I. Marty (Marty et al., 1994a). Dans le muscle squelettique, plusieurs sous-unités du DHPR permettent son association avec RyR1 (Cui et al., 2009; Rebbeck et al., 2011; Tanabe et al., 1990). L'interaction entre le DHPR et le RyR1 est dépendante de l'alignement géométrique entre ces deux protéines (Protasi et al., 1998; Takekura et al., 1994). Au niveau des tubules-T, le DHPR est organisé en tétrades. Chaque tétrade est située en face d'un RyR (Block et al., 1988) de manière à ce que chaque DHPR soit face à un monomère de RyR afin de pouvoir assurer un couplage mécanique ou fonctionnel entre ces deux protéines. En revanche, un homotétramère sur deux de RyR seulement est couplé aux DHPR (Protasi et al., 1998).

Dans le reticulum sarcoplasmique (RS), le RyR forme un complexe quaternaire en interagissant directement avec la triadine et la junctine et indirectement avec la calséquestrine

### *I-4-3-La calséquestrine*

La calséquestrine (CSQ) est la principale protéine chélatrice du calcium dans le RS (Beard et al., 2004; Gyorke and Terentyev, 2008; Knollmann, 2009). La CSQ réside dans la lumière du RS. A elle seule, elle représente environ un tiers de l'ensemble des protéines du RS jonctionnel. C'est une protéine qui peut polymériser en fonction de la concentration en calcium et ces polymères sont visibles en microscopie électronique.

#### *I-4-3-1-Gènes, localisation et structure de la CSQ*

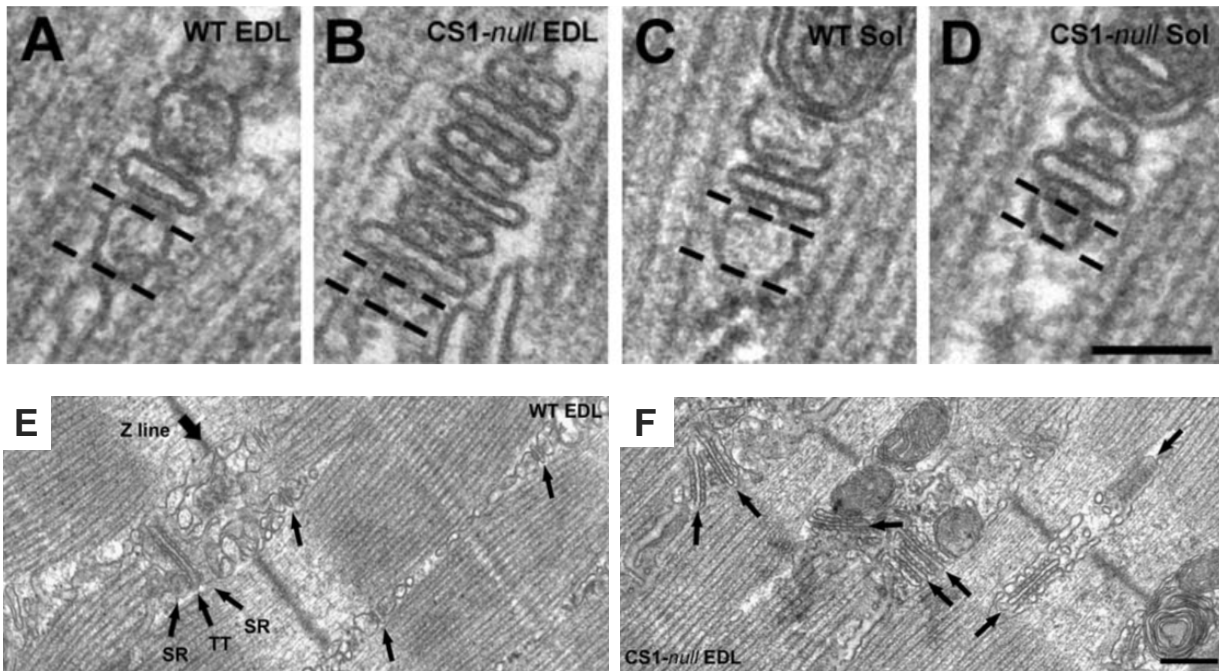
Deux isoformes de la CSQ résultent de l'expression de deux gènes distincts *CASQ1* et *CASQ2*. Chaque gène est composé de 11 exons et se localise sur le chromosome 1 (1q21 pour *CASQ1* et 1p11-p13.3 pour *CASQ2*). Les deux isoformes présentent une similitude de séquence protéique d'environ 80%. L'isoforme *CASQ2*, composée de 399 acides aminés, est l'isoforme cardiaque car elle est la seule présente dans le cœur. Au contraire, l'isoforme *CASQ1*, composée de 396 acides aminés, est l'isoforme majoritaire du muscle squelettique. C'est une protéine décrite de 63 kDa.

### *I-4-3-2-‘L’éponge’ à calcium du RS*

A la différence de protéines comme la calmoduline ou la troponine C, la calséquestrine ne possède pas de site de liaison du calcium spécifique comme un motif EF-hand. La structure primaire de la CSQ montre que c’est une protéine hautement chargée négativement. Environ un tiers de la protéine est composé de résidus acides. Chaque monomère de CSQ contient environ cinquante sites de liaison pour l’ion calcium (interaction électrostatique entre la CSQ et le calcium). La CSQ permet de stocker le calcium dans le RS. Elle peut lier le calcium avec une haute capacité et une faible affinité, ce qui lui permet à la fois le stockage et la libération rapide du calcium nécessaire à la contraction musculaire. Cette ‘éponge à calcium’ permet d’augmenter localement la concentration calcium d’un facteur vingt. La polymérisation de la CSQ dépend de la concentration calcique (Park et al., 2003). La CSQ est sous forme monomérique quand la concentration en calcium est faible et se polymérise quand la concentration en calcium augmente. En présence de forte de concentration de calcium, ces polymères linéaires sont essentiels à la bonne localisation de CSQ dans le RS. La CSQ a un double rôle. Elle permet le tamponnage du calcium ce qui permet de conserver la concentration de calcium libre dans le RS relativement basse. La CSQ permet aussi la régulation des relâchements de calcium durant le couplage E-C, car elle agit comme un senseur intraluminal pour RyR.

### *I-4-3-3-Les fonctions et les modèles KO-CSQ*

La CSQ est associé à la triadine et à la junctine (Kobayashi et al., 2000; Shin et al., 2000). La souris KO CSQ1 est viable et fertile (Paolini et al., 2007). Aucune compensation par CSQ2 n’est détectée dans les muscles squelettiques. La souris KO-CSQ1 présente trois types d’altérations structurales qui sont visibles en microscopie électronique (Figure 17). Identique à la souris KO-triadine (cf chapitres II-7 et IV-2-4), la souris KO-CSQ1 présente une diminution de la largeur des citernes terminales de RS et une modification de l’orientation des triades. De plus, elle présente des ‘triades multiples’, qui sont représentées par une alternance multiple de tubules-T et de citernes terminales de RS.



**Figure 17 : Dans la souris KO-CSQ1, les triades présentent des défauts structuraux. (A-D)** Images de microscopie à transmission (A-D) La largeur des citernes terminales de reticulum (délimitée par les pointillés) est diminué dans la souris KO-CSQ1 (CSQ1-null, B et C) quelle que soit le type de la fibre (EDL ou Sol=soleus). Barre d'échelle : 100 nm. (E et F) La souris KO-CSQ1 forme des triades 'multiples'. Les flèches représentent les triades. Z line= bande Z, SR=RS, TT, tubules-T. Barre d'échelle : 250 nm. *Images adaptés d'après (Paolini et al., 2007).*

Dans les souris déficientes en CSQ2, en condition basale, la fonction contractile cardiaque est normale avec une libération du calcium et un contenu calcique dans la lumière du RS normal. Cependant, lors d'une exposition des souris aux catécholamines, des troubles de relâchement de calcium sont observés entraînant des libérations spontanées de calcium anormales (épisodes de tachycardies ventriculaires, (Knollmann et al., 2006)). La souris KO-CSQ2 présente une baisse de l'expression de la triadine et de la junctine d'environ 70%.

#### *I-4-3-4-Les maladies humaines liées à CSQ*

Récemment l'équipe de Sorrentino a découvert la première mutation de CSQ1 causant une myopathie vacuolaire (Rossi et al., 2014). Dans le cœur, CSQ2 présente différentes mutations pathologiques tels que les TVPC (cf chapitre II-9) (Knollmann et al., 2006).

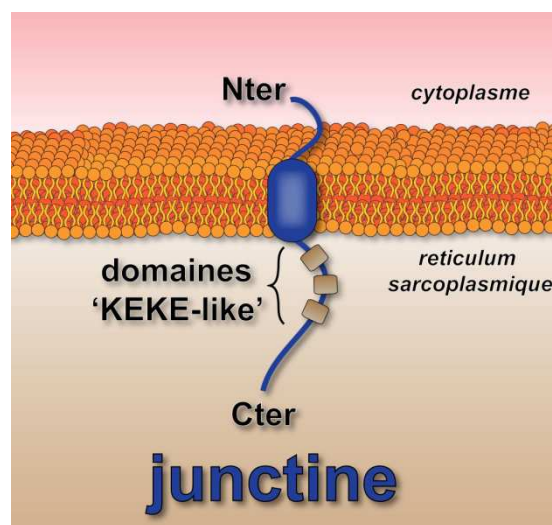
## *1-4-4-La junctine*

### *1-4-4-1-Localisation et isoformes de la junctine*

La junctine a été identifiée en 1988 comme la protéine ayant la plus grande capacité de liaison avec la calséquestrine dans le cœur et le muscle squelettique (Mitchell et al., 1988). La junctine est une protéine exclusivement localisée dans le muscle et qui appartient à la membrane du RS (Treves et al., 2000). Elle est issue de l'épissage alternatif du gène *ASPH* qui code aussi pour la junctate et l'aspartate- $\beta$ -hydroxylase. Ce gène localisé dans la région 8q12-1 chez l'homme (Feriotto et al., 2005) forme une protéine de 26 kDa (Jones et al., 1995). Il existe deux isoformes de la junctine, une forme longue composée de six exons et une forme courte composée de cinq exons.

### *1-4-4-2-Topologie et structure de la junctine*

La junctine a une topologie et une structure qui ressemble à la triadine (Figure 18). La partie transmembranaire de ces deux protéines est identique à 60%. La junctine est décrite comme une protéine transmembranaire de type II. Le domaine N-terminal cytoplasmique est court et est composé de 22 acides aminés. Le domaine C-terminal est dans la lumière du reticulum (acides aminés de 45 à 210). Ce domaine luminal est chargé positivement à différents endroits et ressemble au domaine KEKE de la triadine (domaine 'KEKE-like' cf chapitre II-4). Elle possède un seul domaine transmembranaire en hélice- $\alpha$  de 21 acides aminés (acides aminés 23 à 44).



**Figure 18 : Topologie de la junctine.**  
D'après (Treves et al., 2000).

### *I-4-4-3-Les fonctions et les modèles KO-junctine*

La junctine est capable de s'associer à la CSQ, RyR et la triadine (Guo and Campbell, 1995; Zhang et al., 1997). Le rôle précis de la junctine reste à ce jour inconnu. Dans certaines études, la junctine ne joue pas de rôle sur le couplage E-C ou dans la structuration des triades (Boncompagni et al., 2012). Au contraire dans d'autres études, la junctine participe au complexe de relâchement du calcium (Wang et al., 2009) où elle aurait un rôle combiné avec la triadine pour rapprocher les sites de stockage du calcium (les CSQ) des sites de libération du calcium (les RyR). Les souris KO-junctine présentent après injection d'isoprotérénol, des arythmies et des troubles du rythme (Altschafli et al., 2011). Sans injection, ces souris présentent tout de même, une mortalité augmentée. Un quart des souris décèdent avant trois mois et la moitié avant un an (Yuan et al., 2007). Les modèles animaux soulignent le rôle de la junctine dans la physiologie de l'homéostasie calcique, et la sévérité du phénotype associé à son absence.





## II. La Triadine

### II-1-La triadine

La triadine est une famille de protéines exprimées dans les muscles cardiaque et squelettique. De nombreux rôles ont été attribués à cette famille de protéines, notamment concernant la modulation de RyR, du couplage E-C, de la régulation de l'homéostasie calcique et plus récemment du maintien de la structure de la triade.

### II-2-Historique, isoformes, gène et localisations de la triadine

La triadine a été initialement identifiée à partir d'une fraction isolée du RS jonctionnel de muscle squelettique de rat comme une glycoprotéine membranaire de 95 kDa (Brandt et al., 1990; Kim et al., 1990). La triadine se lie avec le principal canal calcique du RS, la protéine RyR1 (Carl et al., 1995a; Carl et al., 1995b; Knudson et al., 1993a; Knudson et al., 1993b). Aujourd'hui, la triadine est décrite avec quatre isoformes. Toutes ces isoformes ont été clonées au laboratoire et sont connues sous l'abréviation Trisk (Marty et al., 2000; Vassilopoulos et al., 2005). Trisk est un acronyme pour TRIadin SKEletal et le chiffre désigne le poids moléculaire de chaque isoforme. Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32, sont les isoformes naturelles de triadine.

Toutes les isoformes de la triadine sont issues de l'épissage alternatif d'un seul gène, le gène *TRDN*. Ce gène, composé de 41 exons et de 420 kb, est localisé dans la région 6q22-6q23 chez l'homme (Thevenon et al., 2003) (tableau 2).

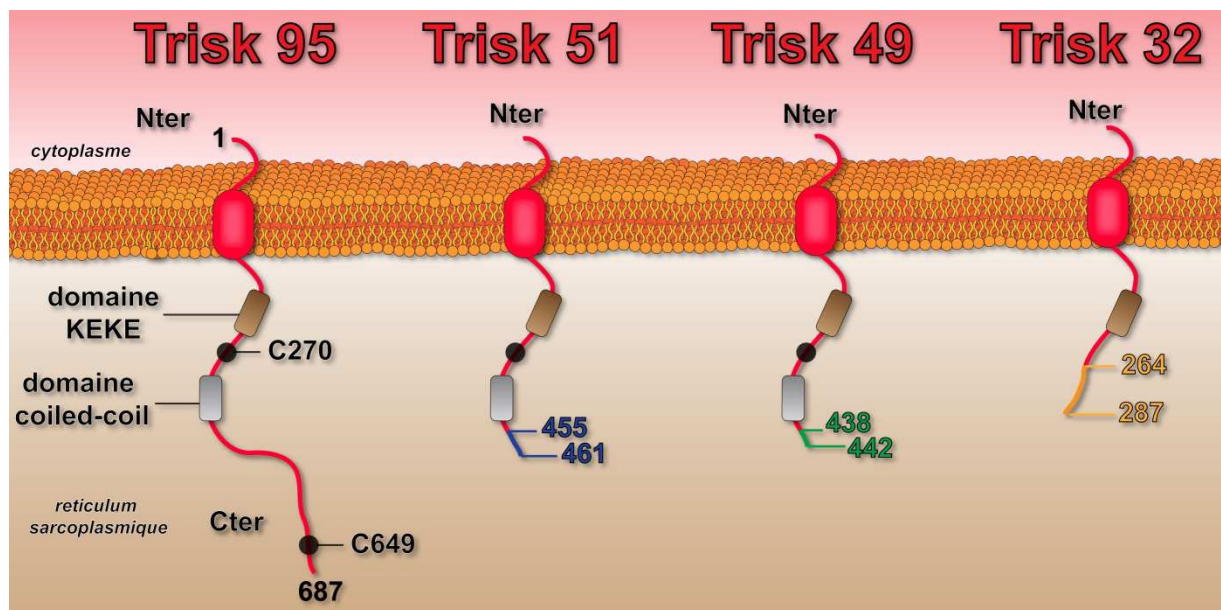
NOM	Nombre d'EXONS	LOCALISATION	
		muscle cardiaque	muscle squelettique
Trisk 95	41 exons	non exprimée	RS jonctionnel
Trisk 51	issue de l'épissage alternatif de l'exon 21	non exprimée	RS jonctionnel
Trisk 49	issue de l'épissage alternatif de l'exon 20	non exprimée	RS non-jonctionnel
Trisk 32	issue de l'épissage alternatif de l'exon 8	présent	dans tout le RS

Tableau 2 : Le nombre d'exons et la localisation des différentes isoformes de la triadine

Dans le muscle squelettique de la plupart des espèces, Trisk 95 et Trisk 51 sont les isoformes majoritaires (Marty et al., 2009). Chez l'Homme, l'isoforme Trisk 51 est plus exprimée que Trisk 95 (Marty et al., 2009; Thevenon et al., 2003). Dans le muscle squelettique les isoformes Trisk 95 et Trisk 51 sont localisées dans le RS jonctionnel alors que l'isoforme Trisk 49 est localisée au niveau du RS longitudinal et l'isoforme Trisk 32 est localisée dans tout le reticulum. Dans le cœur, l'isoforme Trisk 32 (ou CT1 pour Cardiac Triadin isoform 1) est la seule isoforme présente (Kobayashi and Jones, 1999; Peng et al., 1994). Les acides aminés 1 à 264 sont communs à toutes les isoformes. Chaque isoforme de la triadine se distingue par la longueur de sa partie luminaire C-terminale et par les derniers acides aminés qui lui sont spécifiques (Vassilopoulos et al., 2005).

### II-3-Topologie et structures de la triadine

La triadine est une protéine exclusivement localisée dans le muscle et qui appartient à la membrane du RS. La triadine est une protéine transmembranaire de type II (Figure 19). Le domaine N-terminal est cytoplasmique et le domaine C-terminal est dans la lumière du reticulum (Marty et al., 1995). Elles possèdent un seul domaine transmembranaire en hélice- $\alpha$  de 21 acides aminés (acides aminés 48 à 68) (Knudson et al., 1993a). A cette date, aucune analyse par cristallographie, ni par cryo-EM, ni par résonance magnétique nucléaire de la triadine n'a été publiée.



**Figure 19 : Topologie des différentes isoformes de la triadine.** Isoformes de la triadine clonées chez le rat. Le domaine KEKE est représenté par la boîte marron, le domaine coiled-coil par la boîte grise, les deux cystéines lumineuses par C270 et C649. Les parties colorées correspondent aux derniers acides aminés qui sont spécifiques aux différentes isoformes.

## *II-4-Oligomérisation et les domaines fonctionnels de la triadine*

La triadine possède plusieurs domaines fonctionnels (Figure 19). Deux cystéines luminales en position 270 et 649 jouent un rôle important. Elles sont présentes dans la séquence de Trisk 95. Trisk 51 et Trisk 49 ne possèdent que la cystéine 270 et Trisk 32 n'en présente aucune. Ces cystéines sont impliquées dans la formation de ponts disulfures conduisant à l'assemblage de polymères de la triadine (Fourest-Lieuvain et al., 2012; Froemming et al., 1999). La triadine possède un domaine KEKE qui s'étend des acides aminés 210 à 224, et qui est présent sur la séquence de toutes les triadines (Realini et al., 1994). Ce domaine est composé d'une alternance de lysine et d'acide glutamique qui forment un feuillet- $\beta$  chargé positivement (Kobayashi et al., 2000). Par définition, le domaine KEKE est dépourvu de résidus tryptophane/tyrosine/phénylalanine/proline et est composé d'au moins 12 acides aminés (Realini et al., 1994). Le domaine KEKE est impliqué entre autre dans l'interaction des triadines avec RyR1 et la CSQ (Kobayashi et al., 2000). Enfin, un domaine coiled-coil qui s'étend des acides aminés 330 à 341, a également été prédit sur la séquence de Trisk 95. Le domaine coiled-coil est un domaine d'interaction protéine-protéine (Lupas et al., 1991). Ce domaine ainsi que les 2 cystéines seraient importantes pour la fonction structurale de Trisk 95. En effet, des mutants délétés de ces différents domaines induisent une déformation des membranes du reticulum dans des cellules non musculaires (Fourest-Lieuvain et al., 2012).

## *II-5-Les modifications post-traductionnelles de la triadine*

Trisk 95 est phosphorylée dans la partie N-terminale par la CaMKII (Damiani et al., 1995). Toutes les triadines sont N-glycosylée sur l'asparagine en position 75 (Kobayashi and Jones, 1999; Marty et al., 2000). On peut noter que la soi disante isoforme cardiaque CT2 de 33KDa clonée dans le cœur correspond en faite à la forme glycosylée de Trisk 32 (Hong et al., 2001; Perez, 2011).

## *II-6-La triadine et ses partenaires protéiques*

Le partenaire principal de la triadine est le RyR, aussi bien dans le muscle cardiaque (Carl et al., 1995a) que dans le muscle squelettique (Carl et al., 1995b; Knudson et al., 1993a). Cette interaction a un rôle sur le couplage excitation-contraction (Goonasekera et al., 2007; Lee et al., 2006; Lee et al., 2004). La triadine est capable d'interagir avec le RyR à la fois par sa partie N-terminale cytoplasmique (Groh et al., 1999) et par sa partie C-terminale luminale (Guo and Campbell, 1995) (via notamment son domaine KEKE. Ce même domaine est capable d'interagir avec la calséquestrine (Kobayashi et al., 2000) suggérant un complexe multiprotéique entre RyR/triadine/calséquestrine. En effet, la triadine est décrite comme une protéine pouvant faire le lien entre le RyR et la calséquestrine. La triadine aurait un rôle d'ancrage de la calséquestrine à la triade. Sans elle, la calséquestrine serait distribuée dans tout le RS (Boncompagni et al., 2012). La triadine est aussi associée à la junctine dans la membrane du RS jonctionnel. Cette association semble stabiliser l'ancrage de la calséquestrine au RyR (Glover et al., 2001; Zhang et al., 1997). Ce complexe quaternaire a été identifié biochimiquement dans le muscle squelettique (Guo and Campbell, 1995) et cardiaque (Zhang et al., 1997).

## *II-7-Les modèle de souris KO-triadine*

Afin d'identifier les fonctions de triadine, deux modèles de souris invalidées pour le gène de la triadine ont été développés: l'un par l'équipe de C. Perez et P. Allen (Shen et al., 2007) aux Etats-Unis, et l'autre en France par notre laboratoire (Oddoux et al., 2009). Les deux modèles de souris ont été réalisés avec la même stratégie, l'excision de l'exon 1 du gène *TRDN*. Ces souris ont exactement le même phénotype. Elles sont viables, fertiles et présentent des défauts au niveau du cœur et du muscle squelettique (Tableau 3). Dans le muscle squelettique, ces souris présentent une faiblesse musculaire qui est associée à une réduction des relâchements de calcium. Une diminution importante de la quantité de la calséquestrine est présente chez ces souris ainsi que des défauts structuraux de l'organisation des triades (cf chapitre IV-2-4). Ces souris présentent aussi une arythmie cardiaque suite à l'injection d'isoprotérénol qui imite un stress  $\beta$ -adrénergique (Chopra et al., 2009).

		<b>(Shen et al 2007)</b>	<b>(Oddoux et al 2009)</b>
	<b>Viabilité</b>	Viable	Viable
	<b>Croissance</b>	Pas de défauts	Pas de défauts
<b>Expression des protéines du CRC</b>	<b>RyR1</b>	↑ dans EDL, = dans Soleus	= dans EDL, = dans Soleus
	<b>DHPR<sub>α1s</sub></b>	= dans EDL, = dans Soleus	↑ dans EDL, ↓ dans Soleus
	<b>Junctophiline-1</b>	↓ dans EDL, ↓ dans Soleus	NR
	<b>Junctophiline -2</b>	= dans EDL, = dans Soleus	NR
	<b>CSQ</b>	↓ dans EDL, ↓ dans Soleus	↓ dans EDL, ↓ dans Soleus
	<b>Junctine</b>	↓ dans EDL, = dans Soleus	= dans EDL, ↓ dans Soleus
	<b>SERCA</b>	NR	= dans EDL, = dans Soleus
	<b>FOF-ATPase</b>	NR	= dans EDL, = dans Soleus
<b>Localisation</b>	<b>RyR1</b>	Pas de défauts	Pas de défauts
	<b>DHPR</b>	NR	Pas de défauts
	<b>CSQ</b>	Pas de défauts	Pas de défauts
	<b>Junctine</b>	Pas de défauts	NR
<b>Altérations Structurales</b>	<b>Microscopie Electronique (ME)</b>	-Perte de l'orientation transversale de certaines triades -Délocalisation de CSQ dans le RS longitudinal	-Pas de modifications dans le Soleus -EDL : Perte de l'orientation transversale de certaines triades + pas de mitochondries associées
	<b>RMN</b>	NR	↓volume du muscle gastrocnémien
	<b>Cryo-fracture/ME</b>	DHPR en tétrades, pas de défauts	NR
<b>Tests de force</b>	<b>Suspension</b>	NR	↓des performance chez les souris KO
	<b>Agrippement</b>	NR	↓des performance chez les souris KO
	<b>Muscle isolé</b>	Pas de défauts	↓force EDL et Soleus chez souris KO
	<b>RMN</b>	NR	Souris KO moins fatigables que WT
<b>Mét. NRJ</b>	<b>RMN</b>	NR	Pas de différence
<b>Couplage E-C</b>	<b>Imagerie calcique</b>	- couplage E-C normal -↓ des stocks calciques	- couplage E-C normal -↓ des stocks calciques

**Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques squelettiques des deux modèles de souris KO-triadine par rapport au souris WT.** Localisation par immunomarquages fluorescents sur muscle rapide (sternomastoïde) pour l'étude de (Shen et al., 2007) et sur FDB pour l'étude de (Oddoux et al., 2009). Met. NRJ : Métabolisme énergétique. NR : Non renseigné. *Tableau réalisé par M. Cacheux.*

## *II-8-La triadine est une protéine structurante*

Les changements d'expression de la triadine ont un impact sur la structure du RS jonctionnel. Le KO-triadine montre des défauts dans l'orientation des triades, un volume réduit du RS jonctionnel et une perte de la densité de calséquestrine (Boncompagni et al., 2012; Oddoux et al., 2009; Shen et al., 2007). Ces résultats suggèrent que la triadine agit comme une protéine structurale pour maintenir la morphologie des triades. La triadine semble agir pour maintenir le volume du RS jonctionnel en retenant la calséquestrine et agir comme ancre. Les triadines qui s'agrègent permettent de connecter les polymères de calséquestrine au RS jonctionnel (Boncompagni et al., 2012) et de déterminer la forme et la taille du RS jonctionnel. Les surexpressions de Trisk 95 et Trisk 51 relocalisent la cavéoline 3 (Vassilopoulos et al., 2010), l'élément principal structural des cavéoles dans le muscle squelettique (Song et al., 1996). La triadine régule les déformations de membranes induites par le mécanisme SOCE (pour Store Operated Calcium channel, cf chapitre IV-1-3-2) en affectant le couplage E-C par suppression du SOCE. En effet, la surexpression de la triadine diminue les SOCE (Vassilopoulos et al., 2007), alors que dans le KO-triadine, les événements de SOCE sont augmentés (Shen et al., 2007).

## *II-9-Les maladies humaines liées à la triadine*

Notre laboratoire a identifié les trois premières mutations de la triadine, dans deux familles de patient (Roux-Buisson et al., 2012). Les trois mutations identifiées chez les patients conduisent à l'absence de la triadine. Les patients sont donc naturellement KO pour la triadine et sont tous porteur d'une maladie cardiaque, la TVPC (tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique). La TVPC est une maladie rare. C'est une maladie cardiaque génétique des troubles du rythme (Cerrone et al., 2009; Liu et al., 2008). Elle survient principalement chez le grand enfant avant l'âge de dix et est caractérisé par une syncope ou un arrêt cardiaque induit par un stress physique ou émotionnel (Lacampagne et al., 2008; Priori et al., 2002; Washington et al., 1994). En l'absence de traitement, le pronostic est dramatique. La moitié des patients vont décéder de mort subite avant 30 ans. Le traitement repose sur les  $\beta$ -bloquants. Il est donc primordial de faire le diagnostic le plus précocement possible pour mettre en place des mesures thérapeutiques. Les mutations conduisant à des TVPC sont situées sur les gènes des protéines du complexe de relâchement du calcium (RyR, calséquestrine ou la triadine). Le phénotype cardiaque des patients affecté par la TVPC est assez similaire au phénotype cardiaque des souris KO-triadine.

# III. Les Microtubules

---

## *III-1-Généralités sur le Cytosquelette*

Le Cytosquelette est un ensemble de polymères fibreux et de protéines associées, cytoplasmiques et nucléaires, constituant des structures stables mais responsables aussi des phénomènes dynamiques mettant en jeu des protéines motrices.

Ces polymères fibreux sont de 3 types. Ils ont été initialement classés selon leur taille apparente en microscopie électronique à transmission: i) les microtubules d'un diamètre de 25 nm, constitués de tubuline, ii) les microfilaments fins d'actine d'un diamètre de 7 nm, et iii) les filaments intermédiaires d'un diamètre intermédiaire entre les microtubules et les microfilaments fins d'actine, constitués entre-autre de vimentine, kératine, desmine... Ces polymères protéiques sont formés à partir d'unités monomériques qui sont soit des protéines globulaires (actine et tubuline), soit des protéines fibreuses (filaments intermédiaires). Les éléments du cytosquelette sont répartis dans le cytoplasme où ils sont synthétisés, dans le nucléoplasme qui comporte une famille spécifique de filaments intermédiaires, et encore à la périphérie de la cellule, où ils forment le cortex cellulaire. Le cytosquelette est le siège de remaniements permanents sous forme de polymérisation-dépolymérisation, phosphorylation-déphosphorylation. De ce fait, les constituants du cytosquelette existent dans les cellules sous trois états différents en équilibre les uns avec les autres : soit des monomères libres, soit des polymères instables, soit des polymères stabilisés.

Le cytosquelette a de nombreuses fonctions. Les polymères stabilisés jouent le rôle d'un véritable squelette cellulaire. Ils déterminent la forme de la cellule et permettent les mouvements cellulaires. Ces mouvements nécessitent des polymères dynamiques qui sont importants notamment dans des mouvements mitotique des chromosomes, du déplacement des organites dans le cytoplasme, et la contraction musculaire.

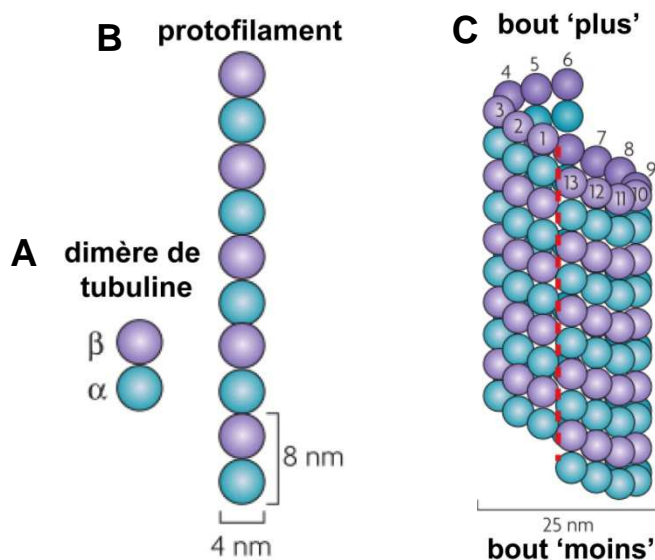
Parmi toutes les fonctions du cytosquelette, les microtubules sont plus particulièrement impliqués dans la mitose, l'organisation et le positionnement des organites (mouvements intracellulaires des organites tels que le RE, l'appareil de Golgi, les mitochondries), dans la motilité (des cils et flagelles des eucaryotes unicellulaires, ou de la migration des cellules de vertébrés) ou encore dans le transport intracellulaire de vésicules.

## III-2-La structure des microtubules

### III-2-1-Les tubulines

Sept tubulines différentes sont décrites (Dutcher, 2001). Les plus étudiées sont les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , qui forment un hétérodimère de tubuline, unité structurale de base des microtubules. Ces deux sous unités présentent environ 40% d'homologie de séquence. Les autres tubulines ont des fonctions très spécifiques comme par exemple la tubuline  $\gamma$  qui est impliquée dans les premières étapes de la formation des microtubules lors de la nucléation.

Chez l'Homme, sept isoformes de tubuline  $\alpha$  et huit de tubuline  $\beta$  sont décrites (six et sept respectivement chez la souris). Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont des protéines globulaires d'environ 450 acides aminés et d'un poids moléculaire apparent de 52 kDa (Figure 20). Les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont très conservées au cours de l'évolution et la plupart des mutations sont létales. Elles s'assemblent pour former un hétérodimère de tubuline  $\alpha/\beta$  (interaction de type hydrophobe). Le dimère a une activité enzymatique indispensable : une activité GTPase. Il existe deux sites de fixation capable de lier en tout, deux molécules de GTP : le site N au niveau de la sous unité  $\alpha$  et le site E au niveau de la sous unité  $\beta$  (Mandelkow et al., 1988; Yanagisawa et al., 1968).

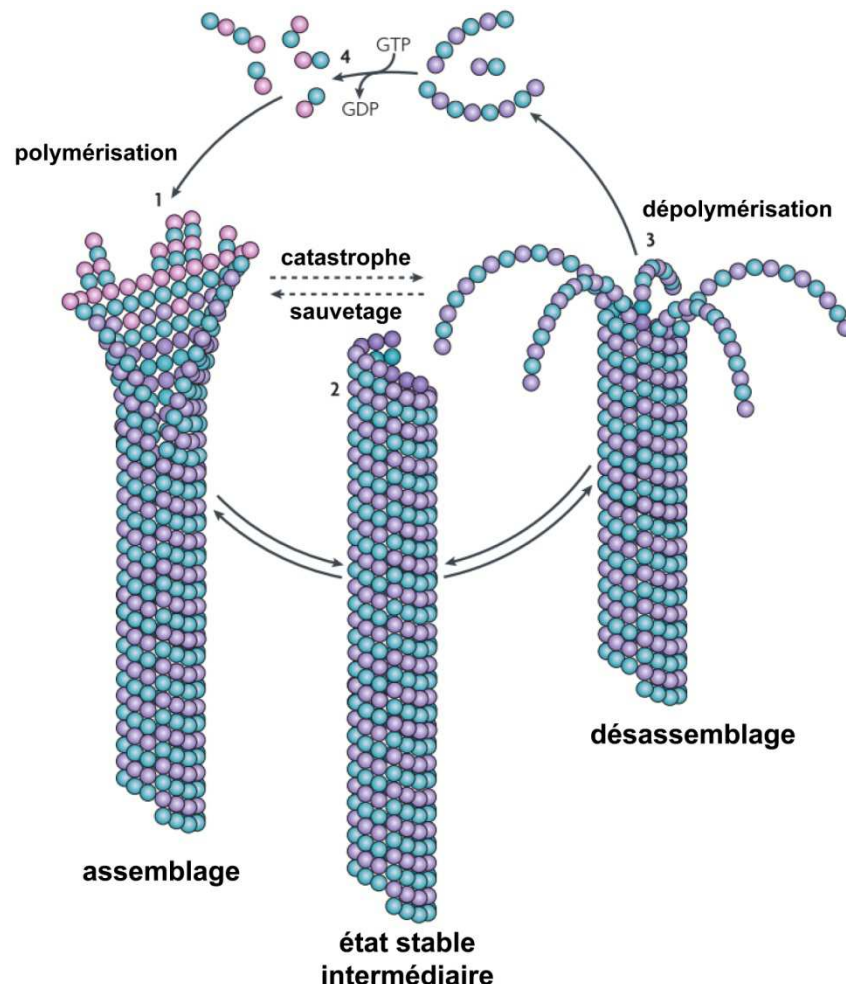


**Figure 20 : Schéma de la tubuline et des microtubules.** (A) un dimère de tubuline. (B) un protofilament, (C) un microtubule formé de 13 protofilaments, avec les sous-unités  $\beta$  au bout 'plus' et les sous-unités  $\alpha$  au bout 'moins' du polymère. Schéma adapté (Akhmanova and Steinmetz, 2008).



### III-2-2-Les microtubules

La structure des microtubules a essentiellement été révélée par microscopie électronique à transmission. Leur forme cylindrique, creuse et rigide (comme un tube) résulte de l'arrangement adjacent et parallèle de  $13 \pm 2$  protofilaments (Mandelkow et al., 1984) (Figure 20). Les protofilaments sont composés de l'association d'hétérodimères de tubuline alignés et linéaires. Au total, la surface d'un microtubule est un arrangement régulier de sous-unités de tubuline et toutes ces sous-unités présentent la même orientation le long des protofilaments. Chaque protofilament est constitué d'un enchaînement ordonné d'hétérodimères  $\alpha/\beta$ . De ce fait, les microtubules ont une polarité structurale. Ils sont formés d'une extrémité négative (bout 'moins') exposant les sous unités  $\alpha$ . L'autre extrémité positive (bout 'plus') expose les sous unités  $\beta$  (Mitchison, 1993).



**Figure 21 :** Schéma du cycle polymérisation/dépolymérisation des microtubules. Schéma adapté (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Les microtubules polymérisés *in vitro* à partir de tubuline purifiée sont naturellement dynamiques (Figure 21 et 23). Les hétérodimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  sont capables de s'auto-assembler *in vitro* sous certaines conditions, par exemple en présence d'une concentration suffisante de tubuline pure dite 'concentration critique de tubuline', de molécules de GTP, de magnésium (qui forme un complexe avec le GTP), d'un pH légèrement acide (pH 6.8 car à pH basique les polymères dépolymérisent) et d'une température supérieure à 20°C. Cet assemblage se déroule en deux étapes: la nucléation et l'élongation.

- Lors de la nucléation, les hétérodimères de tubuline s'associent entre eux. L'association de plusieurs dimères de tubuline forme des oligomères de tubuline. Les dimères qui ne sont pas complexés au sein des oligomères restent alors disponibles pour l'élongation.

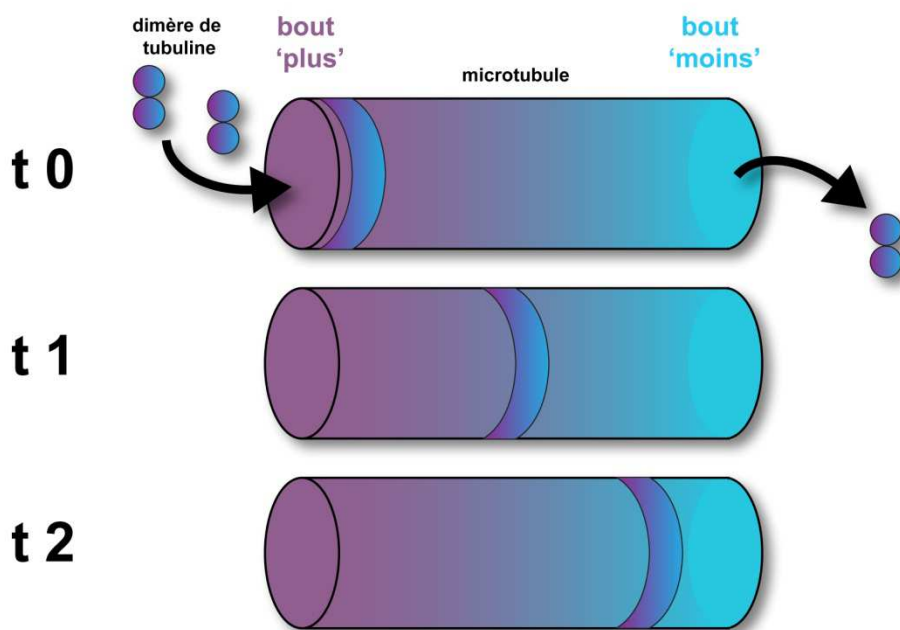
- Lors de l'élongation, les microtubules vont ensuite polymériser par addition des dimères libres de tubuline-GTP aux bouts 'plus' et 'moins' du microtubule. C'est au cours de cette étape que la molécule de GTP qui associée à la tubuline  $\beta$ , est hydrolysée (Hyman et al., 1992).

Le désassemblage des microtubules se traduit par une libération des dimères de tubuline. Une dilution de la tubuline, une exposition au froid, un ajout de calcium, une incubation avec des drogues anti-microtubulaires (nocodazole, colchicine, vinblastine) entraîne le désassemblage des microtubules au niveau des bouts 'plus' et 'moins'. A l'inverse, des drogues stabilisatrices telles que le paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) stabilisent les microtubules.

### III-3-Dynamique des microtubules *in vitro*

#### III-3-1-Treadmiling : effet du 'tapis roulant'

L'état stationnaire correspond à une phase où la concentration en tubuline libre est égale à la concentration critique. Les microtubules n'étant pas des structures inertes mais dynamiques, ils échangent en permanence leurs sous-unités de tubuline avec le milieu (Johnson and Borisy, 1977). Ce phénomène se nomme le 'tapis roulant' ou 'treadmiling' (Margolis and Wilson, 1978). La polarité des microtubules influence la cinétique d'assemblage et de désassemblage des dimères des tubuline à chaque extrémité du microtubule. De ces différences d'assemblage résulte un flux de sous unités de tubuline dans le microtubule d'où le phénomène dit de 'tapis roulant'. Ce flux de tubuline est dirigé de l'extrémité positive vers l'extrémité négative des microtubules car le 'tapis roulant' résulte de l'assemblage net au bout 'plus' compensée par un désassemblage net au bout 'moins'. Le treadmiling a également été observé *in vivo* pour des microtubules se détachant du centrosome, ce qui permet à ces microtubules de se mouvoir vers la périphérie de la cellule (Rodionov and Borisy, 1997) (Figure 22).

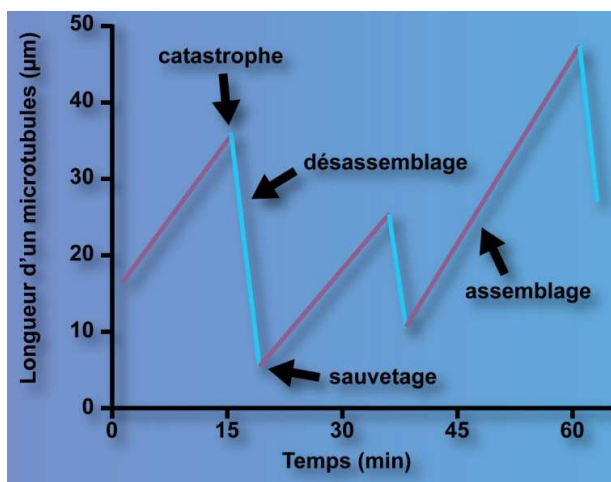


**Figure 22 : Illustration du Treadmiling : 'effet du tapis roulant'.** Lorsque les deux extrémités sont libres, on observe un déplacement des tubulines du bout 'plus' vers le bout 'moins' au cours du temps (t=temps 0, temps 1 et temps 2).

### III-3-2-L'instabilité dynamique

S'ils ne font pas de treadmiling, les microtubules à l'équilibre subissent successivement un assemblage qui allonge le microtubule puis un désassemblage rapide par dissociation de ces dimères qui raccourcit le microtubule. La transition entre polymérisation et dépolymérisation est appelée une 'catastrophe', la transition inverse est un 'sauvetage'. Les microtubules ne sont pas toujours en phase d'assemblage ou de désassemblage, ils peuvent également être en pause (Walker et al., 1988). L'instabilité dynamique nécessite de l'énergie qui provient de l'hydrolyse du GTP sur le site échangeable la tubuline  $\beta$  (Carlier et al., 1989; Valiron et al., 2001). Une cellule qui produit beaucoup d'ATP, possède donc beaucoup de GTP (réaction catalysée par la NDP kinase =  $ATP + NDP \leftrightarrow NTP + ADP$ , N étant un nucléoside). La polymérisation du microtubule est suivie de l'hydrolyse du GTP en GDP. L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne un changement conformationnel des sous-unités et un affaiblissement des liaisons entre les dimères, favorisant la dépolymérisation. La dépolymérisation rapide augmente la concentration de tubuline libre ce qui permet aux dimères de tubuline  $\alpha/\beta$ , d'avoir la possibilité d'échanger le GDP en GTP, ainsi recharger les dimères en GTP pour recommencer un cycle.

Cette instabilité dynamique a été mise en évidence en mesurant la longueur des microtubules en état stationnaire (Mitchison and Kirschner, 1984). Alors que la concentration de tubuline reste constante, la longueur moyenne des microtubules fluctue fortement (Figure 21 et 23). Cette instabilité a été observée sur des microtubules individuels grâce à la vidéomicroscopie (Vandecandelaere et al., 1994). L'instabilité dynamique est ainsi caractérisée par des phases de polymérisations lentes entrecoupées de phases de dépolymérisations rapides.



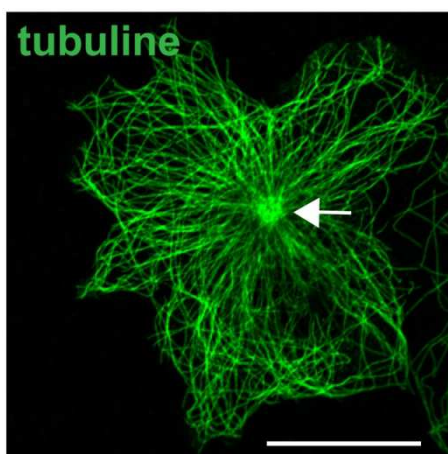
**Figure 23 : Illustration de l'instabilité dynamique.** A l'état stationnaire, la longueur des microtubules individuels fluctue. Les microtubules s'assemblent et se désassemblent constamment.

Une population entière de microtubules peut être influencée par des variations de milieu. D'une part, des variations dans la concentration nucléotidique peuvent induire des cycles de polymérisation-dépolymérisation. D'autre part, des stimuli externes tels que la gravité, les champs magnétiques ou électriques de faible intensité, peuvent déterminer l'orientation et l'organisation des microtubules. Il est probable que ces propriétés aient une fonction dans la morphogenèse cellulaire. Les microtubules pourraient servir de détecteurs de stimuli externes et leurs propriétés dynamiques (de tapis roulant et instabilité dynamique) leur permettraient de se réorganiser constamment en fonction de ces stimuli.

### *III-4-Les microtubules dans les cellules non différenciées*

#### *III-4-1-Le centre organisateur des microtubules*

Les microtubules dans les cellules telles que COS-7 ou les fibroblastes, ont généralement une organisation radiale et sont ancrées sur un centre organisateur des microtubules (MTOC) (Figure 24). Ici, le centrosome est constitué d'un centriole entouré du matériel péricentriolaire. Dans les cellules non différenciées la notion de centrosome est identique à la notion de MTOC. Cependant dans des cellules différenciées comme les cellules musculaires, le MTOC peut être organisé différemment (cf chapitre III-5-1). Dans tous les cas, le bout 'plus' des microtubules se trouve en périphérie alors que le bout 'moins' est ancré au MTOC.



**Figure 24 : Organisation du réseau de microtubules autour d'un centre organisateur des microtubules (MTOC) dans une cellule COS-7.** La localisation des microtubules (tubuline, vert) mise en évidence par marquage immunfluorescent. La flèche indique la position probable du MTOC. Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

### III-4-2-Les modifications post-traductionnelles (PTMs)

Les microtubules peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles ou PTMs (Verhey and Gaertig, 2007). Ces modifications touchent principalement l'unité de base : les dimères de tubuline. Quelques exemples de PTMs sont illustrés ci-dessous :

- La tyrosination/détyrosination affecte l'extrémité C-terminale des tubulines.
- L'acétylation/désacétylation permet l'ajout d'un groupe acétyl sur la lysine 40 de la tubuline  $\alpha$  par une histone acétylase ou la suppression du groupe acétyl par une histone désacétylase.
- La phosphorylation sur thréonine ou sérine induit des effets qui peuvent être multiples (Fourest-Lieuvain et al., 2006).

D'autres modifications comme la polyglutamination, la palmitoylation ou la polyglycylation ont été décrites. Leurs sites et enzymes sont récapitulés dans le tableau suivant. Verhey et Gaertig ont formulé une hypothèse appelée 'the tubulin code' selon laquelle les PTMs ne stabilisent pas directement les microtubules mais servent d'intermédiaire pour recruter d'autres effecteurs spécifiques dans un but biologique précis (Janke, 2014; Verhey and Gaertig, 2007). Ce code qui est généré par les modifications de la tubuline pourrait être lu par les protéines associées aux microtubules (Tableau 4).

PTM	Description	Site(s)	Forward Enzyme(s)	Reverse Enzymes(s)
Detyrosination	removal of C-terminal tyrosine	terminal tyrosine on CTT of $\alpha$ -tubulin	Carboxypeptidase <sup>31</sup> (Nna1/CCP1 $\varnothing$ ) <sup>32</sup>	TTL <sup>33</sup>
Glutamylation	addition of one or more glutamates as a side chain	multiple glutamates in the primary sequence of CTTs of $\alpha$ - and $\beta$ - tubulin	TTL1, TTL5, TTL6 ( $\alpha$ -tubulin) <sup>34,54</sup> TTL4, TtTTL6Ap, TTL7 ( $\beta$ -tubulin) <sup>34,54,69</sup>	unknown
Glycylation	addition of one or more glycines as a side chain	multiple glutamates in the primary sequence of CTTs of $\alpha$ - and $\beta$ -tubulin	unknown	unknown
Acetylation	addition of acetyl group	Lys40 of $\alpha$ -tubulin	unknown	HDAC6, SirT2 <sup>39-41</sup>
Phosphorylation	addition of phosphate	Ser172 and unknown site(s) on CTT of $\beta$ -tubulin unknown sites on $\alpha$ -tubulin	Cdk1/cyclin B (Ser172 of $\beta$ -tubulin) <sup>8</sup> PSK <sup>59</sup> Fes <sup>60</sup> Syk <sup>57,58</sup>	unknown
Palmitoylation	addition of palmitate lipid group	Cys376 of $\alpha$ -tubulin	unknown	unknown
$\Delta 2$	removal of penultimate glutamate from detyrosinated $\alpha$ -tubulin	CTT of $\alpha$ -tubulin	unknown	unknown

**Tableau 4 : 'the tubulin code' selon (Verhey and Gaertig, 2007).** Les différentes modifications post-traductionnelles de la tubuline

### *III-4-3-Les protéines associées aux microtubules (MAPs)*

Les protéines associées aux microtubules ou MAPs (pour Microtubules-associated proteins) sont des protéines ayant la capacité de se fixer sur les microtubules. Il existe différents types de MAPs.

#### *III-4-3-1-Les MAPs structurales stabilisatrices*

Les MAPs stabilisatrices tirent leur nom de leur fonction. Elles permettent la stabilisation des microtubules. Plusieurs familles de MAP ont été caractérisées. Dans ces MAPs stabilisatrices, on peut les classer en deux groupes : les MAPs neuronales (MAP1, MAP2, MAP6, Doublecortine, Tau...) et les MAPs ubiquitaires (MAP4, MAP7...). Elles ont pour fonction de stimuler la polymérisation et de stabiliser les microtubules. Par exemple, la protéine MAP6 ou STOP a une forte affinité pour les microtubules. Cependant le complexe Calmoduline/Ca<sup>2+</sup> peut inhiber l'interaction entre la protéine STOP et les microtubules (inhibition réversible). La protéine STOP a pour fonction de stabiliser les microtubules à basse température (Delphin et al., 2012; Denarier et al., 1998). Dans le muscle, la protéine MAP7 est importante pour le positionnement des noyaux (Metzger et al., 2012) et une isoforme de MAP4 est indispensable pour organiser les microtubules parallèles nécessaires à la différenciation des cellules musculaires (Mogessie et al., 2015).

#### *III-4-3-2-Les MAPs déstabilisatrices*

A l'inverse des protéines stabilisantes, il existe des MAPs qui fragmentent, cassent les microtubules ou augmente les catastrophes moléculaires au niveau des bout 'plus', en favorisant la dissociation des protofilaments : les MAPs déstabilisatrices (comme par exemple la protéine Stathmine ou la katanine) (Belmont and Mitchison, 1996; Vale, 1991).

#### *III-4-3-3-Les moteurs moléculaires*

Deux types de moteurs existent : (i) les moteurs antérogrades qui se dirigent vers le bout 'plus' des microtubules et (ii) les moteurs rétrogrades qui se dirigent vers le bout 'moins'. Les moteurs moléculaires possèdent une activité ATPase. Cette activité permet à ces moteurs de se mouvoir le long des microtubules et de réguler le transport des organites et des

vésicules. Il existe plus de 50 kinésines, réparties en 14 familles (Endow et al., 2010). Les récepteurs des kinésines sur les organites s'appellent des kinectines. Le mode de fonctionnement est permis par la coordination des deux domaines globulaires du domaine moteur. La position des domaines moteurs va contrôler le sens dans lequel va se faire le transport. Les kinésines ont plusieurs rôles. La plupart du temps, la kinésine est un moteur moléculaire qui se dirige vers l'extrémité des 'bout plus' des microtubules à l'exception des kinésine du groupe 14 qui sont des moteurs rétrograde. La protéine Kif5b est aussi importante pour le positionnement des noyaux (Metzger et al., 2012). Certaines familles de kinésine comme celle du groupe 13 (MCAK) ou du groupe 8 dépolymérisent les microtubules (Su et al., 2012). La dynéine est à l'inverse le moteur qui se dirige vers l'extrémité des 'bout moins' des microtubules (Kardon and Vale, 2009). La dynéine cellulaire (Dync1h1) est le moteur rétrograde universel.

### *III-4-3-4-Les protéines de bouts 'plus' (+TIPs)*

Une importante catégorie de MAPs est capable de se lier spécifiquement aux bouts 'plus' des microtubules et sont appelées +TIPs (plus-end tracking proteins) (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Perez et al., 1999). Plusieurs familles ont ainsi été définies. La famille des protéines EBs (End-Binding proteins) reconnaît l'extrémité des microtubules en cours de polymérisation, et semble constituer l'adaptateur central auquel se lierait la grande majorité des autres +TIPs (Kumar and Wittmann, 2012). Il existe trois isoformes EB1, EB2 et EB3. Les protéines EBs ont une extrémité C-terminale très homologue à celle des tubulines  $\alpha$ . La famille des protéines CLIPs comprennent CLIP170, CLIP115 et le complexe dynéine/dynactine. Ces protéines possèdent un domaine riche en glycine. Par exemple, la protéine CLIP-170 permet les sauvetages des catastrophes moléculaires. Une autre famille de +TIPs est capable de se lier aux protéines EBs. Cette famille comprend notamment les protéines CLASP1, CLASP2, ou encore STIM1 (cf chapitre IV-1-3-2) (Williams et al., 2001).

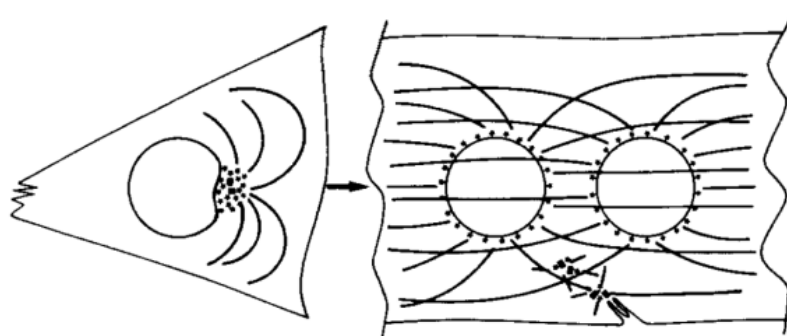


### III-5-Les microtubules dans les cellules musculaires

C'est en 1982, que le premier 'lien fonctionnel' entre les cellules musculaires et le réseau de microtubules est établi (Toyama et al., 1982). En effet, les drogues qui polymérisent ou dépolymérisent les microtubules induisent dans les deux cas des déformations au niveau de la bande Z. Les microtubules ont un rôle durant la myogenèse et dans l'organisation générale de l'architecture des cellules musculaires (Boudriau et al., 1993). Par exemple, pendant la différenciation musculaire, les microtubules sont nécessaires au transport de la myosine sarcomérique (Pizon et al., 2005). Les microtubules permettent la stabilisation des éléments contenant la myosine avant leur incorporation dans les sarcomères matures. La myosine se déplace le long des microtubules et vers le bout 'plus' de ces structures. Ainsi l'organisation spécifique des microtubules fournit des indications directionnelles pour le positionnement et l'organisation de la myosine lors de la formation des sarcomères.

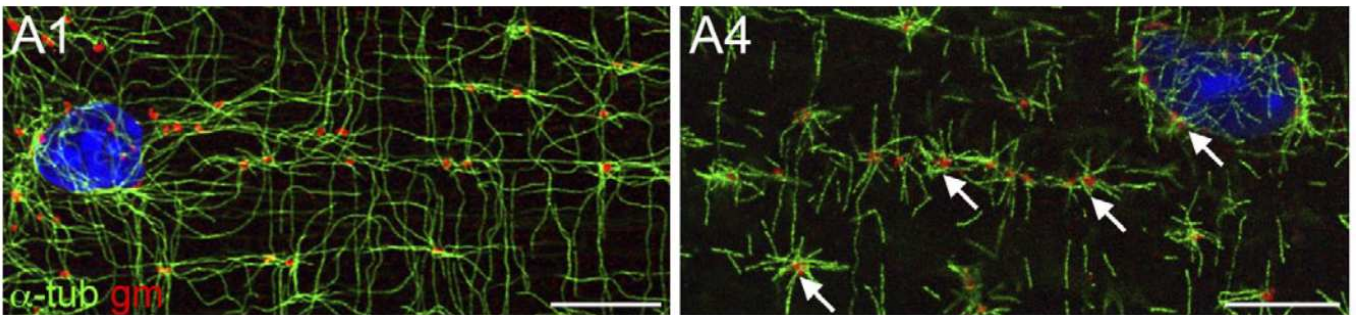
#### III-5-1-Les microtubules durant la myogenèse

En 1985, l'équipe de Bornens s'attaque réellement à l'organisation et la nucléation des microtubules durant la myogenèse par des études immunocytologiques. Dans les myoblastes, le réseau de microtubules est classique, juxta-nucléaire au niveau d'un MTOC. Au contraire, les myotubes possèdent de nombreux microtubules organisés en parallèle. Les MTOC sont regroupés au voisinage des noyaux et ne possèdent pas de centrioles mais seulement le matériel péri-centriolaire nécessaire à la nucléation (Figure 25) (Kano et al., 1991; Tassin et al., 1985a; Tassin et al., 1985b).



**Figure 25 : Représentation schématique de la transition dans l'organisation des microtubules, du myoblastes jusqu'au myotubes.** Dans les myoblastes, les microtubules sont nucléés à partir d'un MTOC avec centrioles. Dans les myotubes, les microtubules sont nucléés à partir du matériel péri-centriolaire qui s'est re-localisé autour des noyaux et s'organisent parallèlement dans toute la cellule musculaire. Schéma de (Tassin et al., 1985a).

En effet en microscopie électronique dans des fibres musculaires adultes, il n'y a pas de signe d'agrégation des microtubules autour des centrioles (Kano et al., 1991). La redistribution du matériel péri-centriolaire autour du noyau a lieu au début après la fusion des myoblastes. Dans les fibres musculaires matures, les microtubules sont également nucléés par les 'éléments de Golgi' qui sont distribués tout le long de la fibre (Figure 26) (Oddoux et al., 2013). En effet, durant la myogenèse, l'appareil de Golgi est réorganisé et dispersé en 'éléments de Golgi' auxquels restent associés des facteurs nucléateurs du matériel péri-centriolaire tels que la  $\gamma$ -tubuline et la péricentrine (Oddoux et al., 2013; Ralston et al., 1999).



**Figure 26 : Les microtubules sont nucléés par les 'éléments de Golgi'.** Pour étudier la nucléation des microtubules, des FDB ont été traitées avec du nocodazole pour dépolymériser les microtubules puis laver pour observer de nouveau la nucléation des microtubules. La localisation des microtubules ( $\alpha$ -tub, vert) et des 'éléments du Golgi' (gm, rouge) mise en évidence par marquage immunofluorescent. (A1) Contrôle : les éléments de Golgi sont le long des microtubules. (A4) Quelques minutes après le traitement au nocodazole : les microtubules sont de nouveaux nucléés à partir du Golgi et autour du noyau (flèches). Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. Image d'après (Oddoux et al., 2013).

### *III-5-1-1-Fusion des myoblastes grâce aux +TIPs*

Parmi les +TIPs, la famille des protéines EBs est indispensable pour les étapes précoces de la différenciation, de l'élongation et de la fusion des cellules musculaires squelettiques (Straube and Merdes, 2007; Zhang et al., 2009) suggérant que les microtubules semblent nécessaires dans ces étapes cellulaires. Le groupe de Ralston a montré ainsi que la protéine EB1 est essentielle durant les phases précoces de la différenciation musculaire alors que la protéine EB3 intervient dans les phases tardives de la différenciation (Zhang et al., 2009).

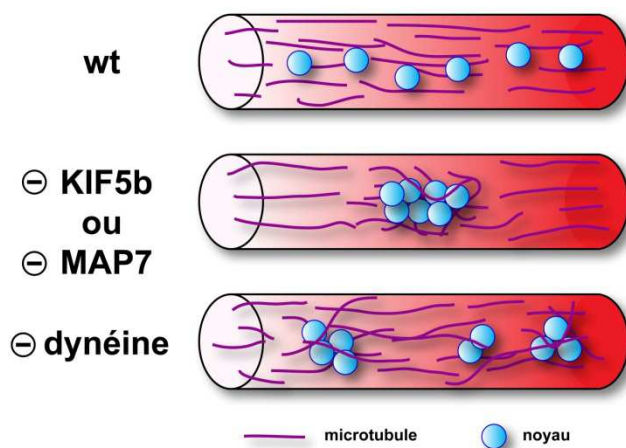
### *III-5-1-2-Modifications post-traductionnelles des microtubules durant la différenciation myogénique*

Durant la différenciation de cellules musculaires, les microtubules subissent de nombreuses modifications (Gundersen et al., 1989). Durant la myogenèse, ces modifications rendent

les microtubules stables. Les microtubules détyrosinés sont présents dès le stade myoblastes et augmentent durant la myogenèse ce qui se manifeste par la diminution de la dynamique des microtubules. Les microtubules sont aussi acétylés. Cette acétylation augmente pendant la myogenèse après la fusion des myoblastes. Ainsi le remodelage subcellulaire qui se produit pendant la myogenèse nécessite des microtubules stables (Bulinski and Gundersen, 1991).

### *III-5-1-3-Mouvement des noyaux microtubules-dépendant*

Dans la différenciation des cellules musculaires, une étape importante implique la régulation du positionnement spatial des noyaux au sein de la fibre musculaire (Figure 27). D'une part, différentes protéines comme MAP-7, Kif5b ou la dynéine agissent comme des régulateurs indispensables impliqués dans le positionnement des noyaux (Metzger et al., 2012; Wilson and Holzbaur, 2012). La liaison de la protéine MAP-7 au moteur moléculaire Kif5b sur les microtubules favorise le positionnement des noyaux. D'autre part, la dynamique des moteurs moléculaires est essentielle pour la distribution des noyaux dans le développement des cellules musculaires (Cadot et al., 2012). Le nombre et la distribution des différents moteurs moléculaires sur le noyau et sur le réseau de microtubules déterminent la direction de translocation des noyaux. Des protéines comme la Nesprine jouent le rôle d'intermédiaire entre les moteurs moléculaires et les noyaux. La coopération entre les protéines appartenant à la famille des KASHs (klarsicht et MSP-300) et les microtubules sont aussi décrit comme un mécanisme intervenant dans l'espacement des noyaux (Wilson and Holzbaur, 2012). Ainsi les dysfonctions musculaires telles que la myopathie centronucléaire, présentent un positionnement incorrect des noyaux avec des noyaux centraux.



**Figure 27 : Modèle illustrant les rôles de KIF5b, MAP7 et la dynéine dans la dynamique des noyaux au cours du développement des myotubes. La délétion (⊖) d'une de ces protéines cause l'aggrégation et l'anormale localisation des noyaux. Schéma adapté de (Wilson and Holzbaur, 2012).**

### *III-5-1-4-Protéines régulant la myogenèse musculaire via les microtubules*

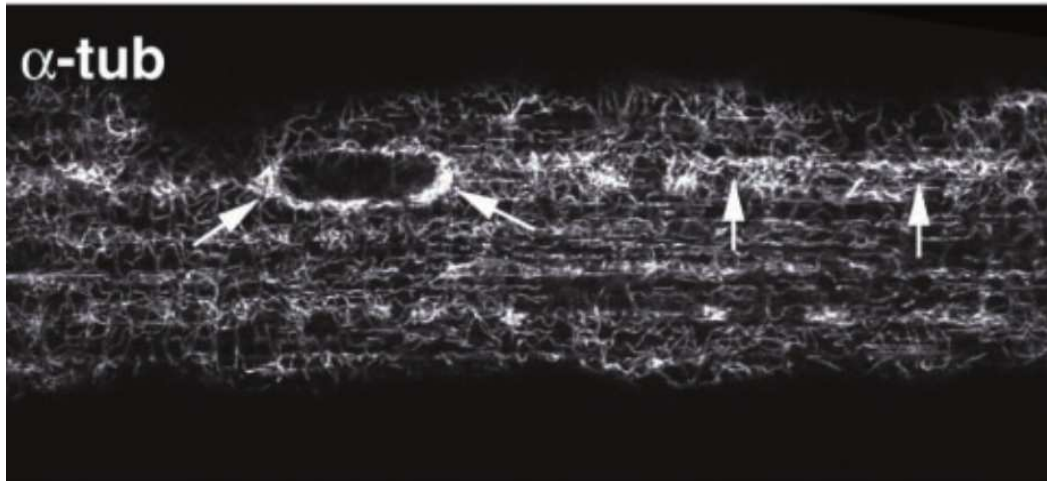
Différentes familles de protéines régulent la dynamique des microtubules et la différenciation myogénique. Par exemple, la famille des protéines MURFs (muscle-specific RING-finger protein, appartenant à la famille des ubiquitines ligase E3) sont nécessaires à la différenciation des myoblastes, à la fusion des myotubes et sont impliquées dans l'atrophie musculaire (Bodine et al., 2001). Les protéines MURFs agissent comme des régulateurs myogéniques en lien avec le réseau de microtubules (Spencer et al., 2000). En effet, l'isoforme MURF2 en relation avec le réseau de microtubule, est requise pour la maintenance des lignes M dans le muscle en développement (McElhinny et al., 2004). Une protéine associée aux microtubules comme l'isoforme de MAP4 est capable de maintenir les microtubules parallèles durant la myogenèse nécessaire à l'élongation des myotubes (Mogessie et al., 2015).

### *III-5-2-Les microtubules dans les cellules musculaires matures*

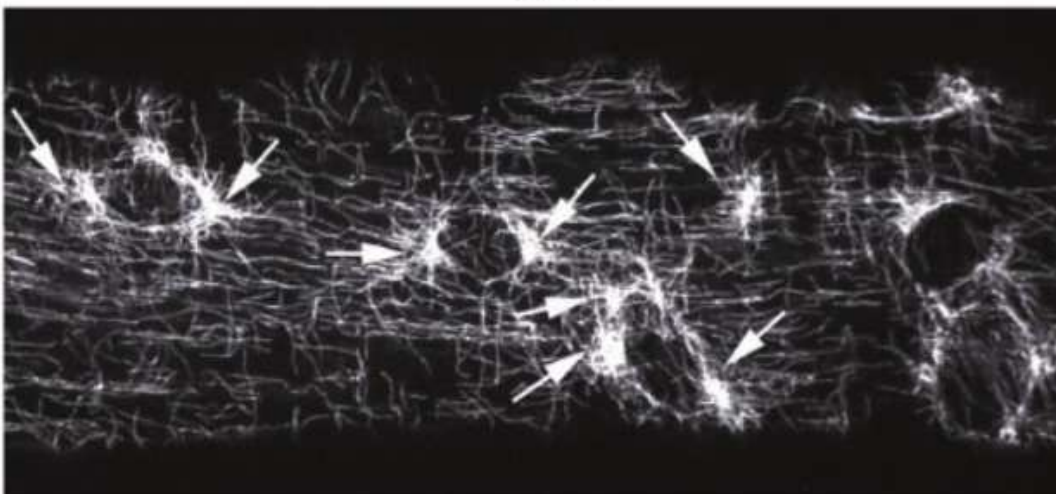
#### *III-5-2-1-Organisation en 'quadrillage'*

C'est en 1991 que l'équipe d'Ishikawa réalise une série de coupes longitudinales et transversales par microscopie électronique à transmission, dans des diaphragmes de muscles de rats et de souris adultes (Kano et al., 1991). Les microtubules peuvent avoir différentes orientations dans l'espace cytoplasmique : soit longitudinales, soit transversales, soit obliques (Boudriau et al., 1993). Le réseau de microtubules est sous forme de 'quadrillage' (Ralston et al., 1999). Dans le muscle, cette organisation des microtubules est très précise. Toutefois, le pattern des microtubules est dépendant du type de la fibre (Figure 28). En effet, les fibres de type I possèdent un 'quadrillage' de microtubules plus dense que les fibres de type II, ce qui corrèle avec une densité des microtubules plus élevée dans les fibres de type I (Kano et al., 1991; Ralston et al., 1999). Les microtubules sont plus nombreux et plus denses à l'extrémité et à la périphérie de la cellule que dans les zones profondes de celui-ci. Les microtubules sont préférentiellement présents au niveau de la bande I et plus spécialement au niveau de la jonction A-I formant un complexe sous forme de réseau.

## soleus



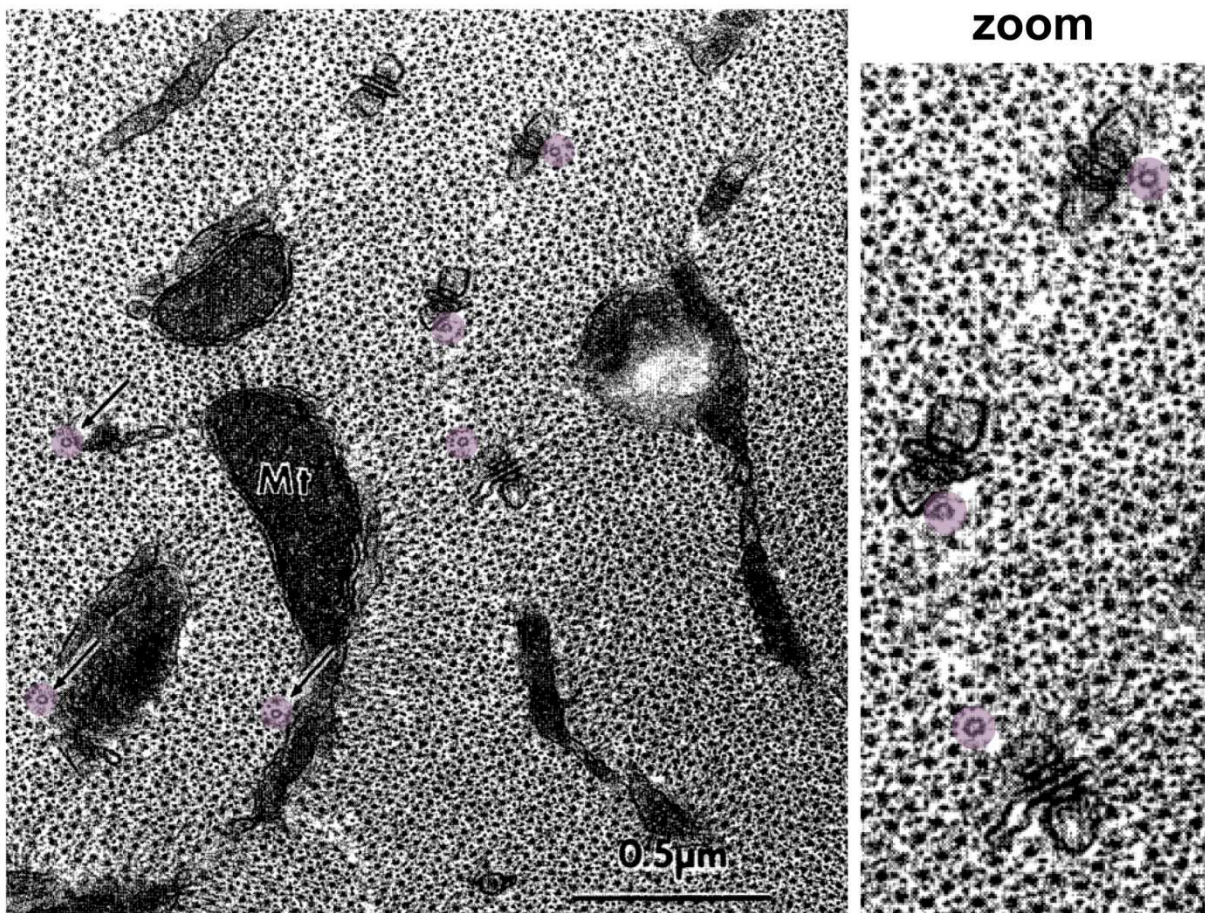
## TFL



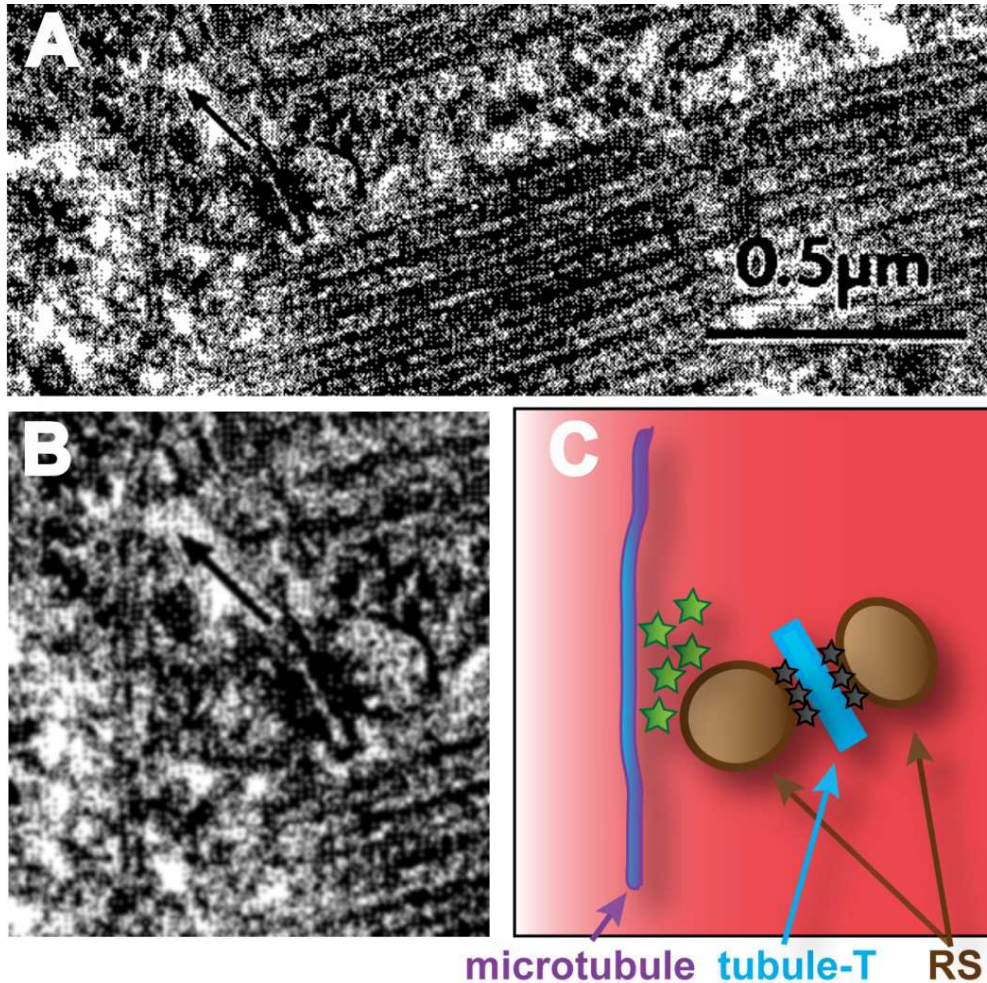
**Figure 28 : Le pattern des microtubules est dépendant du type de la fibre.** La localisation des microtubules ( $\alpha$ -tub, gris) a été mise en évidence par marquage immunfluorescent. Les flèches représentent les accumulations de microtubules sur les points de golgi (ici non marqués). TFL=muscle tenseur du fascia lata. Images de (Ralston et al., 1999).

### III-5-2-2-Les microtubules, les triades et les noyaux

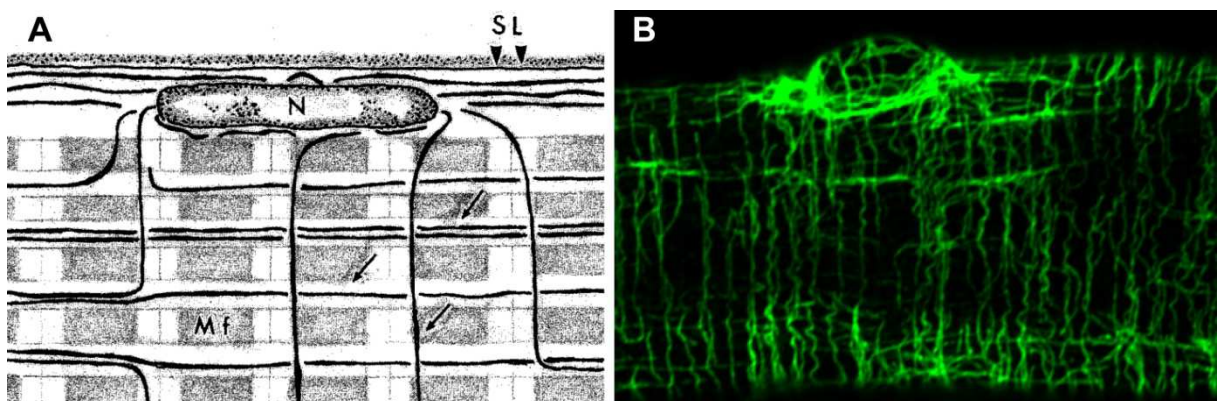
Dans les fibres matures, les noyaux sont complètement entourés par un réseau dense de microtubules (Ralston et al., 1999; Tassin et al., 1985a). Ces derniers s'accumulent entre la membrane plasmique et les myofibrilles. Les microtubules sont souvent localisés à proximité de nombreuses organelles et de structures musculaires spécifiques telles que les triades et les noyaux (Kano et al., 1991) (Figure 29, Figure 30 et Figure 31). Cette organisation du réseau de microtubules autour des noyaux est perturbée au cours de vieillissement. Dans les fibres de souris âgées, les microtubules deviennent moins denses autour des noyaux (et dans les fibres musculaires en général) (Bruusgaard et al., 2006).



**Figure 29 : Les microtubules sont à proximité des triades.** Coupe transversale de muscle de diaphragme de souris en microscopie électronique à transmission. Les microtubules ont été colorés en violet, les petits points noirs sont les myofibrilles. Mt= mitochondries. Images de (Kano et al., 1991).



**Figure 30 :** Les microtubules semblent établir des contacts avec les triades. Coupe longitudinale de muscle de diaphragme de souris en microscopie électronique à transmission (A). (B) est un zoom de (A). (C) est une représentation schématique de (B). Les étoiles noires représentent les ‘feets’ de RyR entre le RS et le tubule-T. Les étoiles vertes sont des marquages denses aux électrons entre les microtubules et le RS. Images de (Kano et al., 1991).



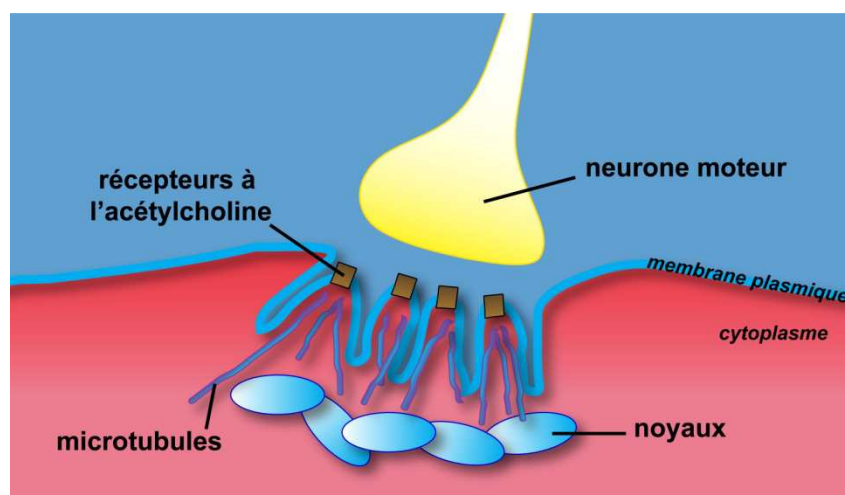
**Figure 31 :** Distribution des microtubules dans une fibre musculaire squelettique. (A) En 1991, représentation schématique de l’organisation des microtubules. SL=sarcolemme, N=noyau et Mf=myofibrilles. Schéma de (Kano et al., 1991). (B) En 2013, image confocale de la localisation des microtubules ( $\beta$ -tubuline, vert) mise en évidence par marquage immunfluorescent. Les microtubules ont une organisation en ‘quadrillage’ comme illustrés en (A).

### III-5-2-3-La dynamique des microtubules

Dans les cellules musculaires matures, le réseau de microtubules est présent sous forme de faisceaux de microtubules qui sont à l'origine d'un réseau durable. Le réseau est globalement stable mais chaque microtubule est dynamique au sein de ce réseau, avec une vitesse de l'ordre de 9  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Les faisceaux de microtubules sont des voies préférentielles de polymérisation pour les microtubules dynamiques et ces microtubules grandissent à partir d'éléments stables comme le Golgi (Oddoux et al., 2013).

### III-5-2-4-La jonction neuromusculaire (jNM)

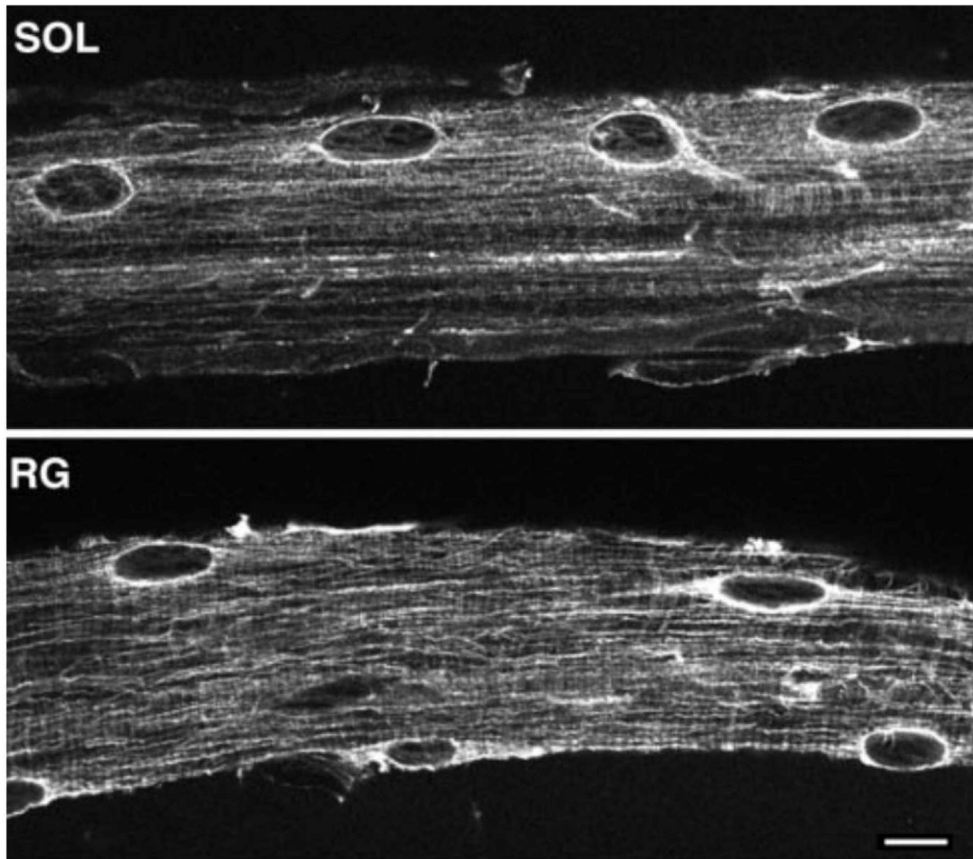
Les microtubules, les éléments du Golgi et les noyaux ont une organisation spéciale sous la jonction neuromusculaire (jNM) (Figure 32). La densité et l'orientation des microtubules sont dépendantes de stimulations électriques (Lu et al., 2001). L'activité électrique musculaire joue un rôle sur l'organisation des microtubules. En effet, la jNM présente une augmentation de la densité de microtubules (Simon et al., 1992). La stabilisation des microtubules par des MAP, favorise le recrutement des récepteurs à l'acétylcholine à la membrane de la jNM (Schmidt et al., 2012). L'association de CLASP2 à CLIP-170 est à l'origine de la stabilisation des microtubules. Mais avant de lier CLIP-170 et de stabiliser les microtubules, CLASP2 est déphosphorylée. L'origine de cette déphosphorylation provient du motoneurone qui sécrète de l'agrine qui va se lier sur son récepteur MuSK (Muscle-Specific Kinase). L'activation de MuSK par l'agrine va activer une cascade de phosphorylation qui va en effet, aboutir à la déphosphorylation de CLASP2.



**Figure 32 : Représentation schématique de la jonction neuromusculaire.** Les microtubules sont stabilisés (barre violet/bleu) au niveau du compartiment post-synaptique de la jonction neuromusculaire, ce qui favorise le recrutement des récepteurs à l'acétylcholine (carré marron) et permet la formation d'une jonction neuromusculaire mature. Schéma adapté de (Schmidt et al., 2012).



Les noyaux sont regroupés sous la jNM et sont entourés par un réseau dense de microtubules. Lors d'une dénervation, la densité des microtubules baisse dans toute la fibre quelque soit le type fibrillaire (Figure 33). Lors de ce phénomène, seules les zones de la jNM et péri-nucléaires ne subissent pas cette baisse de densité de microtubules.



**Figure 33 : Après dénervation, les microtubules présentent un pattern similaire à la surface entre les différents types de fibres.** Distribution des microtubules dans les muscles soleus (SOL) et gastrocnémien (RG). La localisation des microtubules a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. *Images de (Ralston et al., 1999).*

### *III-5-2-5-Les microtubules au cours du temps*

Le muscle est un organe qui représente un défi spécial lors du vieillissement. Dans les cellules satellites de souris âgées, la capacité de régénération de ces cellules est réduite. Cette réduction est causée par un déclin de la voie *notch* (Conboy et al., 2003). De plus, dans les fibres musculaires, les microtubules ne sont pas organisés de la même façon selon l'âge des souris (Bruusgaard et al., 2006). Le réseau de microtubules semble être à l'origine d'une des causes agissant sur la taille et la fonction des fibres squelettiques lié au vieillissement.

### *III-5-2-6-Les microtubules et les maladies musculaires*

La maladie de Duchenne est une pathologie dégénérative lié à l'X causée par une absence de la dystrophine. La souris *mdx* est un modèle animal caractérisé par une absence d'expression de dystrophine dans les fibres musculaires. Dans ces souris, la dystrophine est tronquée et ne possède pas la capacité fonctionnelle de s'attacher à la membrane plasmique. Les cellules musculaires de patients et de souris atteintes par la maladie de Duchenne présentent un réseau de microtubules qui est plus dense et désorganisé. En effet, la dystrophine se classifie comme une protéine adaptatrice qui organise et stabilise directement les microtubules (Azakir et al., 2010; Prins et al., 2009). La perturbation des microtubules dans les souris *mdx* peut contribuer à la physiopathologie des dystrophies musculaires. En effet, dans ces pathologies, la désorganisation des microtubules est associée à une mauvaise localisation du Golgi (Percival and Froehner, 2007; Percival et al., 2007). Cette mauvaise localisation pourrait mener à l'altération du trafic des protéines et pourrait expliquer dans les souris *mdx*, la diminution de l'expression des protéines associées à la dystrophine telles que les  $\beta$ -dystroglycans et les sarcoglycans (Ohlendieck and Campbell, 1991). L'équipe de Ward a montré que dans le muscle squelettique, les microtubules sont des éléments impliqués dans la voie des ROS (pour Reactive Oxygen Species) (Khairallah et al., 2012) et sont responsables d'un dysfonctionnement calcique. Les cellules issues de souris *mdx* présentent une augmentation de la production des ROS et de l'influx de calcium comme les cellules traitées avec du Taxol. Ainsi la voie des ROS pourraient être une cible effective thérapeutique dans le cadre de la pathologie de Duchenne.

# IV. Le Reticulum

---

## *IV-1-Le RE dans les cellules non différenciées*

Découvert et décrit en 1902 par Emilio Veratti, le RE est l'un des organites les plus importants dans la cellule (Veratti, 1961). La connaissance des rôles centraux du reticulum qui sont impliqués dans de multiples voies biochimiques et processus intracellulaires, est essentielle pour mieux appréhender et comprendre la biologie et la physiologie cellulaire. Le reticulum a beaucoup de fonctions différentes qui ne sont pas toutes distribuées de façon homogène mais sont souvent concentrées au sein de sous-régions bien distinctes. En effet, cet organite est responsable de synthèse protéique au sein d'une région riche en ribosome. En addition de la synthèse protéique, le reticulum participe à de multiples d'autres fonctions cellulaires telles que la biosynthèse des phospholipides, du cholestérol, ou même des stéroïdes, mais aussi à la dégradation du glycogène, aux réactions de détoxifications cellulaires et à la régulation fine du calcium intracellulaire.

### *IV-1-1-Structure générale du RE*

Le reticulum endoplasmique (RE) est un réseau tridimensionnel qui s'étend dans toute la cellule (Figure 34). Cette organite représente de loin le système membranaire le plus large et étendu dans les cellules animales (Griffiths et al., 1984). Classiquement, le RE est divisé en trois domaines : i) l'enveloppe nucléaire, ii) le RE lisse, iii) le RE rugueux.

#### *IV-1-1-1-L'enveloppe nucléaire (EN)*

L'enveloppe nucléaire sépare le compartiment nucléaire du compartiment cytoplasmique et comprend environ 10% de la surface totale du RE (Bannykh et al., 1996). L'enveloppe nucléaire peut être subdivisée en trois sous-domaines morphologiquement et biochimiquement différents. Le premier sous-domaine est la membrane nucléaire externe qui est continue morphologiquement avec le reste du réseau de reticulum. Il y a un continuum membranaire entre la membrane nucléaire et celle du reticulum. Le deuxième sous-domaine est la membrane nucléaire interne qui se distingue par un équipement protéique servant

uniquement à l'attachement de la lamina nucléaire à l'enveloppe nucléaire. Cet attachement est important pour l'organisation structurale du noyau. Le troisième sous-domaine est le complexe de pore nucléaire liant la membrane nucléaire interne et externe (Gerace and Foisner, 1994; Goldberg and Allen, 1995). Le complexe de pore nucléaire médie le trafic moléculaire bidirectionnel des protéines et de l'ARN entre le nucléoplasme et le cytoplasme (Nigg, 1997). C'est un complexe macromoléculaire d'environ 125 MDa. Plus de 100 polypeptides différents, les nucléoporines, composent ce complexe (Rout and Wente, 1994).

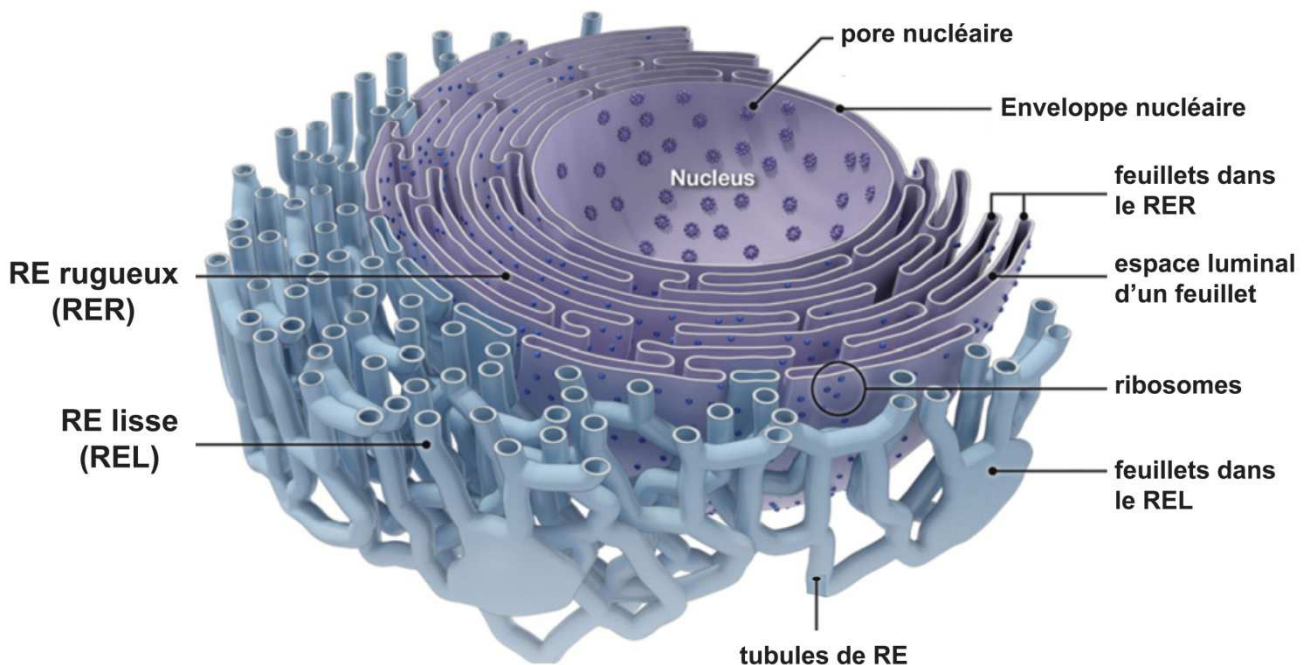
#### *IV-1-1-2-Le reticulum endoplasmique lisse (REL)*

En microscopie électronique, le REL est facilement observable car il est dépourvu de ribosomes contrairement au RE rugueux. Ce compartiment joue plusieurs rôles. D'une part, le REL joue un rôle dans certaines voies métaboliques. En effet, le REL est indispensable pour la biosynthèse des lipides membranaires (Bishop and Bell, 1988) et donc est nécessaire dans le renouvellement des membranes composées de bicouches lipidiques. D'autre part, le REL joue un rôle dans le stockage du calcium. Le REL régule la concentration en calcium dans le cytoplasme. Ce compartiment contient notamment les canaux importants pour les sorties de calcium vers le cytoplasme tels que le récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>R) ou le récepteur de la ryanodine (RyR).

#### *IV-1-1-3- Le reticulum endoplasmique rugueux (RER)*

Le RER est notamment impliqué dans la synthèse des protéines. En effet, le complexe ribosome/chaine polypeptidique/PRS (particule de reconnaissance du signal) est ciblé à la membrane du reticulum via le récepteur PRS (Rapoport et al., 1996) et permet ainsi la biosynthèse de protéines. Cette synthèse des protéines luminales et transmembranaires représente une des fonctions majeure du RE. Les protéines nouvellement synthétisées destinées à d'autres organites sont empaquetées et envoyées vers le Golgi. Ces événements se produisent dans des zones spécifiques du RE, les 'sites de sortie du RE' et puis sont envoyées dans les sites 'ERGIC' (pour 'ER-Golgi intermediate compartment', (Bannykh et al., 1998; Kuehn and Schekman, 1997).

Au contraire, les protéines mal-repliées sont envoyées dans le cytoplasme pour leur destruction. Ce mécanisme de dégradation est appelé ERAD (pour Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation). Des protéines chaperonnes sont associées pour médier le repliement des protéines, et ainsi assurer le ‘contrôle qualité’ et la maturation des protéines nouvellement synthétisées. Ces chaperonnes sont par exemple, la protéine BiP (pour Binding immunoglobulin protein), la calnexine, la calreticuline, ou PDI (pour protéine disulfure isomérase). Ces protéines sont généralement utilisées comme marqueurs moléculaires pour le RE.



**Figure 34 : Le réseau du reticulum endoplasmique dans les cellules.** Représentation schématique des différentes structures qui composent le reticulum endoplasmique (RE). *Schéma adapté de (Goyal and Blackstone, 2013).*

#### *IV-1-1-4-Les feuillettes ou les tubules de reticulum*

Il existe un continuum de membrane qui s'étend de l'enveloppe nucléaire jusqu'aux RER et REL. L'architecture du reticulum est composée de structures spécifiques bien définies en forme de feuillettes et de tubules (ou dentelles) (Figure 34) (Baumann and Walz, 2001; Shibata et al., 2009; Voeltz et al., 2006; Voeltz et al., 2002). Ces structures de reticulum sont dynamiques, se formant et disparaissant continuellement. En règle générale, les feuillettes de reticulum correspondent RER, régions du RE qui contiennent les ribosomes associés avec les translocons alors que les dentelles/tubules de reticulum correspondent au REL, régions dépourvues de ribosomes situées plus en périphérie que les feuillettes (Shibata et al., 2006). Les différences de forme et de courbures entre les feuillettes et les tubules de RE peuvent aussi contribuer à la distribution et compartimentalisation des protéines dans le RE (Cui-Wang et al., 2012).

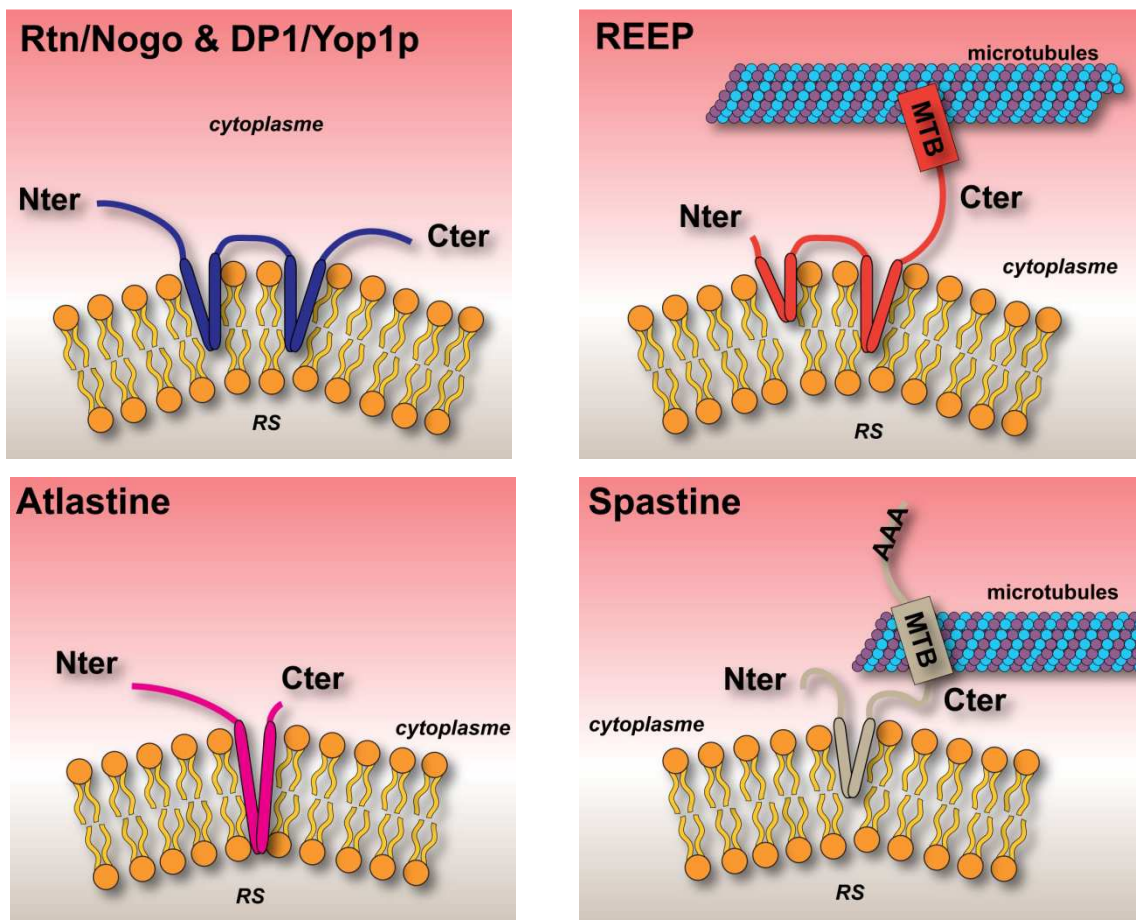
On peut noter que le RE cortical réfère aux régions périphériques du RE qui sont étroitement accolées et/ou attachées à la membrane plasmique. Les cellules musculaires sont un type cellulaire où les membranes de reticulum sont proches des membranes plasmiques (Schneider, 1994; Takeshima et al., 2000).

#### *IV-1-2-Les protéines impliquées dans les différentes structures de reticulum*

Pour les biologistes l'architecture des organites est un puzzle intellectuel. Les courbures de membranes ne sont pas seulement de belles architectures, ces courbures sont aussi des structures uniques et centrales, visibles presque à tous les processus cellulaires (Takei et al., 1999). Qu'est ce qui génère toutes ces courbures ? Plusieurs protéines qui peuvent générer des courbures membranaires ont été identifiées.

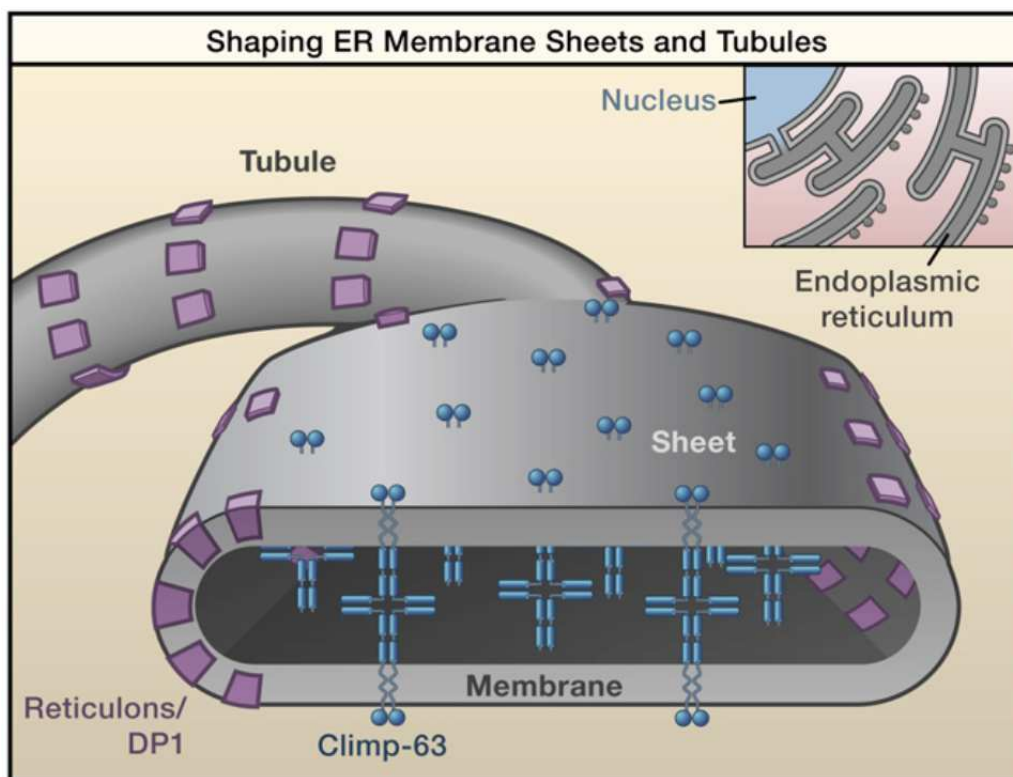
### IV-1-2-1-La structuration des tubules de RE

Les tubules de RE sont caractérisés par des membranes hautement courbées. Ces courbures sont formées par trois familles de protéines stabilisatrices ; (i) les protéines Rtn4/Nogo que l'on nomme aussi protéines du réticulon, (ii) les protéines DP1/Yop1p (DP1 est aussi connu sous le nom de REEP5) et (iii) l'ensemble des protéines de la famille REEP (pour receptor expression enhancing protein) (Park et al., 2010; Voeltz et al., 2006). Ces trois familles sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules eucaryotes. Leur absence conduit à la perte des tubules tandis que leur surexpression remodèle le reticulum (Figure 36) (Tolley et al., 2008; Voeltz et al., 2006). Par exemple, l'absence des protéines REEPs inhibe la structuration du RE suggérant que ces protéines sont directement impliquées dans la mise en forme du RE. Ces protéines sont nécessaires et suffisantes pour la formation des tubules (Park et al., 2010). En effet, ces protéines adoptent une structure en épingles à cheveux qui s'insère dans la membrane dans un seul des feuilletts lipidiques et provoque donc une courbure de la membrane (Figure 35).



**Figure 35 : Topologie des protéines Rtn4/Nogo, DP1/Yop1p, REEP, Altastine et Spastine.** MTB=site de liaison aux microtubules, AAA=ATPase Associated with diverse cellular Activities. Schéma adapté de (Park et al., 2010) (Hu et al., 2009), (Voeltz et al., 2006).

Ce sont ces protéines qui stabilisent la courbure des tubules. Certaines de ces protéines sont capables d'interagir directement avec les microtubules comme notamment REEP1 (Park et al., 2010). L'isoforme REEP1 peut aussi s'associer avec les protéines du réticulon. Des mutations dans les protéines REEP provoquent une morphologie anormale du RE et une atteinte neurologique héréditaire caractérisée par des faiblesses musculaires des membres inférieurs, qui entraînent une raideur des ces membres (que l'on nomme paraplégie spastique familiale, ou HSP, (Durr, 2008)). Les autres protéines impliquées dans les paraplégies spastiques familiales comme l'Atlastine et la Spastine, ont aussi une topologie en épingles à cheveux (Figure 35) (Hu et al., 2009; Park et al., 2010).



**Figure 36 : Modèle moléculaire pour la formation des feuillets et des tubules de réticulum.** Section d'un feuillet de réticulum. Les protéines du réticulon et DP1/Yop1p (violet) enrichies dans les tubules et dans les bords des feuillets membranaires induisent les courbures. La protéine CLIMP-63 (bleu) qui est exclue de tubules, stabilise les feuillets de réticulum via sa dimérisation en 'tête bêche'. Cet arrangement précis permet de garder la lumière des feuillets toujours constante (environ 50 nm dans les cellules de mammifères). Schéma de (Barlowe, 2010).



### *IV-1-2-2-La structuration des feuillet de RE*

Les feuillet de réticulum varient en taille mais la lumière du RE entre les deux membranes est d'une taille approximativement la même que le diamètre des tubules (environ 50 nm dans les mammifères, (Bernales et al., 2006a; Bernales et al., 2006b)). Le bord des feuillet à une courbure similaire à celle des tubules. La formation des feuillet de reticulum dépendrait donc de plusieurs mécanismes. D'une part, les protéines du réticulon sont indispensables à la formation des courbures de membranes en bordure des feuillet (Shibata et al., 2010). Ces protéines sont donc nécessaires pour stabiliser les bords de ces membranes (Shibata et al., 2009). D'autre part, certaines protéines membranaires permettent la formation de ponts à travers l'espace luminal du RE (Senda and Yoshinaga-Hirabayashi, 1998; Shibata et al., 2010) maintenant ainsi un espace luminal de taille constante. CLIMP-63 est une de ces protéines nécessaires pour maintenir l'espace luminal dans les feuillet de reticulum ((Shibata et al., 2010), cf chapitre V, (Figure 36). D'autres processus peuvent structurer les feuillet de RE. Ces membranes sont riches en ribosomes (environ 1000 ribosome/ $\mu\text{m}^2$ ) et sont donc indispensables pour la translocation des protéines. Les ribosomes et les polyribosomes pourraient réguler la forme des feuillet de RE (Puhka et al., 2007; Shibata et al., 2009; Shibata et al., 2010). L'addition de drogue comme par exemple la puromycine (drogue qui désassemble les polysomes) désorganise les feuillet de RE et conduisent à la re-localisation de CLIMP-63 du RER vers tout le RE (Nikonov et al., 2007).

### *IV-1-2-3-Les autres mécanismes importants pour la structuration du RE*

Des mécanismes différents peuvent générer des courbures membranaires. D'une part, des protéines comme l'amphiphysine ou l'endophiline peuvent déformer la membrane plasmique. Ces protéines sont appelées des protéines à domaine BAR qui détectent les courbures membranaires. Les protéines à domaines BAR sont des domaines de liaison de lipides en forme de banane (Hinshaw and Schmid, 1995). Certains domaines BAR (F-BAR) peuvent directement se lier aux microtubules. Dans les plantes, la protéine SH3P2 à domaines BAR est capable d'agir sur le RE (Zhuang et al., 2013). D'autre part, les protéines transmembranaires vont naturellement moduler la forme de la membrane plutôt que de s'adapter à la forme des membranes. Ce phénomène a été observé pour le récepteur de acétylcholine à la jonction neuromusculaire (Fertuck and Salpeter, 1974; Unwin, 2005). La formation d'homo ou d'hétéro-multimères de protéines transmembranaires peut conduire à un effet plus important sur les courbures

locales. Les microtubules seraient aussi importants pour la structuration de RE. Dans le muscle, la myopathie centronucléaire est une maladie congénitale caractérisée par une faiblesse musculaire et des fibres musculaires à noyaux anormalement centraux. Des mutations dans le gène codant pour l'amphiphysine 2 (gène *BINI*) est responsable de cette maladie. En effet, l'amphiphysine 2 est une protéine impliqué le remodelage des membranes et la formation des tubules-T (cf chapitre IV-2-5).

### *IV-1-3-Dynamique et ancrage du reticulum*

Le reticulum est un système membranaire hautement et constamment dynamique. Par exemple, le reticulum se réorganise de façon drastique durant la mitose. Durant les quatre phases de la mitose, le RE collapse autour du noyau, se réassemble autour de la chromatine condensée et enfin s'étend à nouveau vers la périphérie cellulaire (Sanger et al., 1989; Zaal et al., 1999; Zeligs and Wollman, 1979). Ces changements se produisent grâce au réseau de microtubules. En effet, ces réarrangements de position requièrent une contribution externe comme les microtubules via les MAPs ou bien encore les moteurs moléculaires.

#### *IV-1-3-1-Dynamique grâce aux microtubules*

L'assemblage et le désassemblage du cytosquelette est intimement lié avec la modification de la forme de la membrane plasmique, du RE et des organites (Sheetz, 2001). Souvent observé par microscopie électronique, une interaction a été montrée entre le RE et le réseau de microtubules. Les membranes de RE s'étendent parallèlement et co-alignent avec les microtubules (Buckley and Porter, 1975; Dailey and Bridgman, 1991; Terasaki et al., 1986). En effet, l'association entre le RE et le cytosquelette joue un rôle indispensable dans la formation des tubules/feuillettes, la dynamique et la maintenance générale du RE. Dans les cellules animales, l'association entre le RE et les microtubules supporte la plupart de ces processus (Terasaki et al., 1986; Terasaki et al., 1984). Deux éléments montrent l'interdépendance entre les microtubules et le RE. D'une part, la polymérisation des microtubules et l'extension du reticulum se produisent ensemble. D'autre part, la perturbation du réseau de microtubule par l'utilisation de drogues dépolymérisant les microtubules ou par de faible température provoque des effets sur la distribution du reticulum. Cependant, la dépolymérisation à court terme (15 min) des microtubules ne perturbe pas le réseau de reticulum. Seule l'absence prolongée des

microtubules (à partir de 2 h) mène à la rétractation lente du réseau de reticulum vers le centre de la cellule. Toutefois, un lavage des drogues dépolymérisant les microtubules, restaure entièrement le réseau de RE après 15 à 30 min (Lee et al., 1989; Terasaki et al., 1986). En revanche, la dépolymérisation du réseau d'actine ne provoque pas d'effet sur l'organisation des tubules de RE (Lee et al., 1989; Terasaki et al., 1984). Les premières données obtenues dans les années 90, plaident en faveur de l'hypothèse que les microtubules seraient indispensables à la formation du RE. Parmi tous les organites, le RE est celui qui a le lien le plus étroit avec le cytosquelette. Des protéines pouvant faire le lien entre les microtubules et le reticulum sont partiellement responsable de la déformation des membranes du reticulum (Grigoriev et al., 2008) (cf ci-dessous, III-1-3-2).

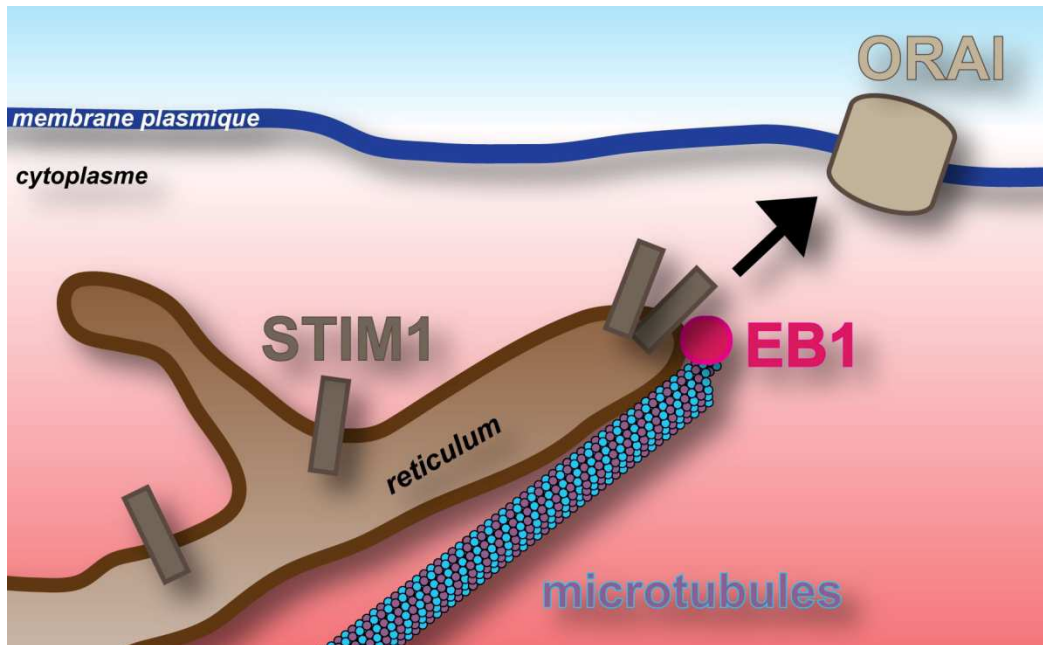
### *IV-1-3-2-les mécanismes de remodelage du RE*

Le remodelage du RE dépend des microtubules. Deux mécanismes possibles ont été décrits (Waterman-Storer and Salmon, 1998).

1) Le mécanisme de glissement des membranes de RE sur les microtubules. Le RE glisse sur les microtubules stables (non dynamiques et non mobiles) via des moteurs moléculaires tels que la kinésine 1 (vitesse environ 4  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) ou la dynéine (vitesse environ 0.4  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Pour exemple, la kinésine 1 permet le mouvement des tubules de RE via la protéine membranaire kinectine qui lui sert d'ancrage dans le RE (Kumar et al., 1995; Toyoshima et al., 1992). La déplétion de kinectine conduit au rétrécissement du RE vers les régions péri-nucléaires et le transport du reticulum est altéré. A l'inverse, la surexpression de cette protéine provoque l'expansion des feuillettes dans tout le reticulum (Santama et al., 2004; Zhang et al., 2010).

2) Le mécanisme de TAC (tip attachment complex). Les TAC sont des complexes de protéines du RE qui vont se lier au bout 'plus' des microtubules. Ainsi le RE s'étend grâce à la polymérisation des microtubules (vitesse environ 4  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Par exemple, la protéine transmembranaire STIM-1 (pour STromal-Interaction Molecule) localisée dans le reticulum joue un rôle dans ce processus. En effet, la protéine STIM1 est impliquée dans le remodelage de reticulum en liant les bouts 'plus' des microtubules via la protéine EB1. La déplétion de STIM-1 ou d'EB1 réduit dramatiquement le mouvement du reticulum (Grigoriev et al., 2008). Après épuisement des stocks calciques du reticulum, l'interaction de STIM-1 avec EB1 permet à STIM-1 d'établir des points de contact entre les tubules de reticulum et la membrane

plasmique pour activer un canal calcique (ORAI). Cette modification du reticulum via les microtubules permet dans ce cas, une régulation plus fine des stocks calciques (Figure 37). Enfin, des mutations de STIM1 causent des myopathies à agrégats tubulaires (Bohm et al., 2013).



**Figure 37 : Modèle du mécanisme de SOCE (Store Operated Calcium Entry).** Lors d'une déplétion en calcium, le reticulum est remodelé. En effet, l'association de STIM1 avec les microtubules via la protéine EB1 permet au reticulum d'atteindre la membrane plasmique pour établir des points de contacts avec le canal calcique ORAI. *Schéma adapté de (Varnai et al., 2009).*

Cependant, pourquoi les cellules ont-elles des mécanismes redondants pour l'extension du reticulum. Waterman-Storer et Salmon (1998) suggèrent que l'usage de ces mécanismes pourraient dépendre de l'organisation des microtubules. Les cellules pourraient préférentiellement employer le mécanisme TAC quand le RE doit se déformer/reformer rapidement comme par exemple durant une division cellulaire où les microtubules sont très dynamiques. Tandis que le mécanisme de glissement serait prédominant dans les longs axones unipolaires ou l'extension du RE nécessite un réseau réticulaire flexible.

### *IV-1-3-3-L'ancrage du reticulum sur les microtubules*

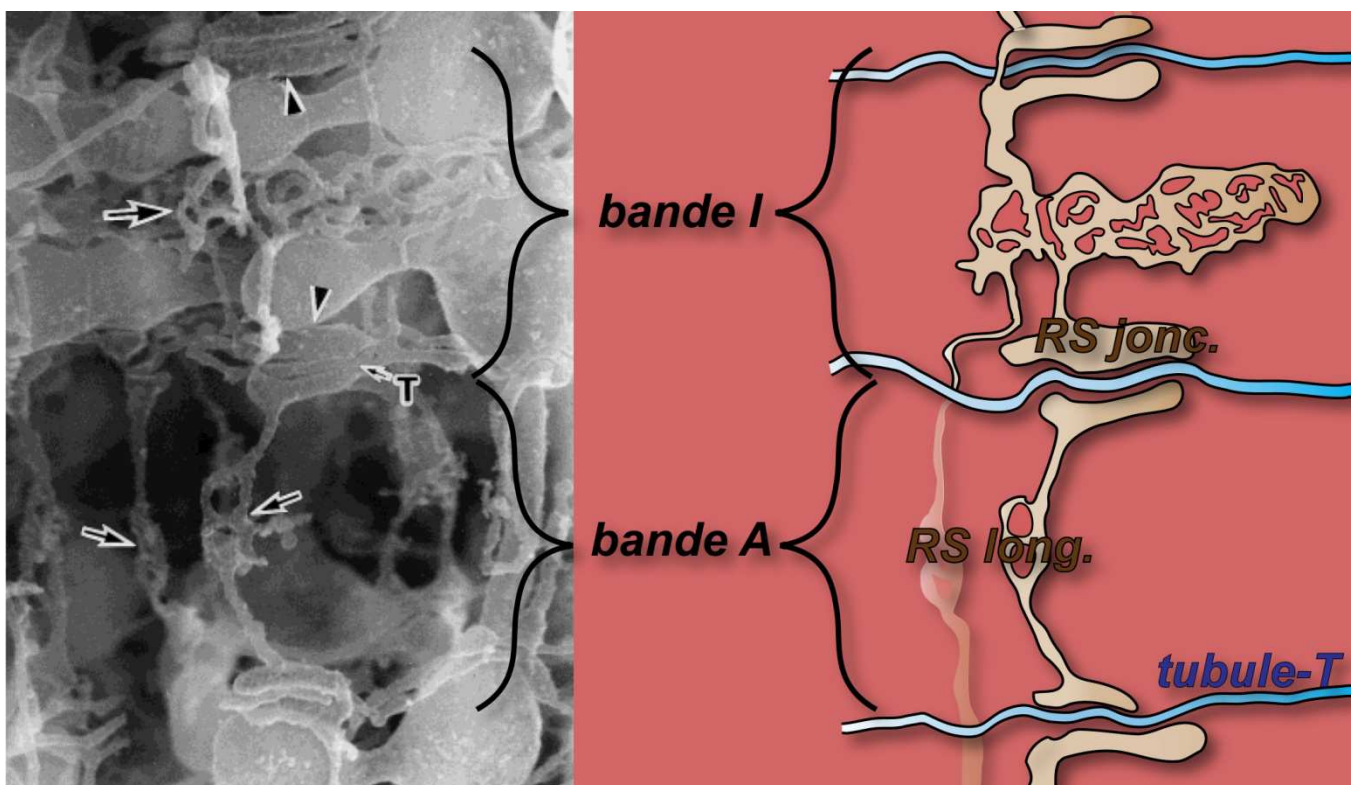
Pour le bon positionnement et la mobilité du RE dans la cellule via les différents mécanismes (cf ci-dessus, III-1-3-2), des interactions stables sont nécessaires entre les microtubules et les membranes de RE. Certaines protéines ont la capacité d'ancrer le reticulum sur le réseau de microtubules. Les protéines membranaires du reticulum telles que REEP-1, p180 et CLIMP-63, peuvent lier directement le réseau de microtubules et sont appelées 'protéines d'ancrage' (Klopfenstein et al., 1998; Ogawa-Goto et al., 2007; Park et al., 2010). La surexpression ces protéines dans des cellules modèles, conduit à une désorganisation du réseau de microtubules qui est corrélé à une déformation du réseau de reticulum. CLIMP-63 est l'exemple parfait de ce type de protéines qui stabilisent l'interaction RE-microtubules (Klopfenstein et al., 1998). D'autre part, certaines +TIPs peuvent relier les membranes aux microtubules. La famille des protéines CLIP sont impliquées dans l'attachement d'organites membranaires aux microtubules (Rickard and Kreis, 1996) comme par exemple CLIP170 qui lie les endosomes aux microtubules (Pierre et al., 1992).

### *IV-2-Le RS dans les cellules musculaires*

Le reticulum possède les mêmes fonctions dans les différents types cellulaires mais certaines cellules une de ces fonctions est plus particulièrement développée. Dans les cellules musculaires, l'organisation du reticulum doit changer durant la différenciation cellulaire pour répondre à son devoir final. En effet, la cellule musculaire possède un reticulum qui permet de stocker davantage de calcium. Ce calcium est indispensable pour la contraction musculaire. Dans les myoblastes, la réorganisation du reticulum est drastique pour assurer la fonction des sous domaines de reticulum importants pour la contraction musculaire (Flucher, 1992). Les cellules musculaires sont des cellules excitables et les stimulations électriques omniprésentes interviennent dans la mise en place et l'organisation très fine du reticulum. Un sous-domaine spécialisé se développe ainsi progressivement, le reticulum sarcoplasmique (RS), dédié principalement au stockage du calcium.

### IV-2-1-Structure générale

Dans le muscle, le RS est décrit avec deux parties distinctes par leur topographie et leur morphologie très spécifique: le RS jonctionnel (ou citerne terminale) et le RS longitudinal (ou RS tubulaire) (Franzini-Armstrong, 1980). Le RS longitudinal est situé le long des myofibrilles alors que le RS jonctionnel entoure les tubules transverses (tubules-T). Dans les cellules musculaires humaines, les tubules-T sont situés le long de la jonction des bandes A-I et sont couplés avec le RS jonctionnel pour former les triades (Ogata and Yamasaki, 1997) (Figure 38). Le RS jonctionnel est sous forme de petites citernes d'environ 60 nm de diamètre. Dans ces mêmes cellules, le RS longitudinal est le reticulum reliant deux RS jonctionnels. Le RS longitudinal est principalement décrit au niveau de la bande A sous forme de tubules uniques et peut se ramifier en un réseau réticulaire d'environ 50 nm de diamètre au niveau de la bande H. Au niveau de la bande I, le RS longitudinal est présent sous forme de tubules multiples.



**Figure 38 : Organisation du réseau de RS dans le muscle squelettique.** Panneau de gauche : Image de microscopie électronique (Ogata and Yamasaki, 1997), les flèches pointent le RS, les têtes de flèches pointent les citernes terminales du RS jonctionnel, T = le tubule transverse. Panneau de droite : schéma correspondant. RS long= RS longitudinal, RS jonc=RS jonctionnel.

### *IV-2-2-Le RS = le réservoir du calcium*

Le RE est le réservoir calcique intracellulaire principal dans les cellules non-musculaires et par analogie, le RS est le stock calcique principal de la cellule musculaire. Dans les cellules musculaires, différentes protéines servent à relâcher ou à recapter ce second messenger dans ou depuis l'espace cytoplasmique (Martonosi et al., 1982; Pozzan et al., 1994). La séparation en sous domaines fonctionnels du RS est corrélée à la répartition des protéines impliquées dans la libération ou la recapture du calcium. La partie longitudinale participe à la capture du calcium. La charge en calcium dans le RS est assurée par un transport actif réalisé par une pompe à calcium nommée SERCA (pour sarco-endo reticulum calcium ATPase). La partie jonctionnelle est spécialisée dans le stockage et la libération du calcium. Le stockage est réalisé via à une protéine présente dans la lumière du RS, la calsésquestrine tandis que les relâchements de calcium sont réalisés via des canaux calciques, principalement le RyR (Flucher and Andrews, 1993; Flucher et al., 1993a) mais également le récepteur de l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R).

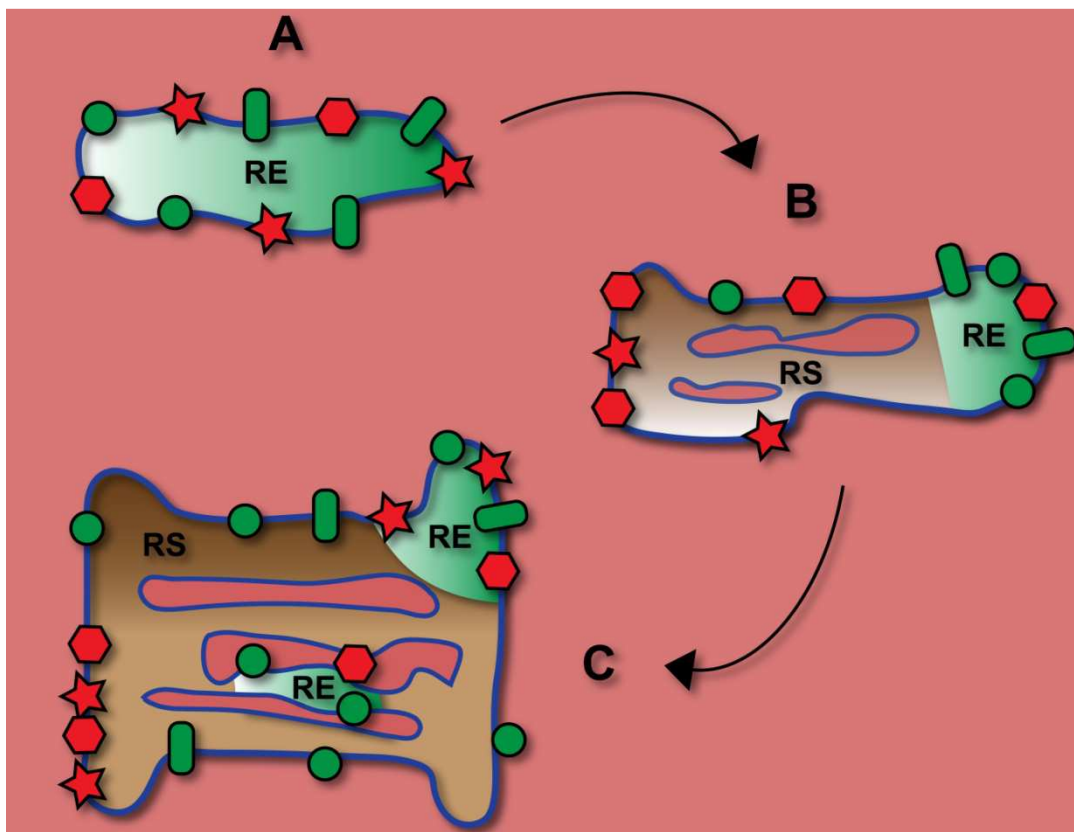
### *IV-2-3-RE/RS, la formation du RS*

Dans les cellules très différenciées comme les cellules musculaires, la différence physiologique et morphologique, entre le RE et le RS reste encore floue. En effet, dans les cellules musculaires, le RS contient les protéines définissant le RE telles que la calnexine, la calreticuline, la protéine BiP, ou la protéine PDI et présente aussi une activité de synthèse protéique comme le RE. Ces données suggèrent que le RE est un sous domaine de RS et/ou que le RS remplace le RE dans ces cellules musculaires (Villa et al., 1993; Volpe et al., 1992).

Certains comme Metsikko pensent que le RER est présent dans les cellules musculaires squelettiques matures et présenteraient deux sous-compartiments bien distincts. Le premier sous-compartiment est situé dans la bande I et ne semble pas contenir des sites de sortie du RE. Le second est situé à proximité de la bande Z et pourrait soutenir l'activité d'exportation vers le Golgi (Kaisto and Metsikko, 2003; Rahkila et al., 1998). Il semble que les protéines peuvent facilement se déplacer à partir des sites de la synthèse à proximité de la jonction SR, vers les sites de sortie localisés autour de la bande Z, soutenant l'idée d'un continuum entre les membranes du RE et du RS (Kaisto et al., 2002; Kaisto and Metsikko, 2003). De plus, les ARN messagers (ARNm) codant pour la calsésquestrine et le DHPR ont été localisés spécifiquement dans ces sous-compartiments de RER, ce qui suggère qu'un mécanisme de compartimentalisation des

ARNm peut se produire dans ces domaines (Nissinen et al., 2005). En effet, certains travaux suggèrent que des micro-domaines lipidiques pourraient aider à définir les domaines spécifiques enrichis en protéines du RE dans les cellules musculaires squelettiques (Kaakinen et al., 2008). Selon l'équipe de Sorrentino, la création de complexes multi-protéiques pourrait aider à définir l'organisation générale des domaines spécifiques de RS (Rossi et al., 2008).

D'autres pensent que pendant la différenciation du muscle, identifiée grâce à la protéine luminaire BiP, le RE est transformé en RS via l'expression graduelle de protéines de RS participant à l'homéostasie calcique (Martonosi, 1982) ou via une délocalisation des protéines spécifiques (Rossi et al., 2008) (Figure 39). Dans les premières étapes de la myogenèse, les protéines majeures spécifiques du RS comme le RyR, SERCA et la calséquestrine, sont exprimées (Arai et al., 1992; Marks et al., 1991; Zubrzycka and MacLennan, 1976). La protéine SERCA est la protéine la plus abondante dans le RS. En effet, l'accumulation progressive de la protéine SERCA dans les membranes du RS s'effectue en parallèle avec la transition structurale du RS en sa forme mature.

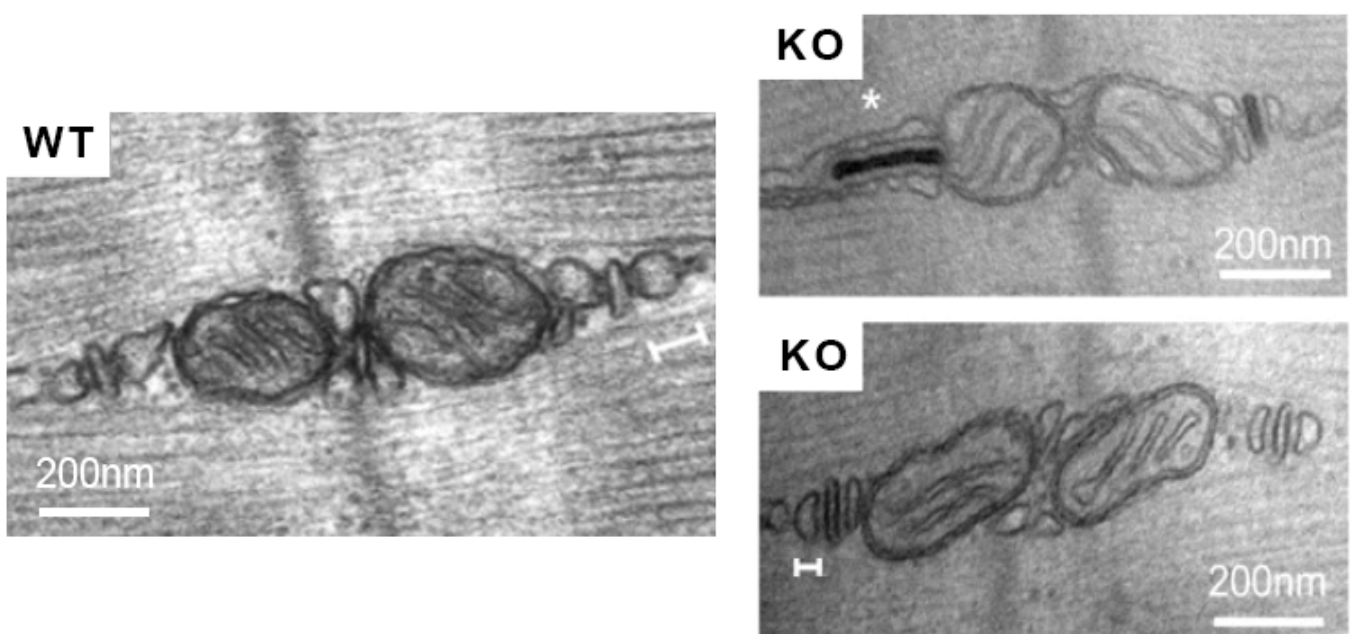


**Figure 39 : Modèle décrivant les étapes de la mise en place du RS selon Rossi (2008).** (A) Les protéines du RS sont synthétisées et localisées dans le RE. (B) Les nouvelles protéines du RS quittent le RE et diffusent pour développer le RS. (C) Le RS est maintenant organisé. Les protéines du RS s'assemblent en complexe au RS jonctionnel ou reste libre dans le RS longitudinal. Les protéines du RE sont en vert, les protéines du RS sont en rouge. Schéma adapté de (Rossi et al., 2008).



#### IV-2-4-Les triades

Le complexe de relâchement du calcium est localisé au niveau d'une structure très spécifique du muscle squelettique, la triade (Porter and Palade, 1957). Chaque triade est composée de l'accolement de deux citernes terminales de RS de part et d'autre d'un tubule-T. Dans le muscle strié, le rapprochement de la membrane du RS et de celle du tubule-T permet d'établir un contact direct entre les canaux calciques (le RyR et le DHPR) qui est indispensables pour la libération de calcium nécessaire à la contraction musculaire. Dans les souris wild type (WT), l'orientation des tubules transverses est perpendiculaire à l'axe des sarcomères et donc parallèle aux lignes Z (Figure 40, WT). Toutefois, dans les muscles de souris KO-triadine, les triades ont une orientation anormale avec une orientation oblique ou perpendiculaire aux lignes Z (Figure 40, KO) pour 30% de l'ensemble des triades. Il a été également observé que les citernes terminales présentent une forme arrondie avec une lumière de 68 nm d'épaisseur dans les muscles de souris wt alors qu'elles ont une forme beaucoup plus aplaties dans les muscles de souris KO-triadine, la lumière faisant 26 nm d'épaisseur (Oddoux et al., 2009). On parle ainsi de citernes en forme de 'pois' dans les souris WT et en forme de 'haricot' dans les souris KO-triadine.



**Figure 40 :** Dans le muscle de souris KO-triadine les triades sont orientées longitudinalement et les citernes terminales de RS sont atrophiées. Microscopie électronique des EDL de souris WT et KO-triadine (KO). Dans la souris KO-triadine, 30% des triades ont une mauvaise orientation (astérisque) et l'épaisseur des citernes terminales de RS est diminuée d'environ 60% par rapport aux souris WT. Image de (Oddoux et al., 2009).

### *IV-2-5-La formation des triades*

La formation des myofibrilles chez la souris commence vers le 15<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (E15) et les premières invaginations tubulaires de membranes apparaissent longitudinalement (Flucher, 1992; Flucher et al., 1993b; Takekura et al., 2001). A E16-E17, les tubules-T sont plus longs, s'invaginant plus profondément et les myotubes se sont transformés en myofibrilles avec des myofibrilles alignées et occupant tout le volume cytoplasmique. A E17/E18, les triades se forment et leur localisation à la jonction des bandes A-I se produit. A la naissance (D1), la majorité des tubules-T sont encore longitudinaux et leur orientation se met en place au cours des trois premières semaines pour aboutir à l'organisation très spécifique des triades en double rangées de points visible en immunomarquage (cf Figure 10).

Contrairement au RS, certaines protéines sont déjà identifiées et décrites comme impliquées dans la formation des tubules-T. La cavéoline-3 provoquerait l'invagination de la membrane plasmique tandis que l'amphiphysine 2 serait impliquée dans la tubulation des membranes (Butler et al., 1997; Flucher et al., 1993a; Lee et al., 2002; Takekura et al., 2001). De même, la myotubularine jouerait un rôle dans le remodelage des tubules-T pour assurer le turn-over des invaginations (Al-Qusairi et al., 2009). La Mitsugumin29 qui est une protéine initialement localisée dans le tubule-T, serait importante dans la stabilisation des tubule-T et donc des triades (Nishi et al., 1999; Takeshima et al., 1998b). L'absence des ces protéines inhibe les structures tubulaires suggérant que ces protéines sont directement impliquées dans la biogenèse des tubules-T. Il est aussi intéressant de noter que la plupart de ces protéines citées ci-dessus sont toutes mutées dans des pathologies du muscle comme par exemple dans la myopathie centronucléaire (McEntagart et al., 2002; Nicot et al., 2007).

# V. CLIMP-63

---

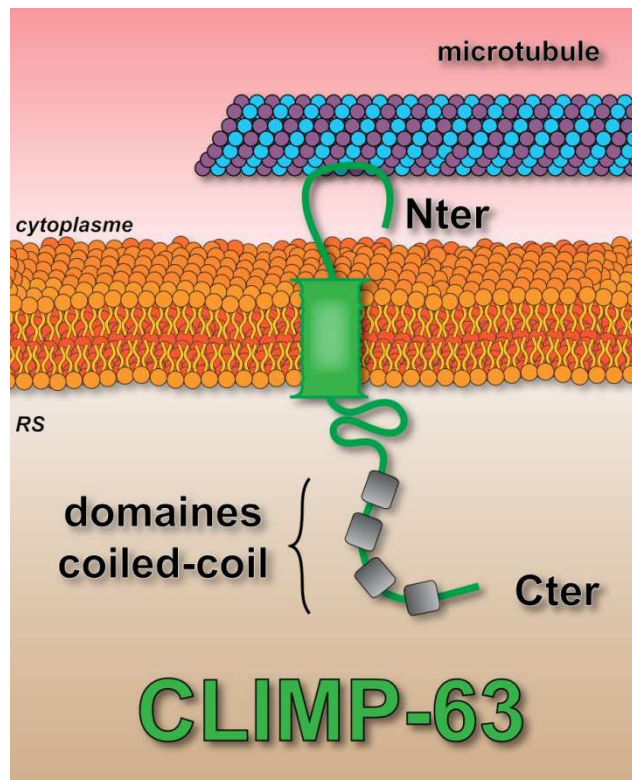
## *V-1-Découverte de CLIMP-63*

Les études morphologiques chez les eucaryotes indiquent une complexité importante dans la structure des membranes entre le RE et le Golgi. Merisko (1986) a montré que les vésicules non-clathrine dépendantes sont interposées entre le RE et le Golgi et sont impliquées dans le transport RE/Golgi créant des éléments tubulo-vésiculaires (Merisko et al., 1986) et que l'on nomme ER-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) (Lindsey and Ellisman, 1985). Ces éléments tubulaires semblent être importants pour médier le transport des protéines exportées entre le RE et le Golgi (Schweizer et al., 1990). Une protéine membranaire de 53 kDa (ERGIC-53) a été identifiée comme marqueur pour le compartiment ERGIC. En utilisant cette protéine, la fraction ERGIC a pu être isolée et une nouvelle protéine a été identifiée dans ce compartiment, colocalisant avec ERGIC-53. Cette nouvelle protéine membranaire est CLIMP-63.

## *V-2-Topologie et structure de CLIMP-63*

CLIMP-63 (Cytoskeleton-Linking Membrane Protein 63), connue aussi sous le nom de CKAP4 (Cytoskeleton-Associated Protein 4) a été découverte par deux groupes dans les années 1990. En 1992, le groupe de Mundy et Warren a identifié CLIMP-63 comme étant la protéine la plus palmitoylée durant la mitose (Mundy and Warren, 1992). Un an plus tard, le groupe de Hauri a identifié et caractérisé la même protéine comme affectant le transport RE/Golgi et étant abondante dans le RER, capable de structurer les membranes en tubules (Schweizer et al., 1990).

CLIMP-63 est une protéine ubiquitaire qui est très abondante dans de nombreux types cellulaires. CLIMP-63 est une protéine transmembranaire de type II présente chez les eucaryotes mais qui ne semble pas présenter d'homologue dans les bactéries, les levures et les insectes. CLIMP-63 est issue du gène *CKAP4*. Sa séquence est composée de 602 acides aminés pour un poids moléculaire apparent de 63 kDa. Cette protéine est décrite avec trois parties : i) une partie N-terminale cytoplasmique de 106 acides aminés, ii) une partie transmembranaire de 22 acides aminés, iii) une partie C-terminale de 474 acides aminés située soit dans la lumière du reticulum soit dans le milieu extracellulaire (Figure 41).



**Figure 41 : Topologie de CLIMP-63.** CLIMP-63 peut lier les microtubules via son domaine N-terminal cytoplasmique et comporte de nombreux sites d'interaction protéine-protéine (domaine coiled-coil) via son domaine C-terminal luminal.

La partie N-terminale contient un domaine de liaison aux microtubules et un domaine composé d'une région riche en prolines (domaine PRD) qui est suivie d'une répétition de sept glycines, six sérines et huit alanines (répétition de GSA, résidus de 72 à 89). Les analyses de séquences montrent que la partie N-terminale de CLIMP-63 est la partie la plus variable. En effet chez les rongeurs, CLIMP-63 est dépourvue de 15 acides aminés dans cette séquence répétée en GSA. La partie C-terminale contient de nombreux acides aminés chargés (61 glutamines, 33 lysines, 31 arginines, 29 acides aspartiques et 11 histines). Cela représente plus d'un tiers des résidus luminaux (165 AA chargés/474 AA total). Ce domaine luminal est prédit avec plusieurs motifs coiled-coil (entre 3 et 5 selon les logiciels de prédiction) (coiled-coil motif (Lupas et al., 1991).

Des approches de spectrométrie de masse et de marquage métabolique au  $S^{35}$  montrent que CLIMP-63 est une protéine très stable avec une  $\frac{1}{2}$  vie de 20 h dans les HEK293 (Pepin et al., 2012), 42 h dans les HeLa et 156 h dans les C2C12 (Foster et al., 2006).

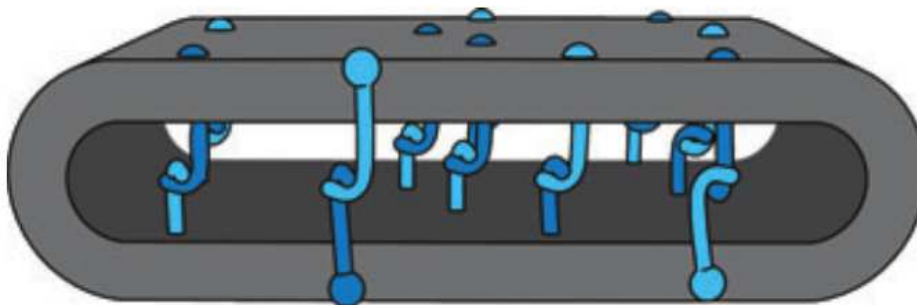
### *V-3-Localisation cellulaire de CLIMP-63*

A l'origine CLIMP-63 est décrite comme une protéine appartenant au compartiment entre le RE et le Golgi, c'est-à-dire au compartiment ERGIC (Schweizer et al., 1990). Les études suivantes montrent que CLIMP-63 est une protéine qui réside principalement dans le RER (Schweizer et al., 1993; Schweizer et al., 1995). CLIMP-63 a plusieurs localisations. Elle est préférentiellement localisée dans le RER péri-nucléaire mais est exclue de la membrane nucléaire (Klopfenstein et al., 1998; Klopfenstein et al., 2001) car elle forme de larges oligomères qui ne peuvent pas diffuser du RER. La localisation de CLIMP-63 dépend à la fois de ses domaines luminal, cytoplasmique et transmembranaire.

CLIMP-63 montre aussi une localisation à la membrane plasmique (Klopfenstein et al., 1998; Klopfenstein et al., 2001). En effet, CLIMP-63 est aussi décrite comme récepteur membranaire pour des ligands extracellulaires, indiquant qu'une sous population de CLIMP-63 peut trafiquer jusqu'à la membrane plasmique et résider à la surface membranaire (Barbier et al., 2012; Kazi et al., 2010; Razzaq et al., 2003; Zacharias et al., 2012). Cette localisation à la membrane plasmique de CLIMP-63 est réalisée via une modification post-traductionnelle. La palmitoylation de CLIMP-63 est nécessaire pour son expression à la surface. La S-palmitoylation est une modification post-traductionnelle, réversible avec l'ajout de 16 acides gras carbonés via des ponts thioester. CLIMP-63 est sous la dépendance d'une famille de protéines, les PAT (Palmitoyl AcylTransférase). Les PAT sont encodées par une famille de gènes *ZDHHC* et caractérisées par un motif DHHC (Asp-His-His-Cys) au sein d'un domaine riche en cystéines (Lobo et al., 2002). La palmitoylation de CLIMP-63 se produit sur son unique cystéine cytoplasmique (résidu Cys100) par DHHC2 (Mundy and Warren, 1992; Schweizer et al., 1990). En présence de siRNAs dirigé contre DHHC2, une partie de la sous population de CLIMP-63 retourne au reticulum (Zhang et al., 2008).

## V-4-Oligomérisation et fonction sur les feuilletts de RE

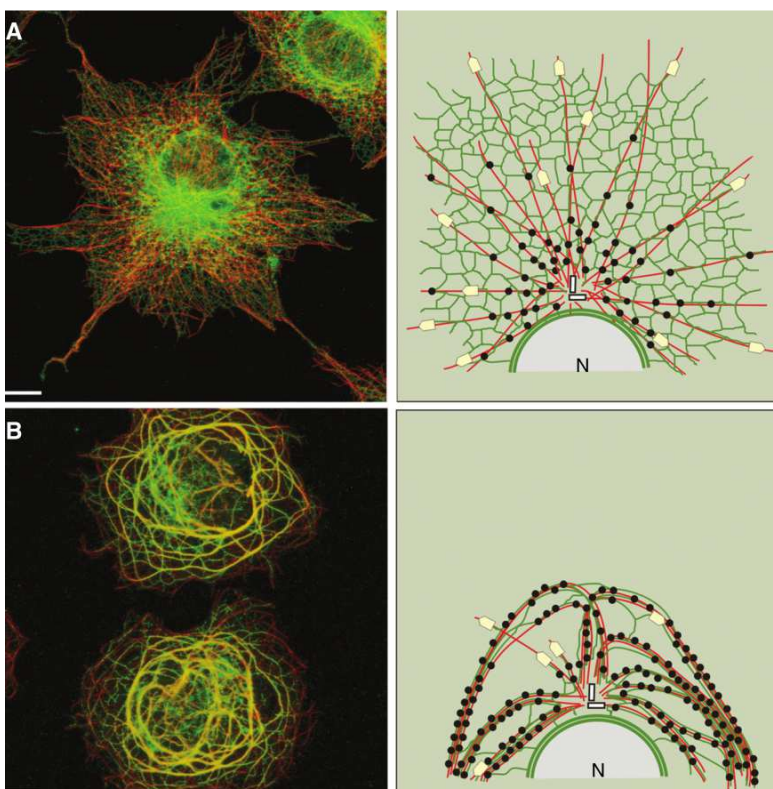
La solubilisation spécifique de CLIMP-63 suggère que cette protéine a la capacité de former des clusters dans le RE et cela via les motifs coiled-coil présent dans son domaine luminal (Klopfenstein et al., 2001). La multimérisation est responsable de la faible mobilité de CLIMP-63 observée en FRAP (Klopfenstein et al., 2001). Par rapport à CLIMP-63 wild type (wt), le mutant de CLIMP-63 dépourvu de son domaine luminal est plus mobile et diffuse davantage vers l'enveloppe nucléaire. Au contraire, le mutant de CLIMP-63 possédant un double domaine luminal diffuse moins bien que CLIMP-63 wt. Les dimères et multimères de CLIMP-63 seraient stabilisés par des interactions électrostatiques (Klopfenstein et al., 2001). Dans les années 2000, l'équipe d'Hauri suggère que les dimères de CLIMP-63 seraient disposés en tête bêche. CLIMP-63 aurait ainsi un rôle d'espaceur pour le RE. Cet arrangement moléculaire permettrait à CLIMP-63 de garder un espace constant entre les deux membranes de reticulum (Figure 42). En effet, l'équipe de Rapoport (2010) a montré qu'en diminuant l'expression protéique spécifique de CLIMP-63, l'espace intraluminal des feuilletts de RE était diminué (Shibata et al., 2010).



**Figure 42 : CLIMP-63 permet l'espacement de la lumière du reticulum.** CLIMP-63 (bleu) se dimérise tête bêche via son domaine C-terminal luminal pour maintenir ainsi la lumière du reticulum. Les membranes de reticulum sont en gris. Schéma de (Shibata et al., 2009).

## V-5-Liaison avec les microtubules et fonction d'ancrage du RE

CLIMP-63 est une MAP (microtubule associated protein). Elle est capable de lier directement les microtubules via son extrémité N-terminale cytoplasmique (Schweizer et al., 1994). La partie cytoplasmique de CLIMP-63 est capable de lier les microtubules et d'augmenter *in vitro* la polymérisation de la tubuline (Klopfenstein et al., 1998). Une séquence minimale nécessaire à sa liaison avec les microtubules a été identifiée, au niveau des résidus 62 à 101 (Klopfenstein et al., 1998). La surexpression de CLIMP-63 induit une déformation du reticulum, sous forme de tubules que l'on nomme 'structures en cheveux' en français ou 'rope-like structure' (RLS) en anglais. Ces RLS s'accompagnent toujours d'une désorganisation du réseau de microtubules. Par des analyses d'immunofluorescence, ce reticulum ainsi déformé s'aligne sur les microtubules (Figure 43) (Klopfenstein et al., 1998; Schweizer et al., 1994; Vedrenne and Hauri, 2006). Il est intéressant de noter que le mutant de CLIMP-63 délété de sa partie cytoplasmique déforme d'une autre manière le RE mais ne désorganise plus le réseau de microtubule (Klopfenstein et al., 1998). Pour résumer, le domaine luminal de CLIMP-63 est responsable des déformations de reticulum lorsque CLIMP-63 est surexprimée, alors que le domaine cytoplasmique lie les microtubules. CLIMP-63 est définie comme une protéine d'ancrage, c'est-à-dire, qu'elle a la capacité d'ancrer le RE sur le réseau de microtubules.



**Figure 43 : Le rôle de CLIMP-63 dans le maintien du RE.** (A) Localisation de CLIMP-63 endogène (vert) et des microtubules (rouge) mise en évidence par immunofluorescence dans des cellules COS-7. Le panel en haut à droite est la représentation schématique de l'image confocale en (A). (B) La surexpression de CLIMP-63 induit des déformations de reticulum, les 'rope-like structures' (RLS). Le panel en bas à droite est la représentation schématique de l'image confocale en (B). Sur les schémas, les protéines CLIMP-63 sont représentées par les points noirs, le RE par les dentelles vertes, les centrioles par les rectangles blancs, les moteurs moléculaires par les rectangles pointus beiges, et N représente le noyau. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. Schéma de (Vedrenne and Hauri, 2006).

Le positionnement du reticulum sur les microtubules est régulé via une modification post-traductionnelle de CLIMP-63. La phosphorylation de CLIMP-63 influence négativement son interaction avec le réseau de microtubules et semble augmenter la dynamique des microtubules (Vedrenne et al., 2005). La phosphorylation sur sérine ou thréonine est une modification post-traductionnelle, réversible avec l'addition d'un groupement phosphate. Il existe 13 sites potentiels de phosphorylation sur sérines dans la partie cytoplasmique de CLIMP-63. Sur ces 13 sérines, quatre seulement sont importantes pour médier l'ancrage du RE sur les microtubules. Les Ser<sup>3</sup>, Ser<sup>19</sup> et Ser<sup>101</sup> sont prédites comme des sites consensus pour la protéine kinase C (PKC) tandis que la Ser<sup>17</sup> est prédite comme un site consensus pour la caséine kinase II (CKII). La phosphorylation constitutive de ces quatre sites ne permet plus à CLIMP-63 de lier les microtubules et conduit à un réarrangement du RE. A l'inverse la non-phosphorylation constitutive de ces quatre sites permet à CLIMP-63 de lier d'avantage les microtubules. Les sites 3, 17 et 19 sont suffisants pour la liaison entre CLIMP-63 et les microtubules (Vedrenne et al., 2005). La phosphorylation de CLIMP-63 dépend du cycle cellulaire. Durant l'interphase, CLIMP-63 ancre une partie du RE aux microtubules. Durant cette phase, CLIMP-63 n'est pas ou est faiblement phosphorylée. Durant la mitose, il y a une augmentation de la phosphorylation des MAP (et notamment de CLIMP-63) conduisant à une abolition de l'interaction entre CLIMP-63 et les microtubules (Vedrenne et al., 2005), les microtubules se réorganisent alors pour la séparation des chromosomes mais le reticulum ne suit plus les microtubules.

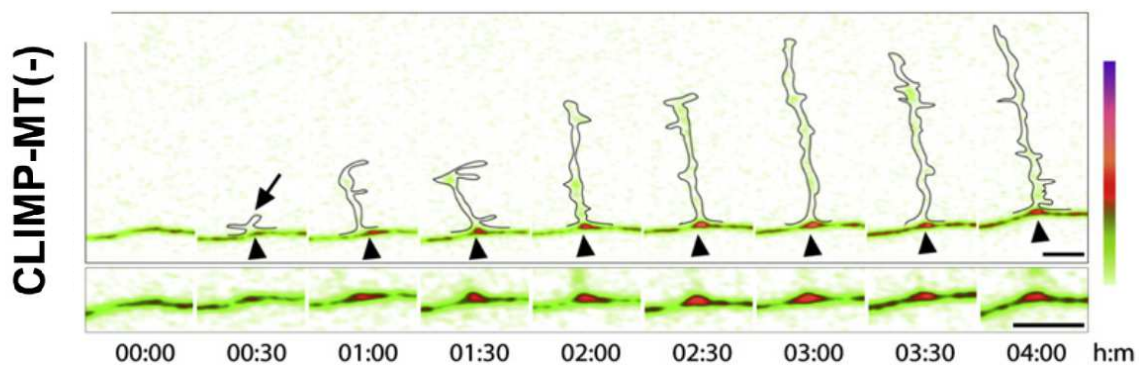
### *V-6-Les maladies liées à CLIMP-63.*

CLIMP-63 est associée à des cancers. La surexpression de CLIMP-63 a été observée dans différents types de carcinome. CLIMP-63 serait capable d'inhiber la croissance et les métastases des carcinomes hépatiques en régulant la voie de signalisation lié à l'EGF (Li et al., 2013). En effet quand CLIMP-63 est à la surface, il jouerait le rôle d'inhibiteur compétitif par rapport au récepteur de l'EGF. L'expression de CLIMP-63 pourrait réduire l'activation du récepteur à l'EGF, tandis que la diminution de l'expression de CLIMP-63 augmente le niveau de phosphorylation du récepteur à l'EGF.



## V-7- CLIMP-63 dans les cellules différenciées.

La plupart des études sur CLIMP-63 ont été réalisées dans des lignées cellulaires et peu d'études ont été faites dans des cellules différenciées. Dans les neurones, CLIMP-63 est décrit comme indispensable pour la morphologie du RE (Cui-Wang et al., 2012). En effet, dans ces cellules, l'état de phosphorylation de CLIMP-63 serait important pour la morphologie du RE dans des zones spécifiques, ce qui affecterait la mobilité des cargos, la régulation des points de branchements des dendrites et la plasticité des récepteur AMPA au niveau synaptique (Figure 44). Dans les neurones, CLIMP-63 serait ainsi important pour la régulation fine de la transmission de l'influx nerveux. Cependant dans d'autres cellules différenciées comme les cellules musculaires, on ne connaît pas la fonction de CLIMP-63. Etant donné le lien entre le réseau de microtubules et le reticulum, CLIMP-63 est peut être un acteur important dans le muscle.



**Figure 44 : La phosphorylation de CLIMP-63 régule les branchements dendritiques dans les neurones.** Le mutant de CLIMP-63 qui est constitutivement phosphorylé (CLIMP-MT(-)) ne peut plus lier les microtubules. Dans des neurones, ce mutant provoque l'accumulation de reticulum au niveau des points de branchements dendritiques. Schéma de (Cui-Wang et al., 2012).



# EXPOSE DES RECHERCHES REALISEES

---

## *OBJECTIFS DE THESE*

‘L’objectif de ma thèse a été d’apporter une contribution au rôle physiologique de la triadine dans le muscle’. Cette phrase fut écrite dans la thèse de Stéphane Vassilopoulos, ancien doctorant au laboratoire. Aujourd’hui mon objectif est encore le même.

Mon travail de thèse se base sur les points suivants. Les souris invalidées pour le gène de la triadine ont des faiblesses cardiaques et musculaires et présentent des défauts morphologiques au niveau des triades avec des triades mal-orientées (Chopra et al., 2009; Oddoux et al., 2009). A partir de ces observations notre hypothèse de travail a été la suivante : Est-ce que la triadine est une protéine importante pour l’architecture des citernes terminales du RS ? Autrement dit, est-ce que la triadine possède des propriétés structurantes sur les membranes du RS ? Pour répondre à ces questions, nous avons décidé d’étudier les propriétés intrinsèques de la triadine en exprimant cette protéine dans des cellules modèles dépourvues de protéines musculaire.

En première partie de ma thèse, j’ai participé à une étude qui portait sur le comportement de Trisk 95, l’isoforme la plus longue des triadines. Nous avons montré que Trisk 95, en association avec les microtubules, peut contribuer à l’organisation des citernes terminales de RS aux triades. L’association de Trisk 95 avec les microtubules est indirecte. Ces données suggèrent qu’il existe au moins un partenaire protéique pouvant faire le lien entre Trisk 95 et les microtubules.

La seconde partie de ma thèse a donc porté sur l’identification et la caractérisation du partenaire protéique de la triadine pouvant faire le lien entre le réseau microtubulaire et le RS. Grâce à la spectrométrie de masse, plusieurs partenaires putatifs ont pu être identifiés. Parmi toutes ces protéines, CLIMP-63 a été sélectionnée puis caractérisée. CLIMP-63 est une protéine ayant la capacité de lier à la fois le reticulum et les microtubules. J’ai donc étudié l’association entre la triadine et CLIMP-63 dans des lignées cellulaires non musculaires puis dans des fibres musculaires.

L'ensemble du travail réalisé au cours de cette thèse a donné lieu à la publication d'un article (Fourest-Lieuvin et al., 2012) et un autre est en préparation (Osseni et al).

# Matériel et Méthodes

---



## *A- Ethique et modèles animaux.*

### *1. Ethique et bonnes pratiques*

Les expériences sur les animaux ont été validées par le comité d'éthique n°4 et suivent les directives nationales et européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Je possède un certificat d'autorisation à expérimenter sur animaux vivants délivré par la direction départementale de la protection des populations (Niveau 1).

### *2. La souris KO-triadine.*

La construction de la souris invalidée pour le gène de la triadine a été réalisée à l'Institut Clinique de la Souris à Strasbourg et la souris KO-triadine a été caractérisée dans le laboratoire d'Isabelle Marty (Oddoux et al., 2009). Dans ce modèle, toutes les isoformes de la triadine ont été invalidées. La souris KO-triadine est viable et fertile mais présente des faiblesses cardiaques et musculaires. Le maintien de la colonie se fait par croisements de souris hétérozygotes (TRIA+/-) ou homozygotes (TRIA-/-). Un génotypage par PCR sur ADN génomique est réalisé sur les nouveaux nés. Pour toutes les expériences, on essaye d'utiliser les souris wt ou KO-triadine d'une même portée.

## B- Les cellules

### 1. Les lignées cellulaires

Pour la réalisation de ma thèse, trois lignées cellulaires ont été utilisées : les cellules COS-7, les cellules HEK293T et des myoblastes humaines immortalisées.

Les cellules COS-7 sont des cellules de rein d'un singe vert d'Afrique '*cercopithecus aethiops*' immortalisées et transformées avec l'antigène SV40 (Gluzman, 1981). Les cellules COS-7 sont utilisées pour l'expression de protéines. Les cellules congelées dans du milieu de congélation composé de 25% de SVF (sérum de veau fœtal, origine south america, réf 10270, Gibco), 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde, réf D2650, Sigma-Aldrich) et de 65% de DMEM 4.5 g/l glucose pyruvate (réf 31966-021, Gibco) sont rapidement décongelées dans un bain marie à 37°C. Après l'ajout d'un à deux ml de milieu de culture (DMEM 4.5 g/l glucose + 10% de SVF + 2% de Penicillin Streptomycin (PS), réf 15140, Gibco), les cellules sont centrifugées 5 min à 1000 rpm. Le culot de cellules est ensuite repris dans 10 ml de milieu de culture et déposé dans une boîte de pétri de 10 cm de diamètre. La boîte est placée dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Le passage des cellules est réalisé au 1/10<sup>ème</sup> deux fois par semaine en utilisant de la trypsine-EDTA (0.05% Trypsine-EDTA, réf 25300, Gibco).

Les cellules HEK293T sont des cellules embryonnaires humaines immortalisées et transformées avec l'antigène SV40. Les cellules HEK293T sont utilisées soit pour la production de lentivirus, soit pour l'expression de protéines au même titre que les cellules COS-7. Dans ce dernier cas les cellules HEK293T sont utilisées dans les mêmes conditions que les cellules COS-7. Pour la production de lentivirus, l'utilisation des cellules HEK293T suit le même protocole que les cellules COS-7 mais avec les modifications suivantes. Deux qualités de sérum ont été utilisés : le SVF USA (qualité supérieure, réf 16000, Gibco) et le SVF south america (qualité normale). La congélation des cellules se fait avec du milieu de congélation (10% de DMSO et 90% de SVF qualité supérieure) et les HEK293T sont cultivées dans un milieu de culture (DMEM 4.5 g/L glucose pyruvate + 10% de SVF qualité supérieure + 1% de PS). Le passage des cellules est réalisé trois fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi) en utilisant de la trypsine-EDTA à 0.01% et après comptage des cellules, 500 000 cellules sontensemencées dans une boîte de 10 cm de diamètre.



Les myoblastes humains immortalisés sont des cellules issues de biopsie qui ont été rendues immortelles par l'équipe de Vincent Mouly à l'Institut de Myologie à Paris par une double transduction par un lentivirus codant pour la télomérase et un lentivirus codant pour Cdk4 (Mamchaoui et al., 2011). L'utilisation de ces cellules suit le même protocole que les cellules COS-7 mais avec les modifications suivantes. Les cellules sont reprises dans du milieu de prolifération (Ham-F10 (réf 41550-088, Gibco) + 20% de SVF qualité supérieure + 1% de PS + 2% d'UltroSer G serum (réf 15950-17, Pall)).

## *2. Les cellules primaires*

Les cellules primaires sont issues de muscle des pattes arrières de souris nouveaux nés âgés d'un ou deux jours. Ces cellules sont produites au laboratoire par Julie Brocard et Muriel Sébastien. Pour obtenir des cellules satellites, les muscles sont prélevés et digérés pendant 30 min à 37°C dans de la trypsine (0.25% Trypsine, réf 25050-014, Gibco) diluée au 1/3 dans du PBS (réf 14190-094, Gibco) supplémentée avec 2% de PS. Une dissociation mécanique permet de libérer les cellules. Après une série de centrifugation à basse vitesse (1500 rpm durant 10 min), le culot est repris dans un faible volume de milieu de prolifération et les cellules sont comptées. Les cellules sont amplifiées quelques jours sur des boîtes de 10 cm de diamètre préalablement coaté avec de la laminine à 10 ng/ $\mu$ l (réf 354232, BD Biosciences) et le milieu est changé tous les deux jours. A 70% de confluence les cellules sont trypsinées, comptées, congelées puis conservées dans de l'azote liquide à -196°C.

## *3. Stockage et congélation des cellules satellites*

Les cellules sont congelées en présence de DMSO après le comptage des cellules vivantes. Toutefois, environ la moitié des cellules ne résistant pas au processus de congélation/décongélation, les cellules sont recomptées après décongélation. Pour la congélation, les cellules sont collectées par une centrifugation de 5 min à 1500 rpm, puis reprises à  $10^6$  cellules/ml dans le milieu de congélation adéquat et réparties dans les cryotubes après une homogénéisation rapide. Ces tubes sont ensuite déposés à -20°C pendant 1 jour puis à -80°C durant 3 jours et sont enfin transférés dans l'azote pour un stockage prolongé.

## 4. Les fibres dissociées

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les FDB (*flexor digitorum brevis*) sont dissociées selon le protocole de S. Pouvreau (Pouvreau et al., 2007) pour obtenir des fibres musculaires dissociées. Le FDB est le premier muscle de la face plantaire du pied de la souris. C'est un muscle en quatre faisceaux qui permet la flexion des phalanges. Sous la loupe binoculaire, les FDB sont disséqués dans du Ringer-Glucose (Glucose 10mM + NaCl 136 mM + KCl 5 mM + CaCl<sub>2</sub> 2 mM + MgCl<sub>2</sub> 1 mM+ Hepes 10mM dans de l'H<sub>2</sub>O). Après avoir retiré le muscle de ses tendons, les FDB subissent une digestion enzymatique par la collagénase (réf C2674, Sigma-Aldrich) à 2 mg/ml durant 60 à 90 min selon le poids de la souris dans un bain marie à 37°C. Les FDB sont ensuite rincés dans un grand volume de Ringer-Glucose quelques dizaine de minutes puis dissociés mécaniquement en douceur par des pipettes en verres rodées. Les FDB sont enfin déposés sur des Ibidi  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> (réf 81156, Biovalley) préalablement coatés par du Matrigel (réf MA 01730, BD Biosciences) pendant 1 h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et puis fixés pendant 20 min dans 4% de PFA (Paraformaldéhyde 16% Solution, réf 15710-S, Electron Microscopy Sciences). Les fibres sont ensuite perméabilisées pendant 45 min avec 1% de Triton X-100 (réf X100, Sigma-Aldrich) dans du PBS à 30°C.

## 5. Culture cellulaire et Transfection

La culture des myoblastes humains ou murins est différente de celle des cellules non musculaires telles que les cellules COS-7 ou HEK293T. Lorsque les myoblastes arrivent à 80-90% de confluence (environ 24 h après l'ensemencement), la différenciation est induite par le changement du milieu. Le milieu de prolifération est ainsi remplacé par du milieu de différenciation (DMEM 1g/l glucose (réf 21885-025, Gibco) + 2% de SC (sérum de cheval, réf 26050-070, Gibco) + 1% de PS). Les jours de différenciation sont comptés à partir de ce changement de milieu. Le milieu est changé tous les deux jours. Les myotubes sont fixés après 3 à 10 jours de différenciation avec 4% de PFA dans du PBS pendant 20 min et perméabilisés avec 1% de Triton X-100 dans du PBS à 30°C pendant 20 min.

Les cellules COS-7 et HEK293T sont transfectées à 50% de confluence en utilisant le polyéthylèneimine (PEI) comme réactif de transfection (ExGen500, réf ET0250, Euromedex), selon le mode d'emploi du fournisseur, à raison de 3 µg d'ADN par boîte de 3,5 cm ou 5 µg d'ADN par boîte de 6 cm de diamètre. Le temps de transfection avant chaque expérience est fixé à 28 h. Les cellules sont ensuite traitées pour réaliser des expériences de blot ou d'immunoprécipitation (IP) ou d'immunofluorescence. Pour les expériences de blot ou d'IP, les cellules sont cultivées dans des plaques de 60 mm de diamètre et sont recueillies par traitement à la trypsine-EDTA. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 min à 1500 rpm, rincées une fois dans 1 à 2 ml de PBS, puis de nouveau centrifugées 5 min à 1500 rpm. Le surnageant est jeté et le culot de cellules est stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules sont cultivées sur des lamelles de 14 mm de diamètre, fixées pendant 6 min dans du méthanol à -20°C et sont conservées dans du PBS jusqu'à leur utilisation.

## *6. L'imagerie calcique sur des cellules en culture*

L'imagerie est réalisée sur des cultures de cellules primaires de souris différenciées. Dans une goutte de 50µl, 50 000 cellules sont déposées au centre d'une boîte de 35mm de diamètre. Elles adhèrent puis les cellules primaires sont différenciées durant plusieurs jours. Le jour de l'imagerie calcique, le milieu de différenciation est retiré et les cellules sont lavées avec du PBS. Les cellules sont ensuite chargées avec une sonde calcique, le Fluo4-AM (réf F-14217, Invitrogen) diluée dans du Krebs. Les cellules sont placées pendant une heure à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS puis sont de nouveau placées dans du milieu de culture pendant 30 min à 37°C. Le milieu est retiré et remplacé par la solution de Krebs. Ensuite, les cellules sont placées sur la platine du microscope confocal et une mise au point est faite. On enregistre ensuite la réponse calcique de ces cellules à un stimulus en remplaçant la solution Krebs par une solution identique suppléée en CMC (4-chloro-m-cresol, Réf 24940, Fluka). La variation d'intensité de fluorescence obtenue correspond à la réponse calcique du stimulus. La quantification est enfin réalisée par un logiciel développé au laboratoire.

## C- Les anticorps, Immunomarquage et microscopie

### 1. Les Anticorps

Les anticorps (Ac) utilisés sont présentés sous forme de deux tableaux comprenant ainsi d'une part les Ac primaire (Tableau M1) et les Ac secondaires (Tableau M2) avec leurs dilutions et leur référence.

Nom	Protéine	Compartiment	Espèce	Dilution		Origine / Référence
				IF	WB	
<b>AEG1 protein LYRIC</b>	protéine LYRIC MTDH gene	RE	Lapin	1/500		Bethyl A303-144A
<b>Actine</b>	Actine	cytosquelette	Souris		1/10000	Millipore MAB1501 clone C4
<b>Calnexine</b>	Calnexine	RE	Lapin	1/500		Stressgen SPA-860
<b>NaK-ATPase <math>\alpha</math>-1</b>	NaKATPase	membrane plasmique	Souris		1/2000	Millipore _05 369_
<b>CKAP4</b>	CLIMP-63	RS	Lapin	1/500	1/10000	Bethyl A302-257A
<b>Climp-63 mAb (G1/296)</b>	CLIMP-63	RE	Souris	1/500	1/5000	EnzoLife ALX-804-604
<b>Erlin-2</b>	Erlin-2	RE ERAD	Lapin	1/500		Epitomics 5780-1
<b>FLAG-M2</b>	Flag		Souris	1/200	1/1000	Sigma F3165
<b>KTN1</b>	Kinectine	RE	Lapin	1/500		Sigma K1644
<b>GFP</b>	GFP		Poulet	1/500	1/5000	Abcam ab13970
<b>GFP</b>	GFP		Souris	1/500		DSHB 12A6
<b>Malectine</b>	Malectine	RE	Lapin	1/500		GeneTex GTX102021
<b>MF20</b>	Myosine MHC	filament épais	Souris	1/500	1/1000	DSHB
<b>NogoA (Nter)</b>	Rtn4/NogoA	RE	Lapin	1/200		Absserotec AHP1799
<b>Cter RyR</b>	RyR	triade	Cobaye	1/200	1/5000	Labo
<b>RyR Pore</b>	RyR	triade	Lapin	1/500	1/10000	Labo
<b>RyR-34C</b>	RyR (ttes isoformes)	triade	Souris	1/500	1/10000	DSHB
<b>Trisk 32 rat</b>	Cter Trisk 32	triade	Cobaye	1/500	1/10000	Labo
<b>Trisk 32 souris</b>	Cter Trisk 32	triade	Lapin	1/500	1/10000	Labo
<b>Trisk 95-BU</b>	Cter Trisk95	triade	Lapin	1/500	1/10000	Labo
<b>Trisk 95 cobaye</b>	Cter Trisk95	triade	Cobaye	1/500	1/10000	Labo
<b>Triadine Nter</b>	Nter triadine (ttes isoformes)	triade	Lapin	1/500	1/10000	Labo
<b>Tub 2.1</b>	$\beta$ -tubuline	cytosquelette	Souris	1/500	1/5000	Sigma T5201
<b>Vimentine</b>	Vimentine	cytosquelette	Souris	1/500		Dako cloneV9

**Tableau M1 : Légendes des Ac primaires :** IF (immunofluorescence), WB (Western blot), RE (reticulum endoplasmique), RS (reticulum sarcoplasmique), ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation)

Cible	Fluorochrome ou peroxidase	Dilution		Origine / Référence	
		IF	WB		
Souris	Alexa 488	1/500		Invitrogen	11029
	Alexa 546	1/500		Invitrogen	21133
	Cy3	1/500		Jackson	115 165 146
	Cy5	1/500		Jackson	715 175 150
	HRP		1/10000	Jackson	115 036 072
	HRP True Blot		1/1000	eBioscience	18-8817
Lapin	Alexa 488	1/500		Invitrogen	11008
	Alexa 546	1/500		Invitrogen	11010
	Cy3	1/400		Jackson	115 165 144
	Cy5	1/500		Jackson	711-175-152
	HRP		1/10000	Jackson	111 035 144
	HRP True Blot		1/1000	eBioscience	18-8816
Cobaye	Alexa 488	1/500		Invitrogen	110074
	Alexa 546	1/500		Mol. Probes	A11074
	Cy3	1/250		Jackson	706-165-148
	Cy5	1/500		Jackson	706-175-148
Poulet	FITC	1/200		Jackson	103-095-155
	HRP		1/10000	Jackson	103-035-155

**Tableau M2 : Légendes des Ac secondaires** : IF (immunofluorescence), WB (Western blot), Cy (cyanine), FITC (Fluorescein isothiocyanate), HRP (horseradish peroxidase).

## 2. Immunomarquage

Après la perméabilisation et pour bloquer les sites de fixations non spécifiques, les cellules et les fibres FDB sont saturées pendant 30 min dans du milieu de saturation qui est composé de PBS supplémenté avec 0,1% de Triton X-100, 0,5% de BSA (bovin serum albumine, réf 001-000-162, Jackson) et 2% de sérum de chèvre. Cependant, de légères différences sont à noter selon le type cellulaire.

Les cellules COS-7 et HEK293T sont d'abord incubées avec les Ac primaires dans du PBS supplémenté avec 0,1% de Tween20 (réf 170-653, Biorad) pendant 1 heure. Les lamelles contenant les cellules sont ensuite rincées dans des bains de PBS avec 0.1% de Tween20. Puis les Ac secondaires dilués dans du PBS avec 0.1% de Tween20, sont incubés pendant une heure. Après les lamelles sont rincées dans des bains de PBS. Enfin, les noyaux sont colorés avec du Hoechst (réf 33258, Life Technologies) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS durant 10 min. Sans rinçage, les lamelles sont directement montées avec quelques gouttes de liquide de montage FluorSave (réf 345789, Calbiochem).

Les myotubes et les fibres dissociées sont incubées à 4°C pendant une nuit avec les Ac primaires dilués dans du tampon de saturation. Les myotubes et les fibres sont rincés très délicatement sur le bord des Ibidi  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> avec du PBS-Triton 0.1%. Après une incubation de 3 heures avec les Ac secondaires fluorescents dilués dans du tampon de saturation, les noyaux sont colorés avec du Hoechst dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS pendant 10 à 15 min. Sans rinçage, une lamelle de 18 mm de diamètre est montée sur une Ibidi avec quelques gouttes du réactif FluorSave.

### *3. La microscopie*

Dans tous les cas, les lames ou Ibidi sèchent à l'abri de la lumière à 4°C et les images sont acquises sur un microscope confocal Zeiss LSM710 ou Leica TCS SPE. Les données générées sont traitées à l'aide des logiciels Adobe Photoshop 7.0 et Illustrator CS4. Les objectifs à immersion utilisés sont sur le Zeiss un X63 et X100 avec une ouverture numérique (N.A) de 1.4 et sur le Leica un X40 (N.A de 1.25) et un X100 (N.A de 1.4).

### *4. Analyse de colocalisation des images d'IF sur des cellules musculaires FDB*

Pour quantifier la colocalisation de CLIMP-63 avec Trisk 95 ou RyR1, ou les microtubules avec RyR1, un masque binaire correspondant au chevauchement entre les marquages vert et rouges a été généré avec une macro ImageJ faite au laboratoire. Ce masque correspond à la surface de colocalisation sur un seul plan confocal. Un rapport a été calculé entre la surface de colocalisation et la surface totale du marquage vert. Les résultats ont été donnés en pourcentage et résultent d'au moins trois expériences indépendantes.

### *5. Les statistiques*

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

## D- Les virus

Deux classes de virus ont été utilisées : les Adeno-Associated Virus (AAV) et les lentivirus.

### *Les adénovirus-associated virus*

Les adénovirus sont des ADN monocaténaire linéaire et non intégratif d'environ 4.7 kb. Le laboratoire a développé antérieurement des adénovirus qui expriment soit Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 ou Trisk 32. Ces virus ont été produits soit au Généthon par Gene Vector Production Network (Evry, France) ou soit par Atlantic Gene Therapies (Nantes, France). Pour toutes ces constructions, l'ADNc est sous le contrôle du promoteur CMV.

### *Les lentivirus*

Les lentivirus sont des ARN monocaténaire linéaire et intégratif d'environ 10 kb. Les lentivirus utilisés ont été produits au laboratoire en binôme avec Julie Brocard ou Muriel Sébastien. Les vecteurs lentiviraux ont été produits dans des cellules HEK293T comme décrit dans la littérature (Bovia et al., 2003; Zufferey et al., 1997) avec les modifications suivantes.

### *1. Clonage des plasmides viraux pour lentivirus*

Les séquences codantes de CLIMP-63 et de ses mutants ont été clonés dans le plasmide pWPXLd (plasmide 12258, Addgene) entre les sites BamHI et Muli. Les séquences CLIMP-63 sont amplifiées par PCR avec des oligonucléotides spécifiques pour ajouter les sites de coupure BamHI et Muli de part et d'autre de la séquence d'intérêt. Une ligation par recombinaison est réalisée (In-Fusion HD EcoDry Cloning Kit, réf 638914, Clontech) permettant de lier les deux ADN grâce à deux amorces spécifiques (Tableau M3).

Orientation de l'amorce	Cible	Séquence de l'amorce
sens	CLIMP-63	5' t taa act acg gga tcc atg ccc tcg gcc aaa caa agg 3'
	CLIMP-63-MT(+)	5' t taa act acg gga tcc atg ccc gct gcc aaa caa agg 3'
	CLIMP-63-MT(-)	5' t taa act acg gga tcc atg ccc gaa gcc aaa caa agg 3'
antisens	tous les CLIMPs	5' t agc gct agg acg cgt gcg acc ttt tcg tga atc ttc tcc 3'

**Tableau M3 : Amorces pour le clonage des plasmides lentiviraux.**

Après transformation de bactéries compétentes (One shot Stbl3 Réf. C7373-03, Invitrogen), les clones positifs sélectionnés par PCR sont vérifiés par séquençage, puis utilisés pour la production de lentivirus. Les plasmides lentiviraux clonés sont pWPXLd-GFP, pWPXLd-GFP-CLIMP-63, pWPXLd-GFP-CLIMP-MT(+) et pWPXLd-GFP-CLIMP-MT(-).

## *2. Production de lentivirus*

Pour réaliser cette étape, l'expérience a été réalisée dans un laboratoire de sécurité microbiologique de niveau P2 dédié à la production de virus. Tout au long de la production, des précautions sont prises pour ne pas être contaminé ou pour ne pas répandre les virus. L'utilisation de virucides et une vigilance constante sont les maîtres mots pour réussir d'efficaces productions virales en toute sécurité.

Au premier jour de production, les cellules HEK293T à 70% de confluence, sont transfectées via le kit de transfection CalPhos™ Mammalian (réf 631312, Clontech, et utilisé selon le protocole du fournisseur) avec trois plasmides viraux : pWPXLd contenant l'insert désiré, psPAX2 (plasmide 12260, Addgene) contenant les gènes gag et pol et pVSV-G (plasmide 14888, Addgene) contenant les gènes de l'enveloppe virale. Au deuxième jour, le milieu de culture est renouvelé. Au troisième jour, le milieu de culture est prélevé et centrifugé 5 min à 2000 rpm pour se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est filtré (à l'aide de filtre de 0.45 µm) puis centrifugé pendant 24 h à 4000 rpm pour culotter les particules virales. Au quatrième jour, le culot est repris pendant une heure dans du milieu de culture (D-MEM 4.5 g/l glucose 10%, SVF Gibco 16000-044, 1% PS) puis il est aliquoté, congelé dans l'azote et conservé à -80°C.



### 3. Titration des vecteurs lentiviraux

Le titre des virus été déterminé comme décrit dans la littérature (Nguyen et al., 2005) avec les modifications suivantes. Les vecteurs lentiviraux produits possédant une protéine de fusion codant pour la GFP sont titrés par cytométrie en flux. Dans chaque puits d'une plaque 6 puits, 200 000 cellules HEK293T sontensemencées avec 2 ml de milieu de culture. Un jour plus tard, les cellules d'un puit sont comptées et une gamme de particules virales est déposée sur les 5 autres puits. Quatre jours plus tard, les cellules sont trypsinées et fixées à la PFA 4% pendant 15 minutes. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est mesuré par cytométrie en flux et calculé suivant la formule :

$$\text{Titre} = \text{nombre de cellule à 2 Jours} \times \text{facteur de dilution} \times \left( \frac{\% \text{ de cellules GFP positives}}{100} \right) \times \frac{(\mu\text{l de milieu})}{(\mu\text{l de virus})} = \frac{\text{UI}}{\text{ml}}$$

UI : Unités Infectieuses

La gamme de titration est d'environ  $1 \times 10^7$  à  $10^8$  d'unités infectieuses/ml pour l'ensemble des constructions virales construites.

### 4. Infection des cellules en cultures

Un certain nombre de cellules peuvent être infectés par des virus. Les virus préalablement dilués dans du milieu de culture adéquate sont mis en contact avec des cellules adhérentes. La dilution des virus a été réalisée selon le MOI (Multiplicity of infection) souhaité. Le MOI représente le nombre de particules virales théorique par cellule. Les cellules infectées par les virus sont incubées pendant au minimum pendant 48 h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé au bout de 6 à 8 h puis toutes les 48 h.

## *E- La biochimie*

### *1. Lyse des cellules en culture*

Pour la lyse cellulaire, les cellules sont resuspendues sur glace dans 150 à 500  $\mu$ l (selon la taille du culot cellulaire) de tampon hypotonique à 4°C (NaCl 15 mM et EDTA 1mM) en présence d'inhibiteur de protéase : PMSF à 400  $\mu$ M (fluorure de phénylméthanesulfonyle, réf 78830, Sigma-Aldrich) + DFP à 100  $\mu$ M (diisopropyl fluorophosphate, réf D0879 Sigma-Aldrich). Les cellules resuspendues sont soniquées sur glace 10 fois pendant 1 sec à 20 % de la puissance maximale. Les cellules ont ensuite été solubilisées pendant 45 min à 4°C dans un tampon composé en concentrations finales 0,9 M de NaCl, 1,6% de CHAPS, 0,1% de phospholipides (réf 840051P, Avanti Polar Lipids), 20 mM de Pipes pH 7,1, supplémenté d'inhibiteurs de protéases (PMSF à 400  $\mu$ M + DFP à 100  $\mu$ M). Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 14000 rpm à 4°C pour se débarrasser des noyaux et des débris cellulaires. Le lysat est enfin dosé par la méthode de Folin Lowry et conservé dans de l'azote ou à -20°C.

### *2. Préparation d'homogénat et de microsomes de muscle squelettique*

Après le sacrifice d'une souris, les muscles du train arrière des souris sont prélevés. Sauf indications contraires, l'homogénat est préparé à partir de quadriceps pour avoir des quantités importantes de muscle. Les muscles sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Le muscle congelé est découpé le plus petit possible avec une lame de scalpel. Le muscle découpé est ensuite immergé dans un tampon de broyage (sucrose 200 mM, Hepes 20 mM pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 0.4 mM) préalablement et extemporanément supplémenté d'inhibiteurs de protéases (PMSF à 400  $\mu$ M + DFP à 100  $\mu$ M). Dans un potter de Thomas, 800 mg de muscle sont broyés dans 30 ml final de tampon de broyage dans de la glace. Une première centrifugation de 10 min à 1500 rpm à 4°C est ensuite réalisée. Le culot contient tous les noyaux et débris cellulaires alors que le surnageant contient les protéines d'intérêts et compose l'homogénat. Pour obtenir des fractions microsomales, le surnageant est centrifugé pendant 50 min à 41000 rpm à 4°C. Cette fois ci, le culot est repris dans 300  $\mu$ l de tampon pour microsomes (NaCl 0.1 M, imidazole 30 mM pH 6.8, sucrose 8%) extemporanément supplémenté d'inhibiteurs de protéases (PMSF à 400  $\mu$ M + DFP à 100  $\mu$ M).

Les microsomes sont enfin homogénéisés avec un piston lisse, dosés et conservé à -20°C ou dans de l'azote liquide.

### *3. Dosage des protéines : méthode de Folin Lowry*

Les échantillons protéiques sont dosés par rapport une gamme BSA allant de 0 à 80 µg. Dans un tube à hémolyse, successivement y sont ajouté 3 à 5 µl de lysat, puis 10 µl de SDS 20% (réf L3771, Sigma-Aldrich) puis 2,5 ml d'un mélange à volume égal composé de d'EDTA-Cu<sup>2+</sup> à 0.005% et de NaCO<sub>3</sub> à 4% + NaOH à 0.2 mM. Le tube à hémolyse est ensuite vortexé et 5% de réactif de Folin (réf F9252, Sigma- Aldrich) est ajouté durant l'agitation. Les échantillons sont placés dans l'obscurité pendant 45min. Le dosage protéique (absorbance à 660 nm) est calculé en fonction de la gamme BSA.

### *4. Essai de co-sédimentation avec les microtubules*

Pour examiner l'interaction Trisk 95-microtubules, les cellules HEK 293T transfectées avec Trisk 95 ou un des mutants de Trisk 95, sont rincées dans du PBS, décollées par pipetages vigoureux dans 3 ml de PBS supplémenté d'EDTA 2 mM, centrifugées à 180 g pendant 5 min et lavées une fois dans 5 ml de tampon PEM (PIPES 100 mM pH 6.8, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM). Les cellules sont ensuite lysées pendant 15 min à 4°C dans du tampon OPT (PIPES 80 mM pH 6.7, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Triton X-100 0.5%) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (PMSF et DFP). Après trois passages dans une aiguille de 29-gauges, les échantillons sont centrifugés 10 min à 4°C à 20000 rpm. Le surnageant collecté (fraction 'L' ou 'Lysat') est incubé pendant 45 min à 37°C après addition de 40 µM de Taxol (réf T7191, Sigma-Aldrich), 1 mM de GTP (G8877, Sigma-Aldrich), 5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 10 µM de tubuline purifiée (don équipe A.Andrieux GIN). Cette étape permet la polymérisation des microtubules dans l'extrait cellulaire. L'échantillon est ensuite déposé sur 500 µl d'un coussin de PEM-60% glycérol et ultracentrifugé à 100 000 g pendant 40 min à 20°C. Après ultracentrifugation, le haut du coussin (200 µl) contenant la tubuline non polymérisée et les protéines non associées aux microtubules, est prélevé (fraction 'S' ou 'Surng.'). Le reste du coussin est jeté et le culot est lavé une fois avec 500 µl de tampon PEM à 30°C avant d'être incubé pendant 15 min à 4°C dans 200 µl de tampon de dépolymérisation des microtubules (CaCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 50 mM dans du PEM).

Afin de séparer la fraction microtubulaire vraie (fraction 'MTs', contenant microtubules dépolymérisés et les protéines associées), des agrégats non spécifiques (fraction 'Agr' ou 'Agrèg.'), une deuxième ultracentrifugation à 100000 g pendant 20 min à 4°C est réalisée. Le surnageant est la fraction 'MTs', le culot est la fraction 'Agrèg.'

## *5. Immunoprécipitation (IP)*

Pour chaque IP, 500 µg de protéines sont solubilisés à 2 mg/ml dans du tampon de solubilisation (0,9 M de NaCl, 1,6% de CHAPS, 0,1% de phospholipides (Avanti Polar Lipids), 20 mM Pipes pH 7,1, supplémenté de 400 µM de PMSF). Après 45 min de solubilisation sur glace, une centrifugation est réalisée à 4°C pendant 10 min à 14000 rpm. Une dilution au 1/3 avec du PBS et de l'eau en quantités égales est réalisé. On utilise les billes Dynabeads protéine G (réf 10004D, Life Technologies) selon le mode d'emploi du fournisseur à raison de 50 µl de billes Dynabeads et 10 µl d'anticorps ou de sérum pré-immun par conditions. Après 2 h d'incubation sur roue entre les billes Dynabeads et les Ac, les microsomes sont ajoutés. L'incubation du trio billes/Ac/microsomes dure sur la nuit à 4°C sur roue. Le lendemain, les billes sont lavées dans un tampon de lavage composé de 10 mM de TrisHCl à pH 7.5, 0.5 mM d'EDTA et 150 mM de NaCl supplémenté de 400 µM de PMSF. Ensuite pour l'élution, les billes sont incubées dans 100 µl de tampon de Laemli 1x final (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2 %, Glycérol 10 %, 2-mercaptoéthanol 5%, bleu de Bromophénol 0.005 %) pour décrocher les protéines des anticorps et les anticorps des billes. Les protéines sont dénaturées pendant 5 min à 100°C puis sont récupérés en utilisant le portoir aimanté. Dans les 100 µl d'éluat, la présence des protéines immunoprécipitées et co-immunoprécipitées est recherchée par Western blot.

Toutes les constructions triadine ou CLIMP-63 fusionnées avec la GFP ont été immunoprécipitées en utilisant le kit GFP-Trap (réf gta-20, Chromotek), selon le protocole du fabricant. Le principe de l'immunoprécipitation est identique à celui des billes Dynabeads avec les modifications suivantes. Une pré-incubation avec des billes 'Blocked agarose beads' (réf bab-20, Chromotek) est réalisée pendant 30 min pour éliminer le signal non spécifique. L'incubation des billes se fait à raison de 25 µl de billes GFP-Trap pendant 30 min. Au cours de l'élution, le décrochage se fait dans un tampon Laemli 2x final (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4 %, Glycérol 20 %, 2-mercaptoéthanol 10 %, bleu de Bromophénol 0.005 %) et les protéines sont dénaturées 10 min à 100°C.

## *6. SDS-PAGE et Western Blot (WB)*

Les échantillons protéiques sont additionnés de tampon Laemli 4x final (Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 8 %, Glycérol 40 %, 2-mercaptoéthanol 20 %, bleu de Bromophénol 0.005 %). Les protéines sont ensuite séparées par migration à 50 mA dans un gel gradient 5-15% d'acrylamide immergé dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1%). Les protéines sont transférées sur une membrane d'Immobilon P (réf IPVH00010, Millipore) dans du tampon de transfert (éthanol 10%, Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.025%) à 500 ou 800 mA pendant 90 à 240 min selon la taille de protéine (plus la protéine est grande plus l'ampérage et le temps seront augmentés). Les membranes sont saturées 30 min dans du tampon de saturation pour blot qui contient 0.3% de Tween20 dans du PBS supplémenté avec 4% de lait (Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk, réf 1706404XTU, BioRad). Les membranes sont mises à incuber avec les Ac primaires dilués dans du tampon de saturation sur roue pendant une nuit à 4°C. Après deux lavages de 10 min dans du PBS avec 0.3% de Tween20, les membranes sont incubées avec les Ac secondaires couplés à la peroxydase pendant 2 h sur roue. Après trois lavages de 10 min dans du PBS-Tween20 0.3%, la révélation est faite avec un substrat chemiluminescent de la peroxydase Pierce ECL (réf 32140, Thermo) ou super pico ECL (réf 34077, Thermo) selon le protocole du fournisseur. La révélation est acquise sur un Chemidoc XRS. Les données générées sont traitées à l'aide du logiciel Quantity One v4.6.6.

Pour réaliser un Western blot sans bande contaminante après une immunoprécipitation, l'utilisation d'anticorps secondaires HRP-True Blot (cf tableau Ac secondaires) est indispensable. En effet ces anticorps ne reconnaissent pas les anticorps dénaturés, c'est-à-dire les anticorps utilisés pour les immunoprécipitations au cours de l'éluion. Les anticorps HRP-True Blot reconnaissent seulement en effet les anticorps primaires utilisés pour le Western blot.

## *F- La protéomique*

L'analyse de spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec la plateforme EDyP du CEA de Grenoble dirigée par Yohann Couté. Chaque échantillon (IP Trisk 95-GFP et IP GFP) a subi une digestion tryptique. Les peptides ont été analysés par nanoLC-MS/MS (chromatographie liquide à nano débit couplée à deux spectromètres de masse en tandem), suivie de l'utilisation d'un moteur de recherche (Mascot) pour identifier les différentes protéines et de la validation du répertoire protéique obtenu par IRMa (Interprétation des Résultats Mascot). Le 'spectral count' correspond au nombre de peptides identifiés. Une protéine est considérée comme un partenaire potentiel si elle a été identifiée avec un score 'spectral count' supérieur à 10 ou si son score 'spectral count' est enrichi au moins 3 fois dans l'échantillon IP Trisk 95-GFP par rapport à l'échantillon IP GFP.

## F- La biologie moléculaire

### 1. Les constructions triadines

Toutes les isoformes de la triadine de rat ont été clonées au laboratoire (Marty et al., 2000; Vassilopoulos et al., 2005). Trisk 95 (numéro d'accès # AJ243304), Trisk 51 (# AJ243303), Trisk 49 (#AJ812275), Trisk 32 (# AJ812276) et plusieurs mutants de Trisk 95 sont insérés dans les vecteurs d'expression pcDNA3.1 (réf V790-20, Life Technologies) ou pEGFP-N1 (réf 6085-1, Clontech) et ont déjà été décrits (Fourest-Lieuvain et al., 2012; Marty et al., 2000; Vassilopoulos et al., 2005).

### 2. La construction T95-mini-GFP

Pour construire T95-mini-GFP, le codon stop de T95-mini dans pcDNA3.1 a été éliminé par l'insertion des amorces de PCR (Tableau M4). La séquence amplifiée a été insérée dans pEGFP-N1.

Orientation de l'amorce	Cible	Séquence de l'amorce
sens	T95-mini-GFP	5' c tca agc ttc gaattcatg act gag atc aca gct gaa gga a 3'
antisens	T95-mini-GFP	5' c atg gtg gcg acc ggt aga tca gat agc aaa gag aag aag cg 3'

Tableau M4 : Amorces pour le clonage de T95-mini dans pcDNA3.1.

### 3. La construction T95-lumen

Pour la construction de T95-lumen, le plasmide DsRed2-ER (réf 632409, Clontech) a été digéré par les enzymes Agel et BglII pour éliminer la séquence DsRed2. Le domaine luminal de Trisk 95 qui s'étend des acides aminés de 113 à 687 (T95-luminal), a été amplifié par PCR via les amorces dans le tableau M5 ci-dessous. Les séquences Flag et KDEL ont été insérées à la fin du fragment de PCR, qui a ensuite été inséré dans le plasmide digéré par le couple d'enzymes Agel/BglII. La partie codante de cette construction est ainsi composée de la séquence calreticuline, du domaine luminal de Trisk 95, de la séquence Flag et de la séquence KDEL. Cette construction est ciblée dans la lumière du RE.

Orientation de l'amorce	Cible	Séquence de l'amorce
sens	T95-lumen	5' gac cgg tcg atc atc tca tct gat ggt gat gaa gat gat 3'
antisens	T95-lumen	5' teg aga tct tta cag etc gtc ctt ctt gtc atc gtc gtc ctt gta gtc ttg ttc ttg ctg ctt ctg tcc tgg 3'

Tableau M5 : Amorces pour le clonage de T95-lumen dans DsRed2-ER.

#### 4. Les constructions CLIMP-63 et siRNAs

Pour construire CLIMP- $\Delta$ lumen, le plasmide pEGFP-N1 a été digéré par les enzymes BglII et AgeI. Le domaine luminal de CLIMP-63 qui s'étend des acides aminés de 1 à 126 (CLIMP- $\Delta$ lumen), a été amplifié par PCR via les amorces dans le tableau M6 ci-dessous.

Orientation de l'amorce	Cible	Séquence de l'amorce
sens	CLIMP- $\Delta$ lumen	5' t tca gat ctc atg ccc tgc gcc aaa caa agg ggc 3'
antisens	CLIMP- $\Delta$ lumen	5' tac cgg tgc ctg gac ctc ctc cag gac gtg gtg 3'

Tableau M6 : Amorces pour le clonage de CLIMP- $\Delta$ lumen dans pEGFP-N1.

Les plasmides CLMIP-63 ont été aimablement fournis par Hesso Farhan et Hans-Peter Hauri (Klopfenstein et al., 2001; Vedrenne et al., 2005). Les siRNA dirigés contre CLIMP-63 dans les cellules COS-7, ont été conçues selon (Nikonov et al., 2007). La seule différence, c'est que les siRNA ont été basées sur la séquence humaine de CLIMP-63 (Tableau M7).

Cible	Séquence du siRNA
siRNA 1	5' cca gaa uga gau ucu caa att 3'
siRNA 2	5' cca aau cca uca acg aca att 3'

Tableau M7 : Séquences des siRNA dirigés contre CLIMP-63.

Les siRNA scramble (Sc) ont été obtenu à partir de la séquence nucléotidique de siRNA 1 mais les nucléotides sont alignés dans le désordre. Les siRNA 1, 2 et scramble ont été synthétisés par Invitrogen.



# Résultats

---



## Chapitre 1 :

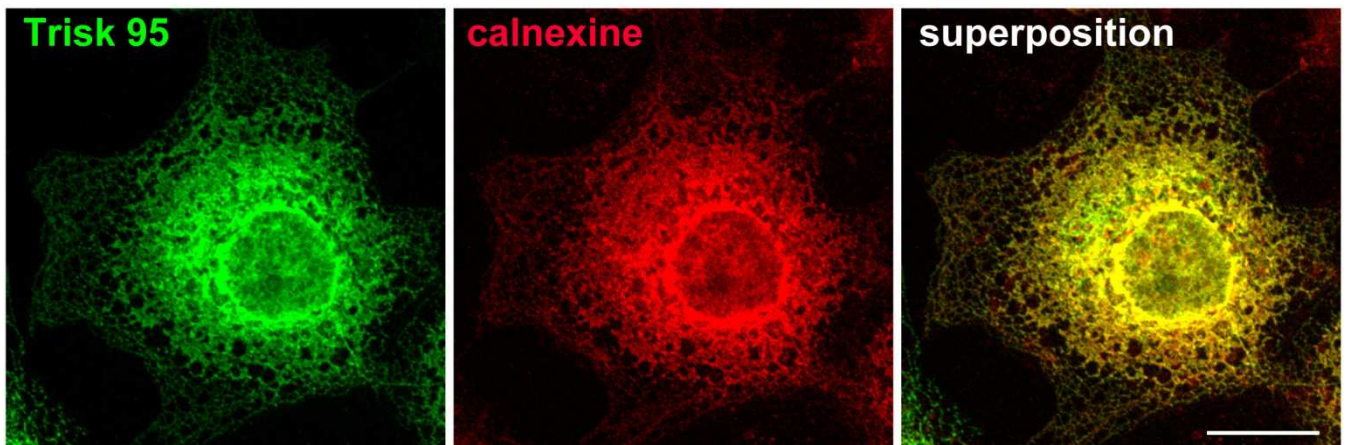
Le rôle de la triadine dans  
l'organisation de la membrane du  
reticulum à la triade.

---



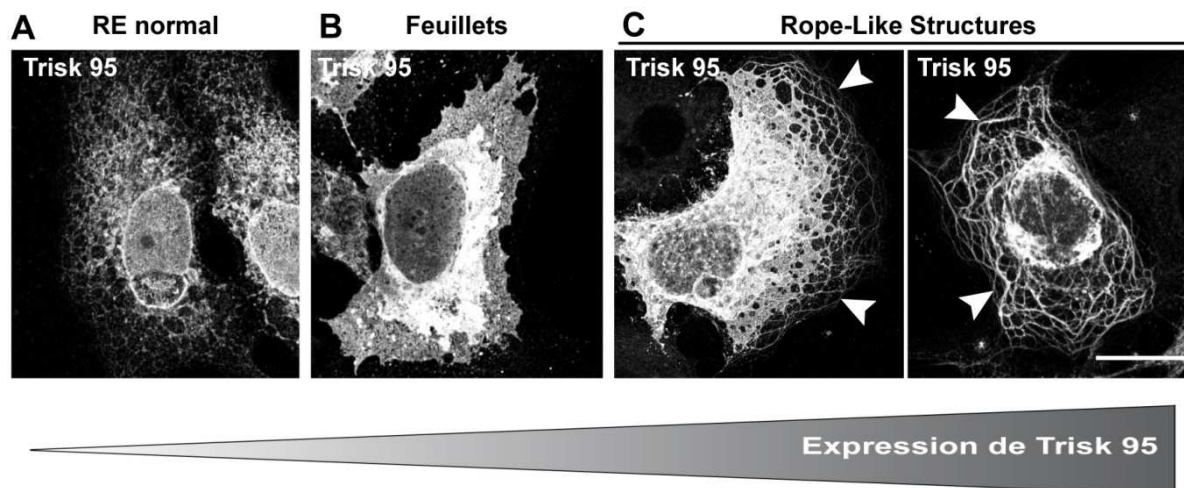
## A) L'expression de Trisk 95 dans des cellules COS-7 induit des déformations du RE.

Pour étudier les propriétés intrinsèques de la triadine, Trisk 95 a été exprimée dans les cellules COS-7. Nous avons choisi l'isoforme Trisk 95 car étant l'isoforme la plus longue, elle possède tous les domaines potentiellement importants pour ses fonctions. Les cellules COS-7 sont largement utilisées par la communauté scientifique pour l'étude de son reticulum endoplasmique plat et étalé, idéal pour l'imagerie confocale. Trisk 95 exprimée dans ces cellules se localise dans le reticulum (Figure R1), elle est en effet colocalisée avec la calnexine qui est un marqueur de RE. C'est ce qui était attendu car Trisk 95 est décrite dans le muscle comme une protéine transmembranaire de la membrane du RS.



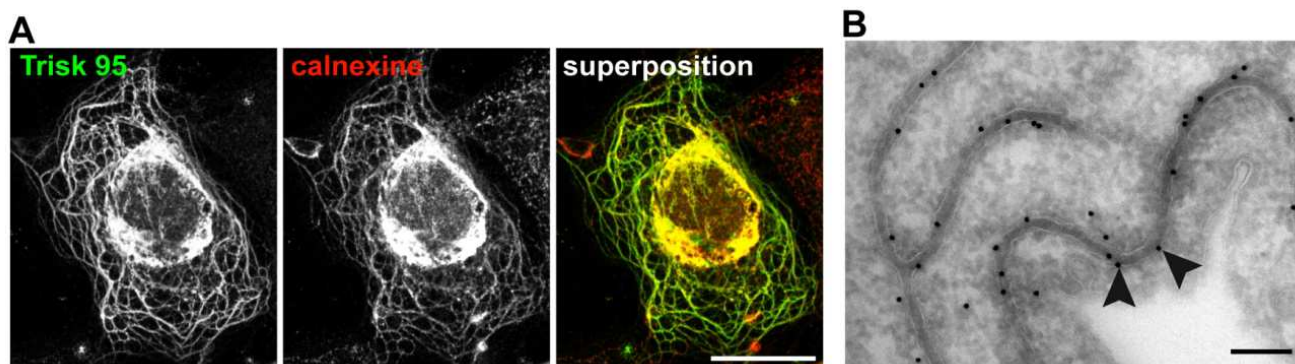
**Figure R1 : Trisk 95 est localisée dans le RE dans les cellules COS-7.** Après transfection de Trisk 95 dans les cellules COS-7, la localisation de Trisk 95 (vert) et de la calnexine (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. La superposition des deux marquages indique que Trisk 95 se trouve dans le même compartiment que la calnexine, dans le RE. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

Cependant, en fonction de la quantité de protéine exprimée, les cellules présentent trois phénotypes différents. A faible taux d'expression, le reticulum apparait normal, avec des feuilletts péri-nucléaires et des dentelles à la périphérie de la cellule (phénotype en dentelles) (Figure R2A). A plus fort taux d'expression de Trisk 95, les feuilletts envahissent la cellule (Figure R2B) puis il y a apparition de structures tubulaires 'en cheveux', ou 'rope-like structures' (RLS) (Figure R2C, têtes de flèches) en anglais, en périphérie des feuilletts ou dans toute la cellule. Le niveau d'expression de Trisk 95 a été quantifié en fonction de l'intensité moyenne de fluorescence pour les cellules présentant chaque pattern (données non montrées).



**Figure R2 : Trisk 95 induit des déformations du RE.** Après transfection de Trisk 95 dans les cellules COS-7, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-Trisk 95. Trois patterns de RE sont observés selon le niveau d'expression de Trisk 95 : (A) un RE normal, (B) un RE déformé sous forme de feuillets, (C) un RE déformé sous forme de structures tubulaires ou 'rope-like structures' (RLS). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

Ces RLS sont bien des malformations du reticulum. En effet la calnexine colocalise avec Trisk 95 dans ces RLS (Figure R3A). Une étude réalisée en microscopie électronique à transmission a montré sur ces cellules exprimant Trisk 95-GFP que le diamètre des tubules de reticulum était réduit par rapport aux tubules de RE observés dans les cellules non transfectées (Figure R3B). Ainsi dans les cellules COS-7, la surexpression et l'accumulation de Trisk 95 dans le RE peuvent induire des déformations du reticulum.



**Figure R3 : Les RLS induits par Trisk 95 sont des compartiments du RE.** (A) Après transfection de Trisk 95 dans les cellules COS-7, la localisation de Trisk 95 (vert) et de la calnexine (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. La superposition des deux marquages indique que les RLS induits par Trisk 95 font bien partie du RE. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (B) Image de microscopie électronique dans les cellules COS-7 exprimant Trisk 95-GFP et marquée par des billes d'or. Des tubules membranaires étroits et réguliers ( $39,4 \pm 0,27$  nm) sont marqués avec des billes d'or (têtes de flèches). Barre d'échelle : 200 nm.

À noter que l'addition de la GFP en position C-terminale de Trisk 95, ne modifie pas les propriétés structurantes de Trisk 95 sur le reticulum (voir ci-dessous Figure R6 et R7).

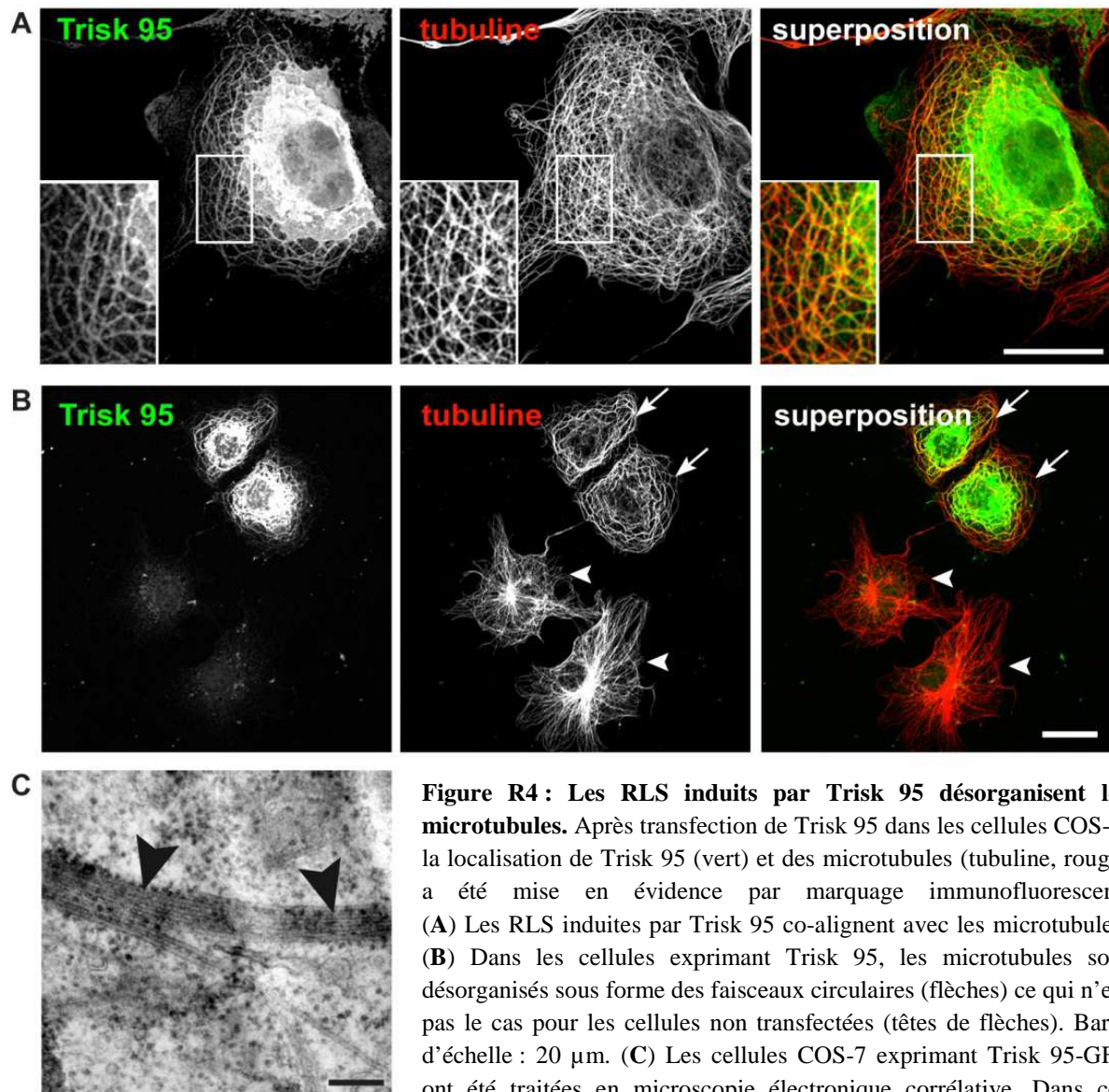
Ces données montrent que l'accumulation de Trisk 95 dans le reticulum de cellules non musculaires provoque des modifications drastiques sur les membranes. Ce type de déformation n'est pas simplement dû à un artefact de surexpression. En effet la surexpression d'autres protéines comme le RyR1 n'induit pas ce type de modification (données non montrées). En revanche le phénotype RLS a déjà été décrit pour quelques protéines déjà connues pour réguler la morphologie du RE. En effet, la surexpression de protéines telles que REEP1, Rtn4/Nogo ou encore CLIMP-63, peuvent déformer le reticulum (Klopfenstein et al., 1998; Park et al., 2010; Voeltz et al., 2006).

## *B) La déformation du RE par Trisk 95 est accompagnée d'une désorganisation du réseau de microtubules.*

La plupart des protéines déjà connues pour modifier le RE sont aussi décrites comme des protéines d'ancrage, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité d'ancrer et de structurer le reticulum sur le cytosquelette de microtubules (Vedrenne and Hauri, 2006). En effet, la déformation du RE induite par ces protéines d'ancrages quand elles sont surexprimées est toujours accompagnée d'une désorganisation du réseau de microtubules.

Nous avons donc voulu savoir si les RLS induites par Trisk 95 sont accompagnées par une désorganisation du réseau microtubulaire. Trisk 95 exprimée dans cellules COS-7 a été marquée avec un anticorps anti-Trisk 95 (en vert Figure R4A). Un co-marquage des microtubules a été réalisé avec un anticorps anti-tubuline (en rouge Figure R4A). Dans les cellules non transfectées, les microtubules présentent une organisation tout à fait normale, radiale à partir d'un centrosome (Figure R4B pointes de flèches). Au contraire dans les cellules transfectées par Trisk 95, les RLS induites par Trisk 95 co-alignent avec les microtubules qui sont complètement désorganisés sous forme des faisceaux circulaires (Figure R4B flèches).

L'utilisation de la microscopie électronique à transmission montre que les microtubules sont effectivement associés en faisceaux (Figure R4C, têtes de flèches).

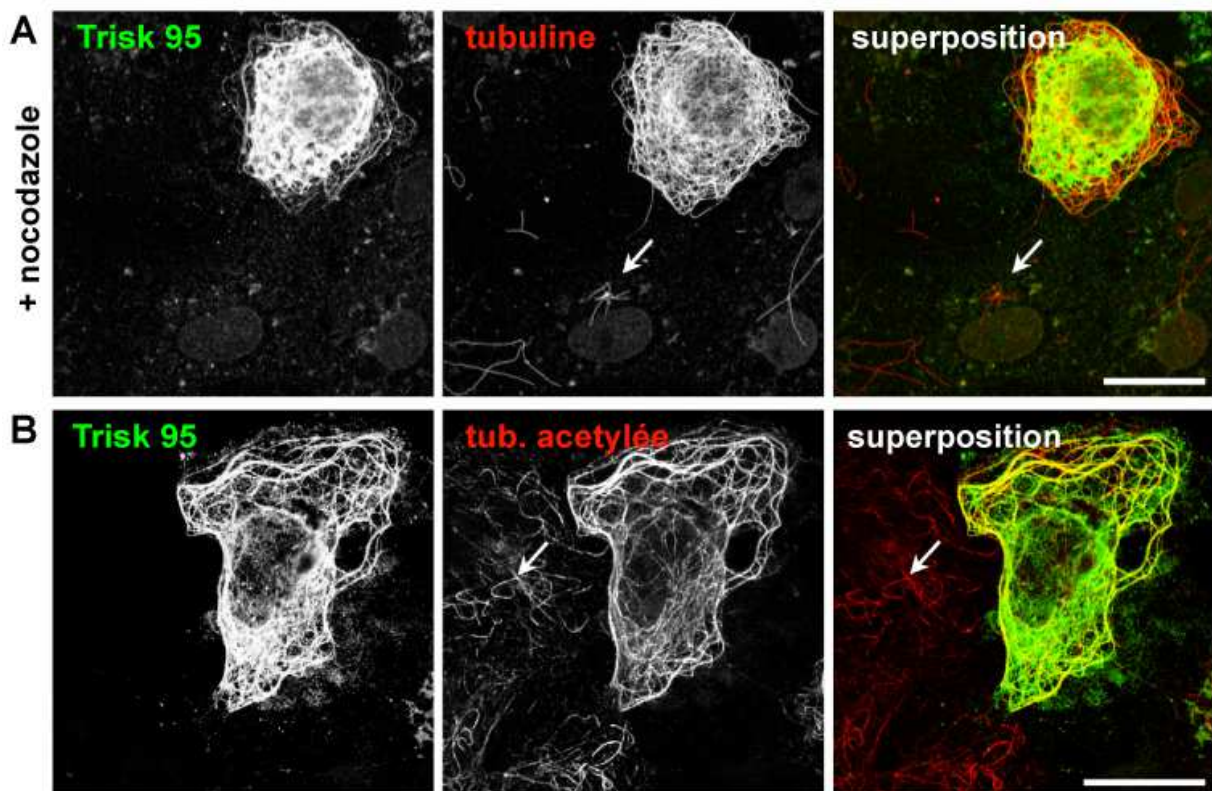


**Figure R4 : Les RLS induits par Trisk 95 désorganisent les microtubules.** Après transfection de Trisk 95 dans les cellules COS-7, la localisation de Trisk 95 (vert) et des microtubules (tubuline, rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. (A) Les RLS induites par Trisk 95 co-alignent avec les microtubules. (B) Dans les cellules exprimant Trisk 95, les microtubules sont désorganisés sous forme de faisceaux circulaires (flèches) ce qui n'est pas le cas pour les cellules non transfectées (têtes de flèches). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (C) Les cellules COS-7 exprimant Trisk 95-GFP ont été traitées en microscopie électronique corrélative. Dans ces cellules, les microtubules sont souvent en faisceaux (têtes de flèches). Barre d'échelle : 200 nm.

Ces données montrent que la déformation du RE induite par Trisk 95 semble bien être accompagnée d'une désorganisation du réseau de microtubules comme décrite pour les protéines d'ancrage.



Généralement l'organisation en faisceaux des microtubules est associée à une modification de leur dynamique, c'est donc ce que nous avons testé. D'une part, l'effet d'une drogue dépolymérisante (le nocodazole) sur un temps court, a permis d'évaluer la susceptibilité des microtubules à se dépolymériser. D'autre part, un anticorps anti-tubuline acétylée a été utilisé comme indicateur de la stabilité des microtubules. Dans les cellules non transfectées, les microtubules ne résistent pas au traitement par le nocodazole (Figure R5A flèche) et sont très peu acétylés (Figure R5B flèche). Au contraire, dans les cellules transfectées avec Trisk 95 et présentant des RLS, les microtubules sont beaucoup moins sensibles au nocodazole et sont beaucoup plus acétylés donc beaucoup plus stables (Figure R5A et R5B).

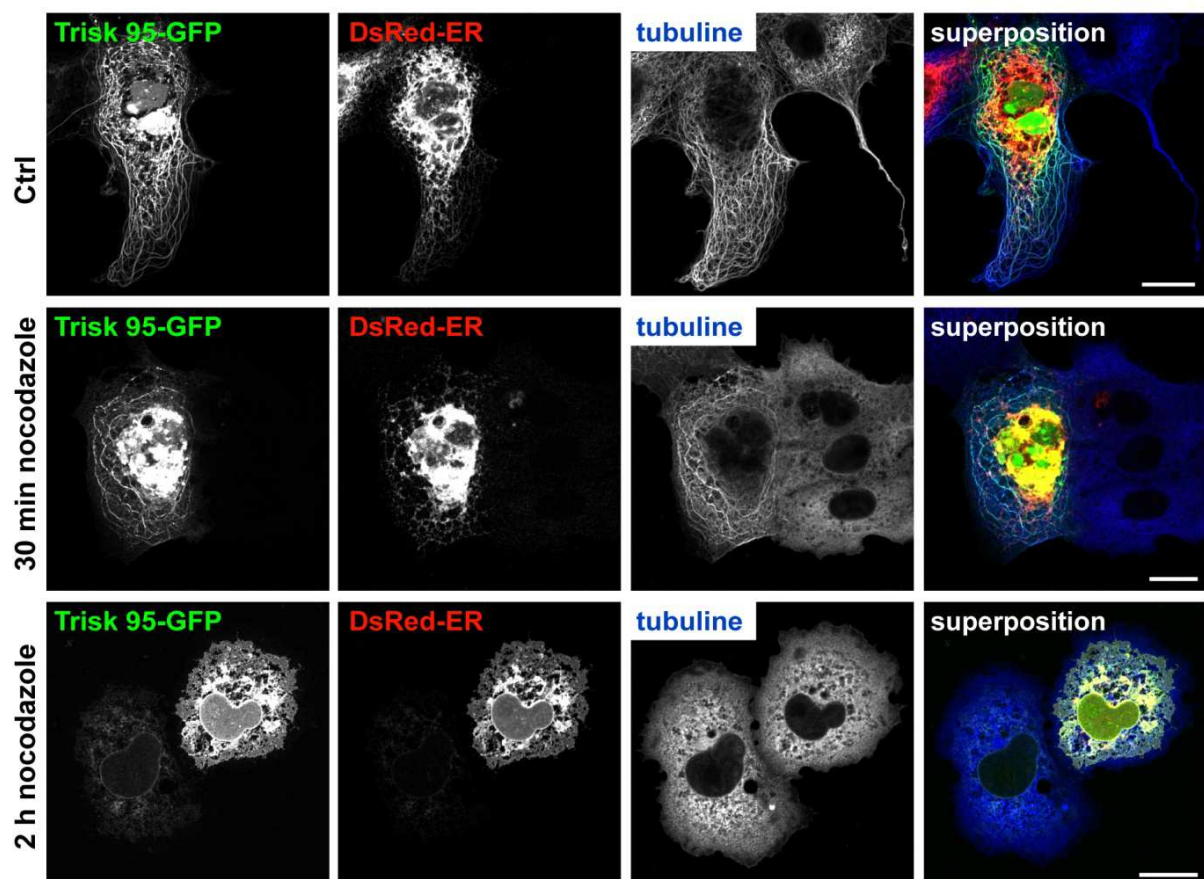


**Figure R5 : Les RLS induits par Trisk 95 stabilisent le réseau de microtubules.** Après transfection de Trisk 95 dans les cellules COS-7, la localisation de Trisk 95 (vert) et des microtubules (tubuline ou tubuline acétylée, rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. **(A)** Les cellules ont été traitées avec du nocodazole puis lysées pour enlever la tubuline dépolymérisée. Dans les cellules exprimant Trisk 95, les microtubules résistent au traitement nocodazole tandis que dans les cellules non transfectées, peu de microtubules restent (flèche). **(B)** Dans les cellules non transfectées, peu de microtubules sont acétylés (flèche). Au contraire, les cellules exprimant Trisk 95 présentent une acétylation massive des microtubules. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

L'ensemble de ces données montrent que les RLS induits par Trisk 95 dans les cellules COS-7 modifient l'organisation et la dynamique du réseau de microtubules.

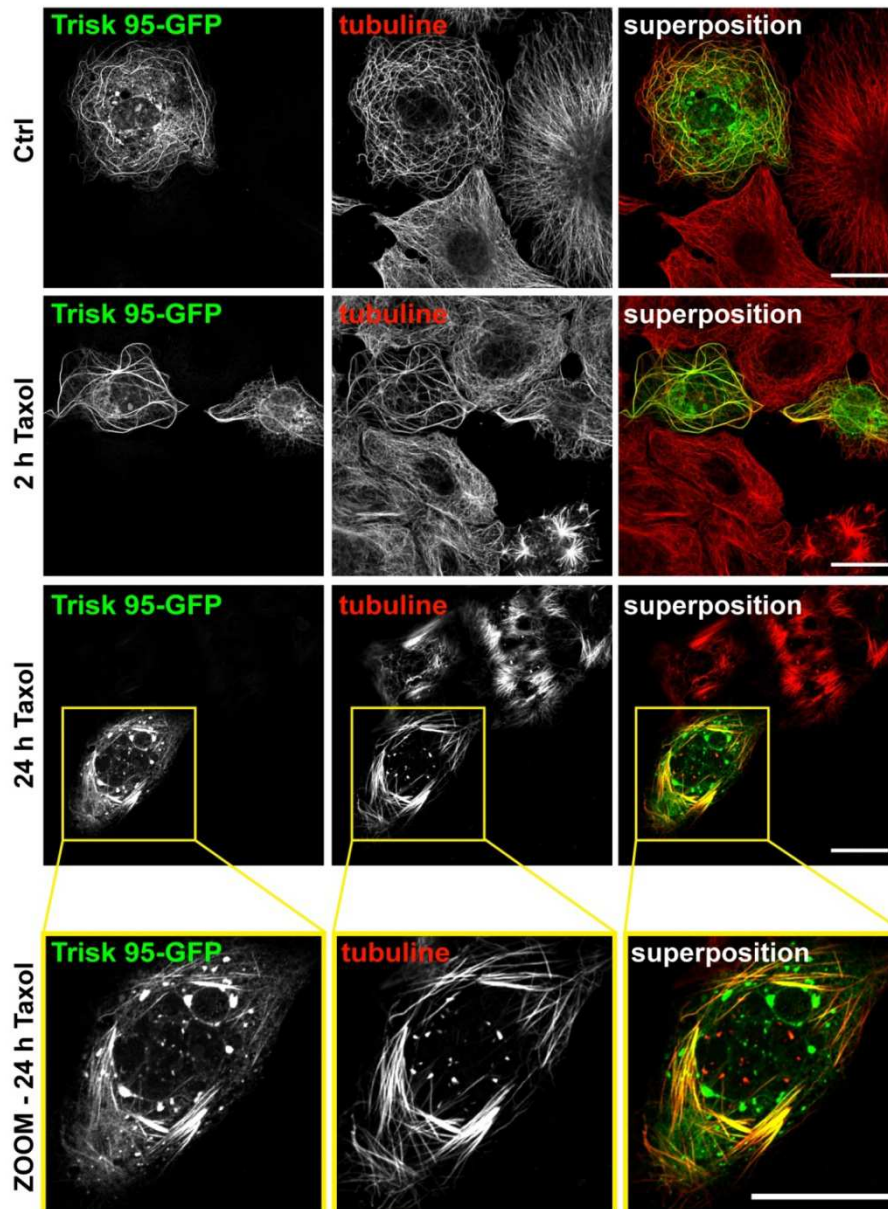
Afin de savoir si la formation des RLS dépendait de la présence et/ou de la dynamique des microtubules, la cinétique de la formation des RLS induite par Trisk 95 a été observée. Trisk 95 fusionnée à la GFP a été exprimée dans des cellules COS-7 puis les effets de drogues déstabilisatrices (nocodazole, Figure R6) et stabilisatrices (taxol, Figure R7) ont été indépendamment testés sur une cinétique de deux heures. Nous avons ensuite regardé l'organisation du réseau de microtubules et les RLS dans ces cellules.

À concentration constante de nocodazole, plus l'effet de cette drogue est prolongés, plus les microtubules sont déstabilisés et désorganisés. Cette désorganisation microtubulaire en fonction du temps provoque aussi une perte des RLS (Figure R6).



**Figure R6 : Les RLS induits par Trisk 95 résistent pendant 30 min de traitement au nocodazole.** Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec Trisk 95-GFP (vert) et DsRedER2 (rouge). Les microtubules ont été marqués avec un anticorps anti-tubuline (bleu). Ces cellules ont été soit non traitées (Ctrl, contrôle, première rangée) ou soit traitées pendant 30 min (seconde rangée) ou 2 h (troisième rangée) avec du nocodazole. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

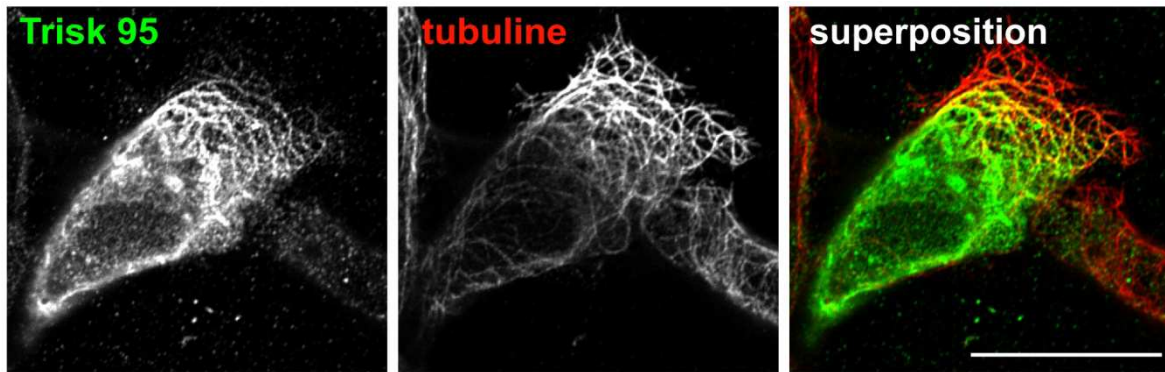
A l'inverse, les cellules traitées avec du taxol montrent une forte désorganisation du réseau de microtubules en faisceaux très épais. En présence de cette drogue, les RLS induites par Trisk 95 suivent exactement le pattern des microtubules (Figure R7). La forme des RLS est affectée par cette drogue stabilisatrice des microtubules et après 24 h ils sont présents sous forme d'amas (Figure R7, zoom).



**Figure R7 : La forme des RLS induits par Trisk 95 est affectée par le Taxol, un stabilisateur des microtubules.** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 95-GFP (vert), marquées avec un anticorps anti-tubuline (rouge) et soit non traitées (Ctrl, première rangée) ou soit traitées pendant 2 h (seconde rangée) ou 24 h (troisième rangée) avec du Taxol. La quatrième rangée est un zoom des cellules traitées pendant 24 h avec du Taxol. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

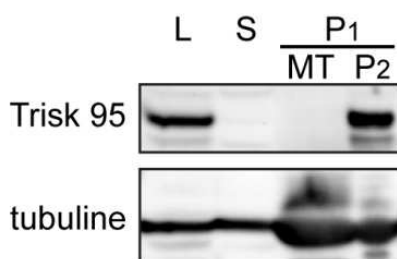
Ces résultats suggèrent que pour être formées et maintenues, les déformations de reticulum induites par Trisk 95 nécessitent un réseau de microtubules intact et stable.

Afin de tester l'association de Trisk 95 avec les microtubules, des essais de co-sédimentation avec les microtubules ont été réalisés. Ces expériences ont été réalisées sur cellules HEK293, qui sont aisément transfectables et plus appropriées que les cellules COS-7 pour les tests biochimiques. Comme dans les cellules COS-7, Trisk 95 induit des RLS et modifie l'organisation des microtubules dans les cellules HEK293 (Figure R8).



**Figure R8 :** Comme les cellules COS-7, les cellules HEK293 présentent des RLS quand Trisk 95 est exprimée et ces RLS co-alignent avec les microtubules. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec Trisk 95 (vert) et marquées avec un anticorps anti-tubuline (rouge). Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

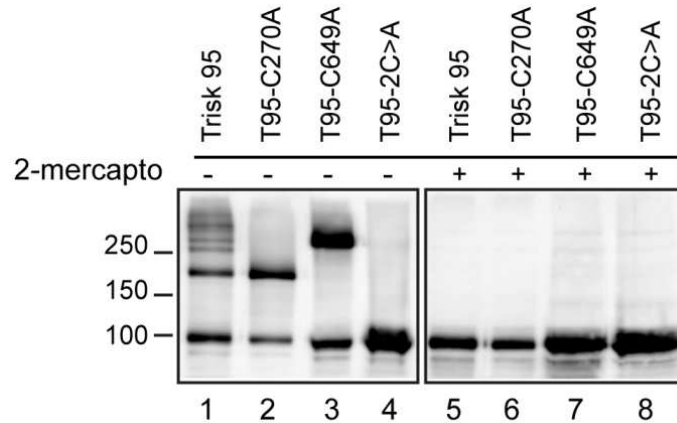
L'essai de co-sédimentation avec les microtubules est un test qui permet d'isoler une fraction spécifique, la fraction MT, où se trouvent les microtubules et les partenaires microtubulaires (Figure R9). Dans un premier temps, nous avons observé que Trisk 95 était présente dans le culot des agrégats (Figure R9, fraction P2) et non dans la fraction microtubulaire (Figure R9, fraction MT).



**Figure R9 :** Dans les tests de co-sédimentation avec les microtubules, Trisk 95 agrège. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec Trisk 95 avant lyse cellulaire. Le lysat cellulaire (L) a été incubé à 37°C avec du Taxol, de la tubuline et du GTP. Après une centrifugation sur coussin de glycérol, le surnageant (S) a été séparé du culot (P1). Les microtubules dans cette fraction P1 sont dépolymérisés et de nouveau centrifugés pour séparer la vraie fraction microtubulaire (MT) du culot d'agrégats protéiques (P2). Trisk 95 est dans la fraction P2, montrant que soit elle agrège, soit elle forme des complexes protéiques.

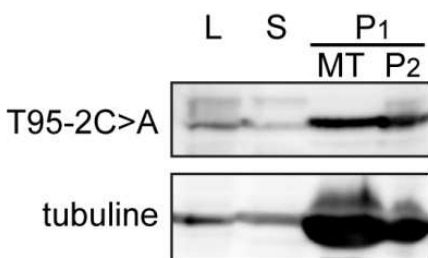
En effet, Trisk 95 est déjà décrite comme une protéine pouvant s'agréger en formant de larges complexes multimériques (Froemming et al., 1999). Deux cystéines lumineales en position 270 et 649, sont responsables de la multimérisation de la triadine. Pour palier à ce problème d'oligomérisation, trois mutants ont été construits : (i) le mutant T95-C649A muté sur la cystéine 649, (ii) le mutant T95-C270A muté sur la cystéine 270 et (iii) le double mutant Trisk 95-2C>A muté sur les deux cystéines lumineales.

Ces mutants ont été testés par électrophorèse en conditions non dénaturante et dénaturante (Figure R10). En condition dénaturante, toutes les constructions de Trisk 95 restent à l'état de monomère (lignes 5-8). En condition non dénaturante, Trisk 95 forme des dimères et une série de multimères visibles sur gel (Figure R10, ligne 1), alors que les mutants T95-C270A et T95-C649A ne forment plus qu'une espèce de multimère (Figure R10, lignes 2 et 3). Seul le double mutant Trisk 95-2C>A dépourvu des deux cystéines lumineales reste à l'état de monomère (Figure R10, ligne 4).



**Figure R10 : Les deux cystéines lumineales C270A et C649A médient l'oligomérisation de Trisk 95.** Les cellules HEK293 ont été transfectées avec Trisk 95, T95-C270A, T95-C649A ou T95-2C>A. Les lysats de cellules ont été utilisés pour un gel SDS-PAGE dans des conditions non dénaturantes (2-mercaptoéthanol -) ou dénaturantes (2-mercaptoéthanol +). En conditions non dénaturantes, Trisk 95 présente plusieurs formes, monomérique à 95 kDa, dimériques (200 kDa) et multimériques (ligne 1). Les mutants T95-C270A et T95-C649A sont visibles sous formes monomériques et soit dimériques soit multimériques (lignes 2 et 3). Le mutant T95-2C>A est visible seulement sous forme monomérique (ligne 4). En conditions dénaturantes, tous les mutants de Trisk 95 sont à l'état de monomère à 95 kDa (lignes 5-8).

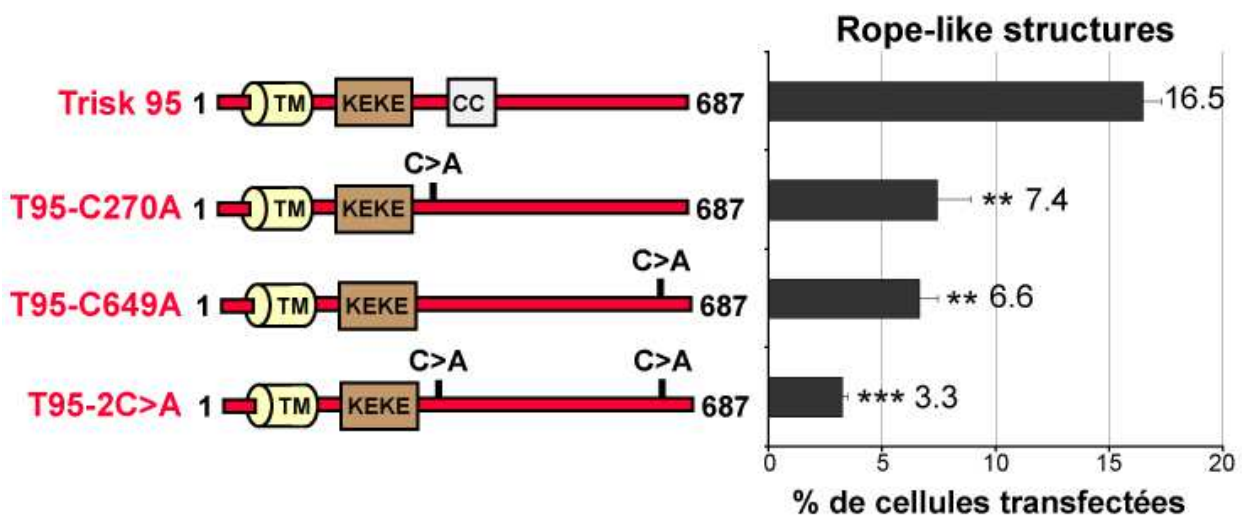
Le mutant Trisk 95-2C>A a donc été utilisé pour les essais de co-sédimentation avec les microtubules (Figure R11). L'étude révèle qu'une large quantité du mutant Trisk 95-2C>A co-sédimente avec les microtubules dans la fraction MT (Figure R11, fraction MT).



**Figure R11 : Dans les tests de co-sédimentation, Trisk 95 peut lier les microtubules quand elle est dépourvue de ses deux cystéines lumineales.** Les cellules HEK293 ont été transfectées avec T95-2C>A avant lyse cellulaire. Le lysat cellulaire (L) a été incubé à 37°C avec du Taxol, de la tubuline et du GTP. Après une centrifugation sur coussin de glycérol, le surnageant (S) a été séparé du culot (P1). Les microtubules dans cette fraction P1 sont dépolymérisés et de nouveau centrifugés pour séparer la vraie fraction microtubulaire (MT) du culot d'agrégats protéiques (P2). Le mutant T95-2C>A est présent dans la fraction MT, associé aux microtubules.

Ce résultat nous montre que la triadine monomérique est capable de s'associer avec les microtubules.

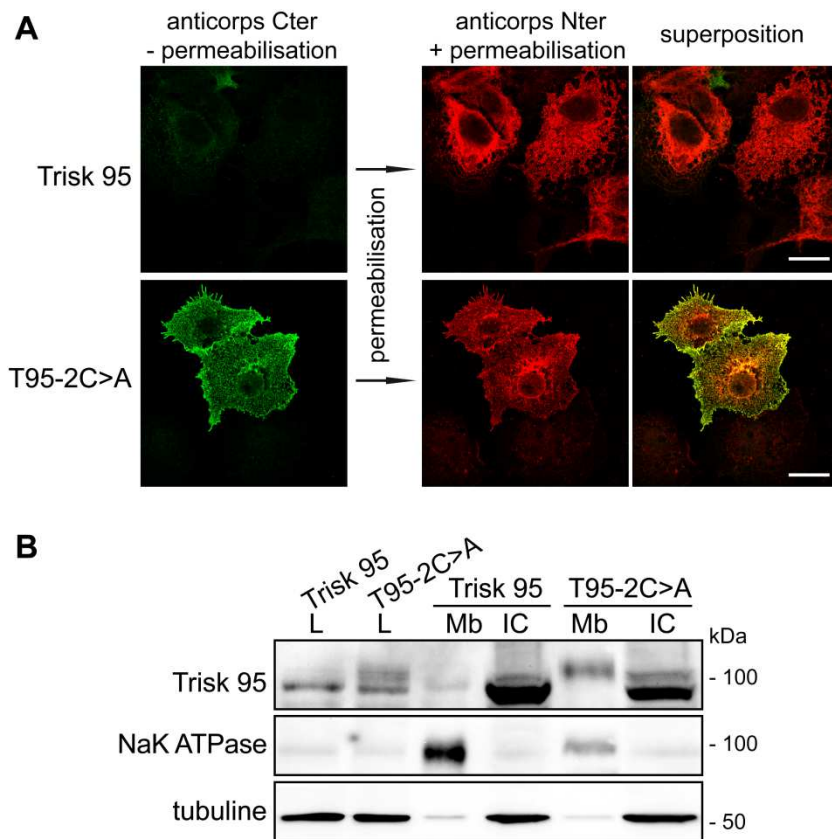
En parallèle chaque construction a été indépendamment exprimée dans des cellules COS-7 et le pourcentage de cellules présentant des RLS a été quantifié. Les RLS induits par Trisk 95 dans des cellules COS-7 représentent 16.5% des cellules transfectées (Figure R12). Par rapport à Trisk 95, les RLS induits par l'expression du mutant T95-C270A ou du mutant T95-C649A, diminuent d'environ 50%. Cette diminution atteint 80% avec le mutants Trisk 95-2C>A.



**Figure R12 : Les propriétés structurantes de Trisk 95 dépendent de ces deux cystéines lumineales.** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 95, T95-C270A, T95-C649A ou T95-2C>A. Les représentations schématiques des différentes constructions sont visibles avec les différents domaines spécifiques. TM, le domaine transmembranaire (aa 46-66) ; KEKE, le domaine KEKE (aa 210-224) et CC, le domaine coiled-coil (aa 306-341). Les cellules présentant des RLS sont comptées et les résultats donnés en pourcentage de cellules transfectées. \*\* $P < 0.01$  et \*\*\* $P < 0.001$ , comparaison par *t*-test des mutants par rapport à Trisk 95. Les barres d'erreurs sont des s.e.m.,  $n=3$  expériences (minimum),  $N= 400$  cellules comptées par expérience.

Ces données semblent montrer que l'oligomérisation de la triadine favorise les propriétés structurantes de Trisk 95 sur le reticulum.

Nous avons aussi observé en imagerie confocale que la localisation de T95-2C>A est modifiée. En effet des études d'immunofluorescence et de biochimie par des tests de biotinylation de surface cellulaire, montrent que Trisk 95 se localise seulement dans la membrane de RE tandis que le mutant T95-2C>A se localise à la fois dans le reticulum et à la membrane plasmique (Figure R13A et R13B).



**Figure R13 : Le mutant T95-2C>A est partiellement délocalisé à la membrane plasmique.** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 95 ou T95-2C>A. **(A)** Les cellules ont été fixées sans perméabilisation et marquées avec un anticorps anti-Cterminal de Trisk 95 (vert), montrant que seul le mutant T95-2C>A est localisé à la membrane plasmique (panneau de gauche). Puis les cellules ont été perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-Nterminal de la triadine (rouge). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. **(B)** Expérience de biotinylation des protéines de surface. Après expression de Trisk 95 ou T95-2C>A, les protéines de surface cellulaire ont été biotinylées puis les cellules lysées. Les lysats (**L**) ont été incubés avec des billes couplées à la Streptavidine pour piéger les protéines de surface biotinylées (**Mb**, fraction membranaire) et les séparer des protéines intracellulaires (**IC**, fraction intracellulaire). La NaK ATPase est une protéine de référence de la membrane plasmique et la tubuline est une protéine de référence cytoplasmique. T95-2C>A est présent dans la fraction Mb (ligne 5) et l'augmentation de poids moléculaire observée est due au couplage avec le crosslinkant.

La double localisation du mutant T95-2C>A suggère que la multimérisation de la triadine influe sur sa localisation et que d'autres domaines sont responsables pour son maintien au reticulum.

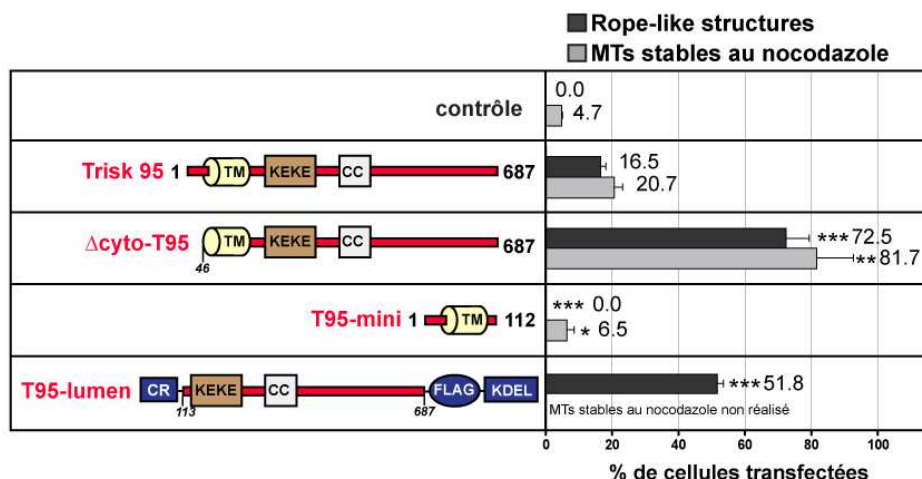
L'ensemble de ces résultats (Figure R12 et R13) suggèrent que la multimérisation de Trisk 95 peut déformer les membranes de reticulum.

Nous avons ensuite voulu caractériser les domaines moléculaires responsables des déformations du RE et de la désorganisation des microtubules.

### C) Le domaine luminal de Trisk 95 est structurant pour le RE et les microtubules.

A ce point de cette étude, notre question est de savoir si la triadine est une protéine d'ancrage, c'est-à-dire une protéine capable d'ancrer le reticulum sur le réseau de microtubules. Autrement dit, la triadine peut-elle directement lier les microtubules via son extrémité N-terminale cytoplasmique ?

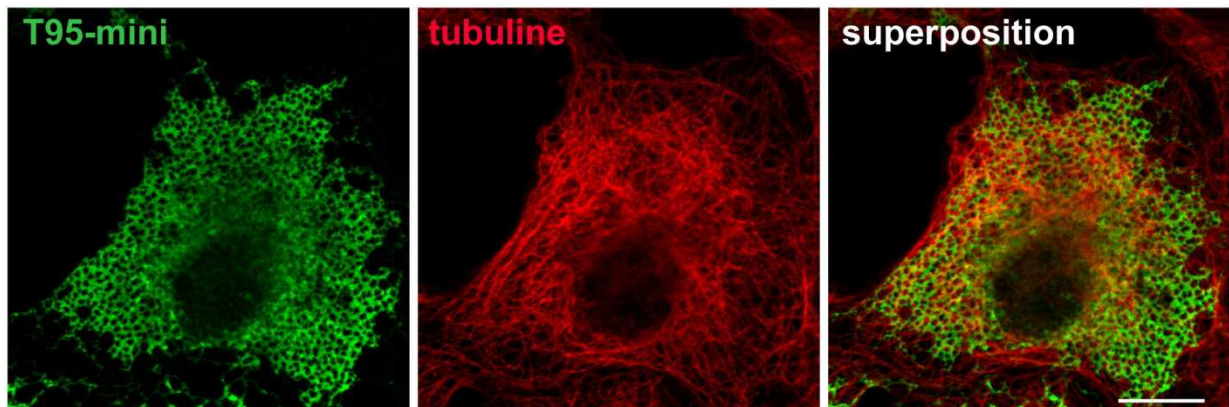
Pour étudier les domaines de Trisk 95 responsables des phénotypes décrits plus haut, plusieurs mutants ont été construits. Le premier,  $\Delta$ cyto-T95 est un mutant dont toute la partie N-terminale cytoplasmique a été déléetée. A l'opposé, le mutant T95-mini est déléeté de presque de toute sa partie luminale. Ces deux mutants ont été indépendamment exprimés dans des cellules COS-7 et HEK293. Les résultats suivants sont à l'inverse de notre hypothèse. La quantification du nombre de RLS induites par Trisk 95 est de 16,5%. L'expression du mutant  $\Delta$ cyto-T95 présente une quantification du nombre de RLS de 72,5%, soit une réduction d'environ 80% par rapport à Trisk 95 (Figure R14). Ce résultat corrèle avec la stabilité des microtubules au nocodazole obtenu dans ces cellules. Dans des cellules avec des RLS, Trisk 95 présente 20,7% de cellules avec un réseau stable de microtubules contre 81,7% pour  $\Delta$ cyto-T95. Le réseau de microtubules est quatre fois plus stable dans les cellules exprimant  $\Delta$ cyto-T95 que Trisk 95.



**Figure R14 : Le domaine luminal de Trisk 95 est responsable des déformations de RE et de la stabilisation des microtubules.** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 95,  $\Delta$ cyto-T95, T95-mini ou T95-lumen. Les représentations schématiques des différentes constructions sont visibles avec les différents domaines spécifiques. TM : le domaine transmembranaire (aa 46-66), KEKE : le domaine KEKE (aa 210-224), CC : le domaine coiled-coil (aa 306-341), CR : le domaine calreticuline, l'étiquette Flag et KDEL : domaine de rétention au RE. Les cellules présentant des RLS sont comptées et les résultats donnés en pourcentage de cellules transfectées. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  et \*\*\* $P < 0.001$ , comparaison par  $t$ -test des mutants par rapport à Trisk 95. Les barres d'erreurs sont des s.e.m.,  $n = 3$  expériences (minimum),  $N = 100$  cellules comptées par expérience.

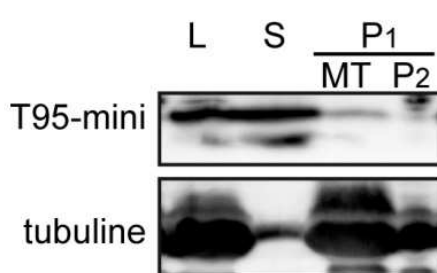


Au contraire, l'expression du mutant T95-mini ne déforme plus le RE en RLS (Figure R15). Le reticulum a une forme étalée et trouée qui ne correspond ni aux dentelles de RE normal, ni aux RLS. Les microtubules eux ne sont pas perturbés et ils sont dépolymérisés par le nocodazole au même titre que les cellules contrôles, suggérant que T95-mini n'est pas associée aux microtubules.



**Figure R15 : L'expression du mutant T95-mini ne perturbe pas l'organisation des microtubules dans les cellules COS-7.** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec T95-mini. La localisation de T95-mini (vert) et de la tubuline (rouge) ont été mis en évidence par marquage immunofluorescent. Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

Pour vérifier ce résultat, le mutant T95-mini a été testé par des essais de co-sédimentation avec les microtubules. Le mutant ne co-fractionne pas avec les microtubules et reste dans la fraction surnageante (Figure R16, fraction S).

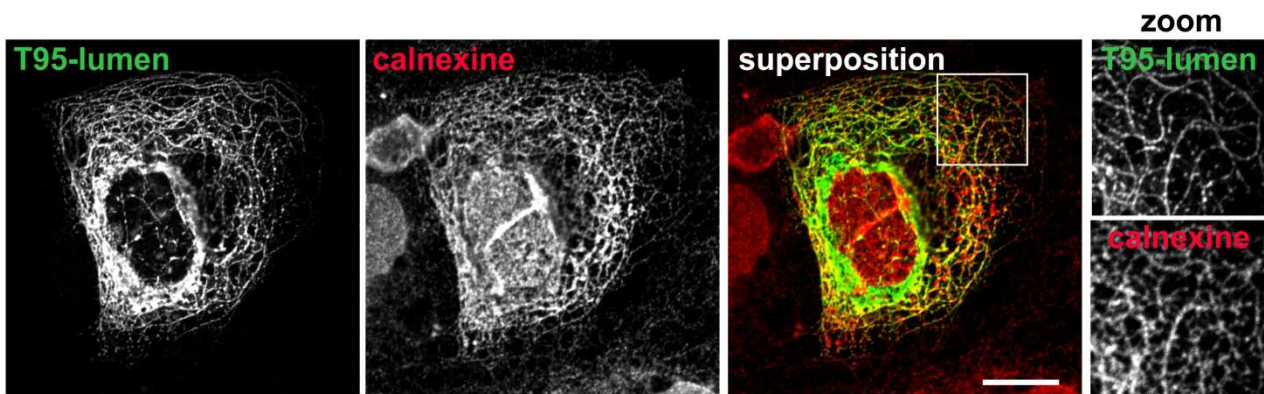


**Figure R16 : Trisk 95 ne peut pas lier les microtubules quand elle est dépourvue de sa partie luminale.** Les cellules HEK293 ont été transfectées avec T95-mini avant lyse cellulaire. Le lysat cellulaire (L) a été incubé à 37°C avec du Taxol, de la tubuline et du GTP. Après une centrifugation sur coussin de glycérol, le surnageant (S) a été séparé du culot (P1). Les microtubules dans cette fraction P1 sont dépolymérisés et de nouveau centrifugés pour séparer la vraie fraction microtubulaire (MT) du culot d'agrégats protéiques (P2). Le mutant T95-mini est présent dans la fraction S, non associé aux microtubules.

La triadine déletée de presque toute sa partie luminale n'est donc plus capable de s'associer avec les microtubules. Ces résultats montrent que le domaine de Trisk 95 responsable des RLS est la partie luminale.

Pour confirmer que la partie luminale de Trisk 95 est le domaine responsable des RLS induit par Trisk 95, j'ai construit le mutant complémentaire à T95-mini : le mutant T95-lumen. Le mutant T95-lumen est composé, dans l'ordre, d'une séquence d'adressage au reticulum en N-terminal (séquence calreticuline), du domaine luminal de Trisk95, d'une séquence de rétention au RE (KDEL) et une séquence Flag (DYKDDDDK) en C-terminal. Ainsi, ce mutant représente le domaine luminal de Trisk 95 sans les domaines cytosolique et transmembranaire, et est ciblé dans la lumière du reticulum (Figure R14).

Lorsqu'il est transfecté dans les cellules COS-7, ce mutant a la capacité de déformer le RE en RLS (Figure R17) dans plus de la moitié des cellules transfectées, soit environ trois fois plus que Trisk 95 (Figure R14).

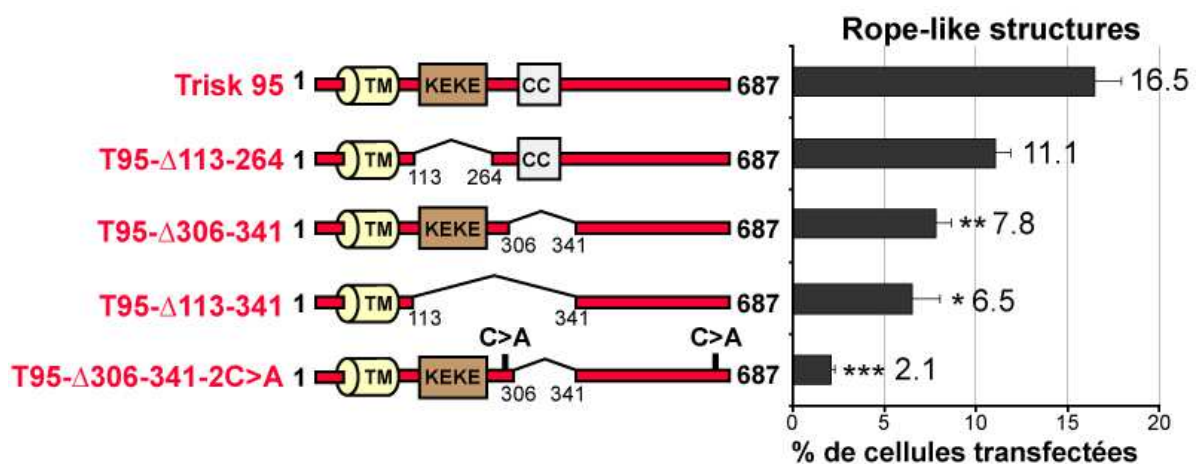


**Figure R17 : Les RLS induits par le mutant T95-lumen se localisent dans le RE dans les cellules COS-7.** Les cellules ont été transfectées avec T95-lumen. La localisation de T95-lumen (vert) et de la calnexine (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. La superposition des deux marquages indique que T95-lumen se trouve dans le même compartiment que la calnexine. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

L'ensemble de ces constructions (Trisk 95,  $\Delta$ cyto-T95, T95-lumen et T95-mini) nous a permis de définir les domaines importants pour les déformations de reticulum. D'après nos résultats, le domaine luminal (acides aminés de 113 à 687) est indispensable pour induire des RLS. Le domaine transmembranaire (acides aminés de 46 à 66) favorise et améliore les déformations de reticulum, à condition que le domaine luminal soit présent (mutant  $\Delta$ cyto-T95). Pour finir, la séquence du domaine cytoplasmique régule négativement le phénotype RLS. La partie N-terminale de la triadine semble contenir les motifs d'association avec d'autres effecteurs ubiquitaires qui régulent les phénotypes que l'on observe. Cela suggère que ces effecteurs réguleraient négativement le lien entre la triadine et les microtubules. L'ensemble de ces résultats mettent en évidence la partie luminale de Trisk 95 comme partie importante pour son association avec les microtubules.

## D) Les deux cystéines et le motif coiled-coil sont responsables des propriétés structurantes de Trisk 95.

Pour savoir si des motifs précis du domaine luminal sont impliqués dans les déformations du RE, différents mutants de délétion ont été testés. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux motifs déjà connus et décrits comme importants pour la triadine (Figure R18). Le premier est un motif KEKE riche en lysines et en acides glutamiques (acides aminés de 210 à 224, (Realini et al., 1994)) interagissant avec le RyR1 ou la calséquestrine (Kobayashi et al., 2000). Le deuxième est un motif prédit comme un domaine coiled-coil d'interaction protéine-protéine (acides aminés de 306 à 341, (Lupas et al., 1991)). Les mutants de délétion suivants ont été générés : i) le mutant T95- $\Delta$ 114-264 dépourvu du motif KEKE, ii) le mutant T95- $\Delta$ 306-341 dépourvu du motif coiled-coil, et iii) le mutant T95- $\Delta$ 114-341 dépourvu des motifs KEKE et coiled-coil. Ces mutants ont été indépendamment transfectés dans des cellules COS-7. Le nombre de cellules présentant des RLS a été déterminé pour chacun de ces mutants.



**Figure R18 : Les propriétés structurantes de Trisk 95 dépendent des deux cystéines et du domaine coiled-coil dans la partie luminaire.** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 95 ou T95- $\Delta$ 113-246 ou T95- $\Delta$ 306-341 ou T95- $\Delta$ 113-341 ou T95- $\Delta$ 306-341-2C>A. Les schémas des différentes constructions sont visibles avec les différents domaines spécifiques = TM : le domaine transmembranaire (aa 46-66), KEKE : le domaine KEKE (aa 210-224) et CC : le domaine coiled-coil (aa 306-341). Les cellules présentant des RLS sont comptées et les résultats donnés en pourcentage de cellules transfectées. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 et \*\*\* $P$ <0.001, comparaison par  $t$ -test des mutants par rapport à Trisk 95. Les barres d'erreurs sont des s.e.m.,  $n=3$  expériences (minimum),  $N=100$  cellules comptées par expérience.

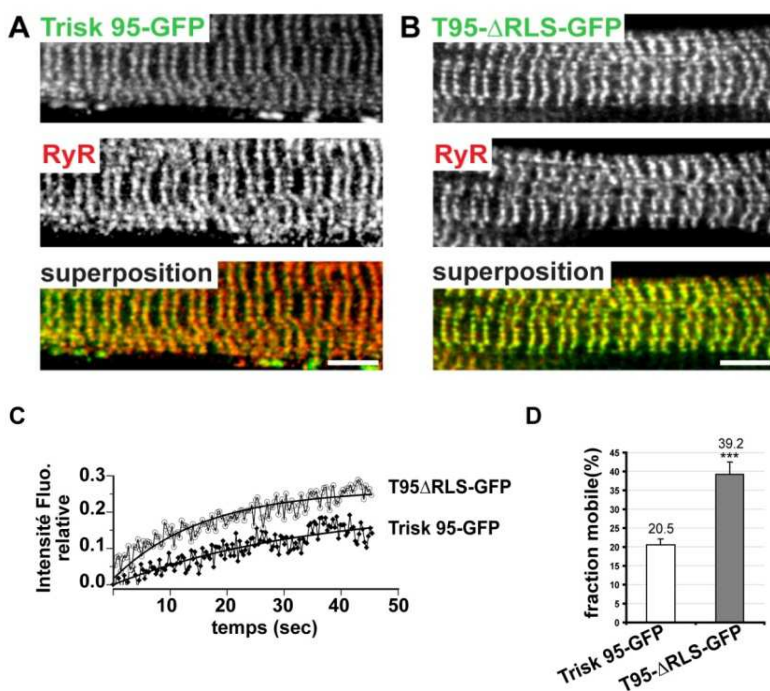
La délétion du motif coiled-coil est nécessaire pour réduire fortement la formation des RLS (diminution d'environ 53 %) ce qui ne semble pas le cas pour le motif KEKE.

Précédemment, nous avons montré que les deux cystéines lumineales (C270 et C649) sont importantes dans la déformation du reticulum (voir Figure R12). Nous avons donc généré un mutant de Trisk 95 qui est à la fois délété de ces deux cystéines lumineales et du motif coiled-coil (T95  $\Delta$ 306-341 2C>A, que l'on nomme aussi T95- $\Delta$ RLS car c'est le mutant qui ne présente presque plus de RLS). Transfecté dans des cellules COS-7, ce mutant induit des RLS dans seulement 2.1% des cellules transfectées, réduisant ainsi d'environ 90% le nombre de cellules présentant des RLS par rapport à Trisk 95 (Figure R18).

Ces données montrent que l'effet du motif coiled-coil et des deux cystéines lumineales est synergique pour induire des déformations du RE. Ceci suggère que les déformations des membranes du reticulum résultent de deux mécanismes qui nécessitent le motif coiled-coil pour son interaction avec d'autres protéines et les ponts disulfures pour multimériser la triadine.

### E) Les deux cystéines et le motif coiled-coil sont responsables de l'ancrage de Trisk 95 dans une cellule musculaire.

Par analyse de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), l'équipe de Vincenzo Sorrentino a montré que Trisk 95 est la protéine la plus stable au niveau du CRC, suggérant que la triadine joue un rôle central dans l'ancrage du complexe aux triades (Cusimano et al., 2009). Nous avons voulu tester si les mutations des domaines qui affectent les propriétés structurantes de Trisk 95 affectent les propriétés de Trisk 95 à la triade. En collaboration avec l'équipe de Sorrentino, Trisk 95 et T95- $\Delta$ RLS ont été indépendamment exprimés dans des myoblastes de rat en culture qui ont été ensuite différenciés pendant 12 jours. Les deux constructions ont été fusionnées à une protéine GFP à leur extrémité C-terminale. Par immunofluorescence, T95- $\Delta$ RLS-GFP colocalise avec le RyR, tout comme Trisk 95-GFP (Figure R19A et R19B). Des expériences de FRAP ont ensuite été réalisées. Elles montrent que la fraction mobile de Trisk 95-GFP est de 20.5 % alors que pour le mutant T95- $\Delta$ RLS-GFP elle est de 39.2%. Ainsi, le mutant T95- $\Delta$ RLS-GFP a une mobilité accrue d'environ 90 % comparée à Trisk 95-GFP (Figure R19C et R19D).

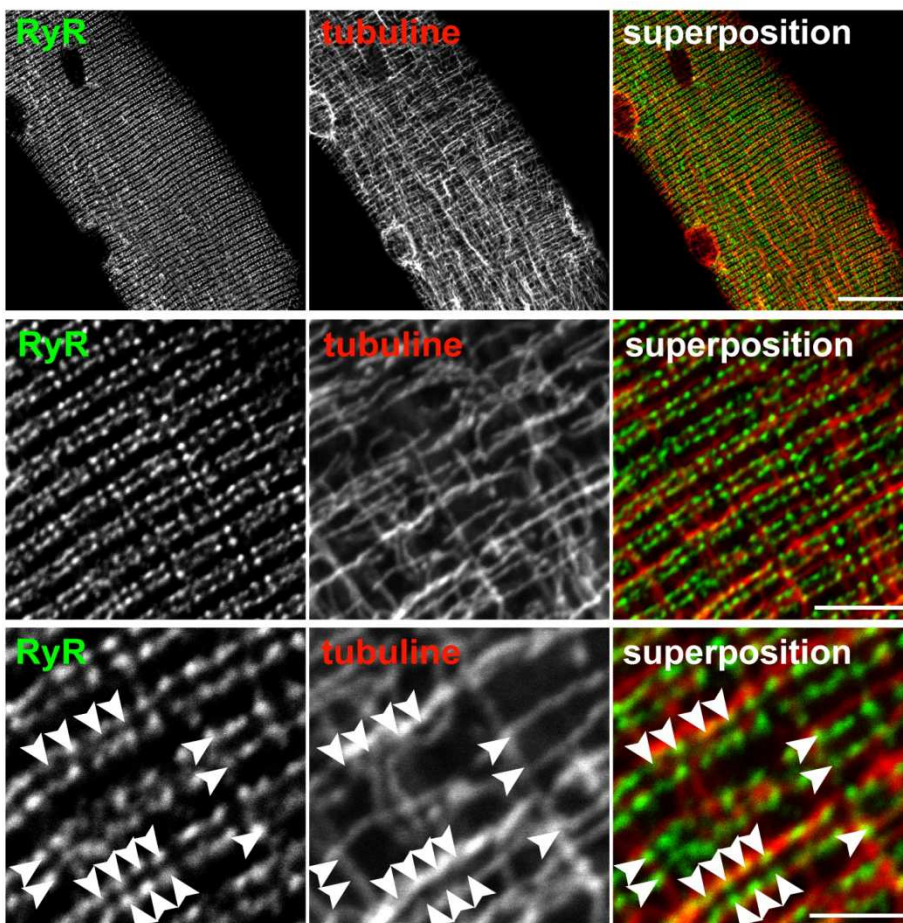


**Figure R19 : Dans les cellules musculaires, l'ancrage de Trisk 95 aux triades dépend des deux cystéines lumineales et du domaine coiled-coil.** Des myoblastes de rat ont été transfectés avec Trisk 95-GFP ou T95- $\Delta$ RLS (T95- $\Delta$ 306-341-2C>A) puis différenciés pendant 12 jours. (A, B) La localisation de Trisk 95 ou de son mutant (vert) et de RyR1 (rouge) ont été mis en évidence par marquage immunfluorescent. La superposition des deux marquages indique que Trisk 95 et T95- $\Delta$ RLS se trouvent dans le même compartiment que RyR1. Barre d'échelle : 5  $\mu$ m. (C, D) Les analyses de FRAP ont été réalisées sur des clusters triadiques individuels. (C) Les intensités de fluorescence relatives ont été corrigées en tenant compte du bruit de fond et de la perte de fluorescence au cours du temps. (D) la fraction mobile pour chaque protéine a été calculée à partir des données de récupération de fluorescence. \*\*\* $P < 0.001$ ,  $t$ -test de la fraction mobile du mutant T95- $\Delta$ RLS comparé celle de Trisk 95. Les barres d'erreurs sont des s.e.m,  $n=21$  clusters analysés pour chaque protéine.

Ces résultats suggèrent que dans le muscle, les deux cystéines lumineales et le motif coiled-coil de Trisk 95 semblent favoriser l'ancrage de Trisk 95 à la triade, et lorsque ces domaines sont délétés, la protéine perd cet ancrage.

## F) Les triades établissent des contacts avec les microtubules dans les cellules musculaires.

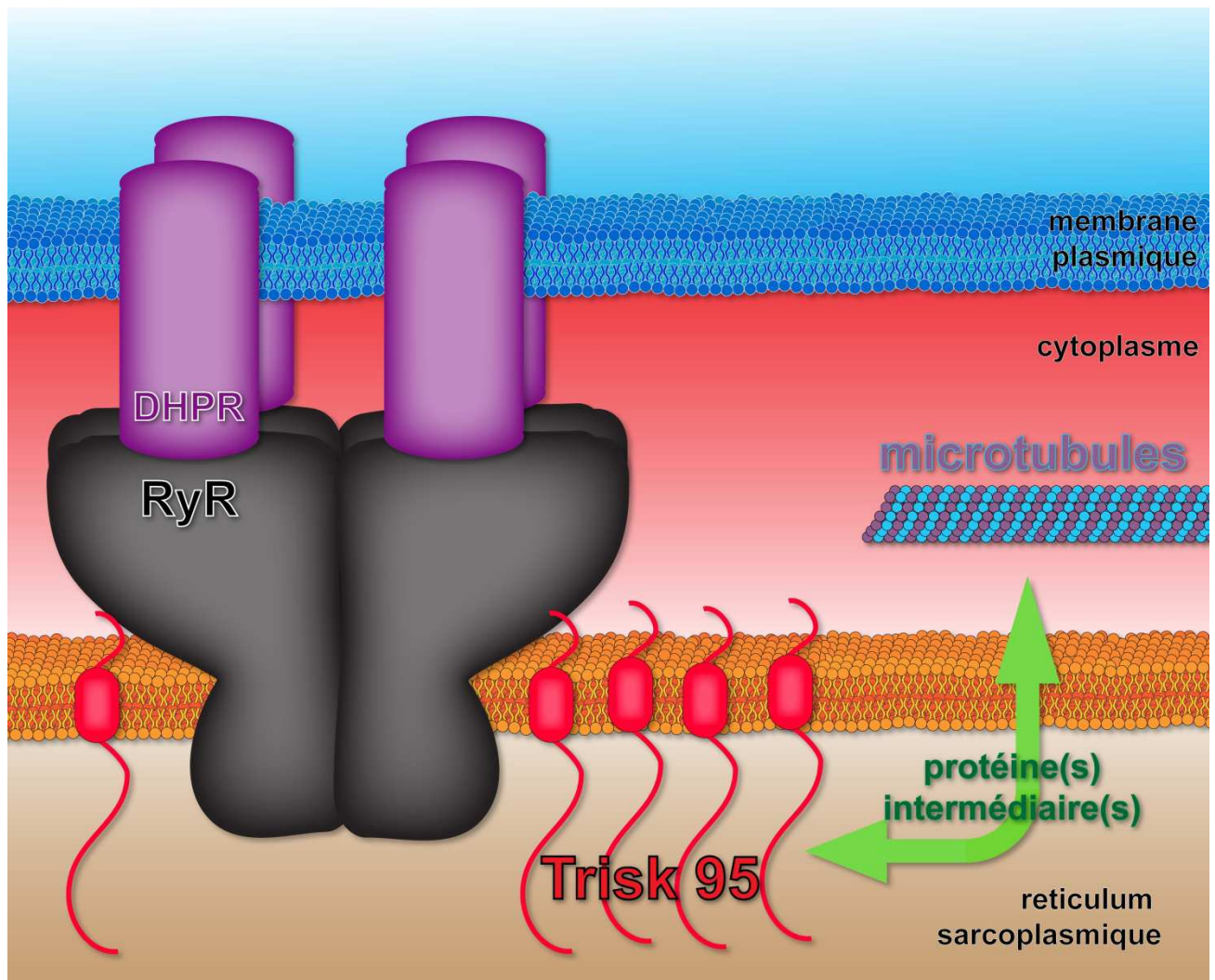
Dans une cellule indifférenciée, les membranes de reticulum établissent des points de contact avec les microtubules (Vedrenne and Hauri, 2006). Etant donné que Trisk 95 lie les microtubules de façon indirecte, nous avons voulu savoir si les triades étaient en contact avec les microtubules dans le muscle. Nous avons réalisé par immunofluorescence un marquage des triades et des microtubules dans des fibres dissociées de muscle de souris adulte (muscle *flexor digitorum brevis*, FDB) (Figure R20). Les triades, marquées ici en vert par un anticorps anti-RyR1, ont une organisation très spécifique en double rangées de points. Les microtubules, marqués ici en rouge par un anticorps anti-tubuline, ont aussi une organisation en forme de ‘quadrillage’, avec des microtubules orientés longitudinalement et transversalement (Ralston et al., 1999; Tassin et al., 1985a). Les triades colocalisent partiellement avec le réseau de microtubules (Figure R20, pointes de flèches).



**Figure R20 :** Dans les cellules musculaires, les triades colocalisent souvent avec le réseau de microtubules. Dans des fibres dissociées de muscle FDB de souris, la localisation de RyR1 (vert) et de la tubuline (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. Toutes les images sont des zooms de la première rangée, et sont toutes issues du même plan confocal. Les têtes de flèches indiquent que de nombreuses triades co-alignent avec les microtubules. Les barres d'échelles de haut en bas sont respectivement de 20, 5 et 2.5  $\mu\text{m}$ .

Cette superposition, bien que partielle, suggère qu'il existe des points de contacts entre les citernes terminales de reticulum des triades et les microtubules.

Dans le muscle squelettique, les triades et les microtubules sont souvent associées. Or, comme les microtubules sont cytosoliques, le lien entre la partie luminale de la triadine et les microtubules est de fait un lien indirect, impliquant vraisemblablement une ou plusieurs protéines intermédiaires. (Figure R21)



**Figure R21 : Hypothèse de travail : Trisk 95 s'associe indirectement aux microtubules. Existe-t-il un ou plusieurs intermédiaires protéiques pouvant faire le lien entre la triadine et les microtubules ?** Trisk 95 (en rouge) est une protéine localisée à la membrane du RS et peut lier RyR1 (en noir) qui est couplé physiquement au DHPR (en violet), lui-même ancré dans la membrane d'un tubule-T (membrane plasmique). Trisk 95 peut aussi s'associer avec un ou des partenaire(s) protéique(s) non connu(s) (double flèche verte) qui pourraient s'associer avec les microtubules dans le cytosol.





## Chapitre 2 :

Identification et caractérisation du partenaire de la triadine faisant le lien entre les microtubules et la triade.

---



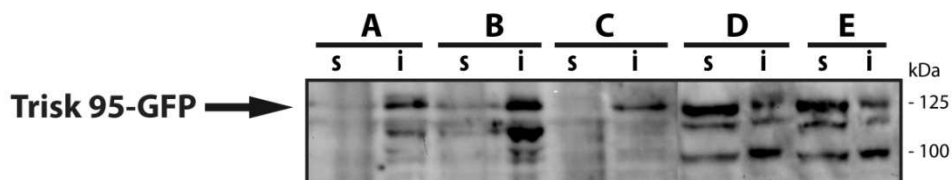
## *Identification et caractérisation du partenaire de la triadine capable d'associer Trisk 95 aux microtubules.*

Nous avons montré précédemment que Trisk 95 est capable de déformer les membranes de reticulum et de lier indirectement le réseau de microtubules. Effectivement Trisk 95 s'associe aux microtubules, non via sa partie N-terminale cytoplasmique mais via sa partie C-terminale luminale, à l'intérieur du RS. Le réseau de microtubules étant cytosolique cela suppose qu'il existe au moins un partenaire protéique pour faire le lien entre Trisk 95 et les microtubules. La suite logique du projet porte donc sur l'identification et la caractérisation du ou des partenaire(s) potentiel(s) de Trisk 95.

### *A) Recherche de partenaires de Trisk 95 par spectrométrie de masse comparative.*

Dans le but de balayer un large spectre de protéines susceptibles d'interagir avec Trisk 95, une analyse en spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec la plateforme EDyP du CEA de Grenoble dirigée par Yohann Couté.

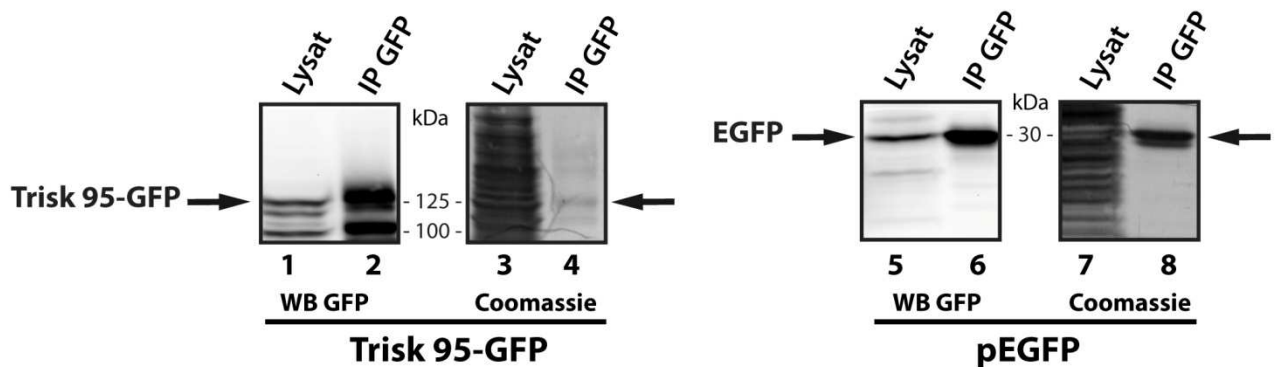
Pour cette expérience, des cellules HEK293 ont été transfectées soit avec Trisk 95-GFP soit avec EGFP. Une immunoprécipitation de la GFP a ensuite été réalisée puis les protéines co-immunoprécipitées ont été analysées par spectrométrie de masse. L'immunoprécipitation de EGFP seule a servi de contrôle négatif. Nous avons d'abord optimisé la solubilisation de Trisk 95-GFP. Cette étape de solubilisation a été difficile car Trisk 95-GFP, comme Trisk 95, multimérise dans les membranes de reticulum (voir chapitre 1 C). Pour résoudre ce problème, nous avons adapté un protocole de solubilisation déjà utilisé dans le laboratoire qui permet la solubilisation du canal calcique RyR1 du muscle (Marty et al., 1994a) (Figure R22 D et E).



**Figure R22 : Différentes méthodes pour solubiliser Trisk 95 avant l'immunoprécipitation.** Les cellules HEK293 ont été transfectées avec Trisk 95-GFP, lysées dans des tampons avec différents détergents (A, B, C, D, E), puis centrifugées pour séparer la fraction soluble (s) de la fraction insoluble (i). (A) tampon RIPA ; (B) tampon RIPA supplémenté avec 1 mM de DTT ; (C) tampon basé sur du TritonX100 ; (D, E) protocole de solubilisation utilisé dans (Marty et al., 1994a) suivi d'une sonication des protéines pendant 10 sec (D) ou 30 sec (E). Trisk 95-GFP est visible à 125 kDa.

Pour ensuite obtenir de grande quantité de protéines co-immunoprécipitées et augmenter la spécificité, nous avons décidé de réaliser les co-immunoprécipitations de Trisk 95-GFP et EGFP avec un kit commercial, le Kit GFP-Trap® (Figure R23, lignes 2, 4, 6 et 8). Ce kit permet une immunoprécipitation efficace et rapide des protéines GFP.

Après la solubilisation et l'immunoprécipitation, la qualité et la quantité des protéines immunoprécipitées ont été vérifiées par une coloration au bleu de Coomassie et par Western blot avant d'être envoyé pour analyse en masse spectrométrie (Figure R23). En effet, pour réaliser une analyse en spectrométrie de masse efficace et pertinente, il est nécessaire d'obtenir un enrichissement suffisant de la protéine immunoprécipitée.



**Figure R23 : Immunoprécipitation de Trisk 95 et du contrôle EGFP.** Les lysats (lignes 1, 3, 5, 7) ont été réalisés sur des cellules HEK293 exprimant soit Trisk 95-GFP (lignes 1, 3) soit EGFP (lignes 5, 7). Les expériences d'IP (lignes 2, 4, 6, 8) ont été réalisées sur ces lysats en utilisant le kit GFP-Trap®. Les présences de Trisk 95-GFP et d'EGFP ont été évaluées par Western blot (lignes 1, 2, 5, 6) en utilisant un anticorps anti-GFP puis ces membranes ont été colorées au Bleu de Coomassie (lignes 3, 4, 7, 8). Trisk 95-GFP est visible à 125 kDa et EGFP à 30 kDa.

L'analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier 797 protéines dans le crible Trisk 95-GFP et 430 dans le crible EGFP. Ces protéines ont été identifiées avec confiance puisque chaque protéine a été identifiée avec au minimum deux peptides différents. Les protéines sont classées par abondance du nombre de peptides identifiés qui correspond à la rubrique 'spectral count'. Parmi toutes ces protéines identifiées, trois groupes ont été définis.

Le groupe 1 représente les protéines co-immunoprécipitées seulement avec EGFP et absentes des protéines co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP (Tableau R4). Le groupe 2 est à l'inverse du groupe 1. Il représente les protéines spécifiquement co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP (Tableau R5). Le groupe 3 représente les protéines co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP et EGFP mais enrichies de manière significative dans la co-immunoprécipitation Trisk 95-GFP (Tableau R6). Seules les protéines avec un taux d'enrichissement égal ou supérieur à 3 ont été retenues.

**Tableau R4 : Groupe 1, Protéines spécifiquement co-immunoprécipitées avec EGFP.**

	Accession	Description	Length	Mass	IP-pEGFP #peptides	IP-pEGFP typical	IP-pEGFP Spectral Count
1	<b>GFPL1_ZOASP</b>	SWISS-PROT:Q9U6Y5 Green fluorescent protein (GFP-Cter-HisTag)	231	28202.93	10	GFPL1_ZOASP	111
2	<b>Q8IZ29_HUMAN</b>	tr Q8IZ29 Q8IZ29_HUMAN Tubulin, beta 2C OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=2 SV=1	456	50191,88	26	Q8IZ29_HUMAN	37
3	<b>B3KPS3_HUMAN</b>	tr B3KPS3 B3KPS3_HUMAN cDNA FLJ32131 fis, clone PEBLM2000267, highly similar to Tubulin alpha-ubiquitous ch	424	46643,68	18	B3KPS3_HUMAN	27
4	<b>ACTB_HUMAN</b>	sp P0709 ACTB_HUMAN Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	381	41997,64	16	ACTB_HUMAN	21
5	<b>TBB6_BOVIN</b>	sp Q2HU81 TBB6_BOVIN Tubulin beta-6 chain OS=Bos taurus GN=TUBB6 PE=2 SV=1	457	50324,17	13	TBB6_BOVIN	18
6	<b>H32_HUMAN</b>	sp Q71D H32_HUMAN Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3A PE=1 SV=3	139	15378,51	12	H32_HUMAN	20
7	<b>Q3TFE8_MOUSE</b>	tr Q3TFE8 Q3TFE8_MOUSE Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Kpnb1 PE=2 SV=1	893	98305,48	12	Q6GT6_MOUSE	12
8	<b>H31_HUMAN</b>	sp P68431 H31_HUMAN Histone H3.1 OS=Homo sapiens GN=HIST1H3A PE=1 SV=2	139	15394,48	11	H31_HUMAN	17
9	<b>H2B1B_HUMAN</b>	sp P33778 H2B1B_HUMAN Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2	126	13941,58	11	H2B1B_HUMAN	66
10	<b>H2B1N_BOVIN</b>	sp Q32L48 H2B1N_BOVIN Histone H2B type 1-N OS=Bos taurus GN=HIST1H2BN PE=1 SV=3	126	13914,51	10	H2B1N_BOVIN	38
11	<b>D2HU13_AILME</b>	tr D2HU13 D2HU13_AILME Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Alluropoda melanoleuca GN=PANDA_0	384	42256,03	7	D2HU13_AILME	9
12	<b>CBX1_HUMAN</b>	sp P83916 CBX1_HUMAN Chromobox protein homolog 1 OS=Homo sapiens GN=CBX1 PE=1 SV=1	195	21518,61	5	CBX1_HUMAN	8
13	<b>1433F_HUMAN</b>	sp Q04917 1433F_HUMAN 14-3-3 protein eta OS=Homo sapiens GN=YWHAH PE=1 SV=4	256	28201,02	4	1433F_HUMAN	4
14	<b>B2B986_RHIFE</b>	tr B2B986 B2B986_RHIFE PFTAIRE protein kinase 1 (Predicted) OS=Rhinolophus ferrumequinum GN=PFTK1 PE=4	770	84767,11	4	B2B986_RHIFE	4
15	<b>K22O_HUMAN</b>	sp Q01546 K22O_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 2 oral OS=Homo sapiens GN=KRT76 PE=1 SV=1	598	65830,1	4	K22O_HUMAN	4
16	<b>B5BUD2_HUMAN</b>	tr B5BUD2 B5BUD2_HUMAN Replication factor C 2 isoform 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RFC2 PE=2 SV=1	360	39616,3	3	B5BUD2_HUMAN	3
17	<b>SMD2_HUMAN</b>	sp P62316 SMD2_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Homo sapiens GN=SNRPD2 PE=1 SV=1	123	13614,2	3	SMD2_HUMAN	3
18	<b>HDAC1_HUMAN</b>	sp Q13547 HDAC1_HUMAN Histone deacetylase 1 OS=Homo sapiens GN=HDAC1 PE=1 SV=1	505	55637,94	2	HDAC1_HUMAN	2
19	<b>B4DST0_HUMAN</b>	tr B4DST0 B4DST0_HUMAN Suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila), isoform CRA, b OS=Homo sapiens	457	50313,8	2	B4DST0_HUMAN	2
20	<b>CTSL2_HUMAN</b>	sp Q05D32 CTSL2_HUMAN CTD small phosphatase-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=CTDSP2 PE=1 SV=2	483	53137,21	2	CTSL2_HUMAN	2
21	<b>IPYR_HUMAN</b>	sp Q15181 IPYR_HUMAN Inorganic pyrophosphatase OS=Homo sapiens GN=PPA1 PE=1 SV=2	300	33095,33	2	IPYR_HUMAN	2
22	<b>Q29196_PIG</b>	tr Q29196 Q29196_PIG Tubulin alpha-1 chain (Fragment) OS=Sus scrofa PE=2 SV=1	120	13252,26	2	Q29196_PIG	2

**Tableau R5 : Groupe 2, Protéines spécifiquement co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP.**

	Accession	Description	Length	Mass	IP-T95 #peptides	IP-T95 typical	IP-T95 Spectral Count
1	D0WVY9_SHEEP	tr D0WVY9 D0WVY9_SHEEP Tubulin beta chain OS=Ovis aries PE=1 SV=1	457	50290.1	28	D0WVY9_SHEEP	57
2	B2R853_HUMAN	tr B2R853 B2R853_HUMAN cDNA, FLJ93744, highly similar to Homo sapiens keratin 6E (KRT6E), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	560	60230.2	38	B2R853_HUMAN	44
3	B4DE77_HUMAN	tr B4DE77 B4DE77_HUMAN cDNA FLJ5189, highly similar to Tubulin beta-4 chain OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	420	46211.36	19	B4DE77_HUMAN	40
4	TBA1A_PIG	sp P02550 TBA1A_PIG Tubulin alpha-1A chain OS=Sus scrofa GN=TUBA1A PE=1 SV=1	461	50720.75	15	TBA1A_PIG	29
5	A8MUB1_HUMAN	tr A8MUB1 A8MUB1_HUMAN Putative uncharacterized protein TUBA4 OS=Homo sapiens GN=TUBA4A PE=2 SV=1	444	48873.42	15	A8MUB1_HUMAN	27
6	Q9X75 RAT	tr Q9X75 Q9X75_RAT Triadin 95kDa OS=Rattus norvegicus GN=Trdn PE=2 SV=1	702	77267.21	13	Q9X75_RAT	26
7	H2B1K_HUMAN	sp Q0814 H2B1K_HUMAN Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN=HST1H2BK PE=1 SV=3	126	13891.56	6	H2B1K_HUMAN	26
8	Q3SYX2_BOVIN	tr Q3SYX2 Q3SYX2_BOVIN HNRPM protein OS=Bos taurus GN=HNRPM PE=2 SV=2	530	58370.61	20	Q3SYX2_BOVIN	25
9	Q16195_HUMAN	tr Q16195 Q16195_HUMAN Keratin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=keratin PE=2 SV=1	252	2738.58	16	Q16195_HUMAN	23
10	B4DP54_HUMAN	tr B4DP54 B4DP54_HUMAN cDNA FLJ52712, highly similar to Tubulin beta-4 chain OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	426	46899.44	14	B4DP54_HUMAN	21
11	Q3UBP6_MOUSE	tr Q3UBP6 Q3UBP6_MOUSE Putative uncharacterized protein OS=Mus musculus GN=Actb PE=2 SV=1	382	42083.83	13	Q3UBP6_MOUSE	17
12	B2RBR9_HUMAN	tr B2RBR9 B2RBR9_HUMAN cDNA, FLJ96560, highly similar to Homo sapiens karyopherin (importin) beta 1 (KPNB1), mRNA OS=Homo sapiens	892	98225.68	12	B2RBR9_HUMAN	14
13	Q29220_PIG	tr Q29220 Q29220_PIG Tubulin alpha-3 chain (Fragment) OS=Sus scrofa PE=2 SV=1	124	13666.41	7	Q29220_PIG	11
14	B2R959_HUMAN	tr B2R959 B2R959_HUMAN cDNA, FLJ94229, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRPL), mRNA	553	60338.44	10	B2R959_HUMAN	10
15	ADT1_BOVIN	sp P02722 ADT1_BOVIN ADP/ATP translocase 1 OS=Bos taurus GN=SLC25A4 PE=1 SV=3	301	33174.35	8	ADT1_BOVIN	10
16	PRDX1_RAT	sp Q63716 PRDX1_RAT Peroxidoxin 1 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx1 PE=1 SV=1	202	22323.41	8	PRDX1_RAT	10
17	PYR1_HUMAN	sp P27708 PYR1_HUMAN CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3	2228	245167.3	9	PYR1_HUMAN	9
18	D2HLNO_ALMIE	tr D2HLNO D2HLNO_ALMIE Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Alloropoda melanoleuca GN=PANDA_012416 PE=3 SV=1	357	39290.52	8	D2HLNO_ALMIE	9
19	AS4AL2_BUBBU	tr AS4AL2 AS4AL2_BUBBU Histone H2B OS=Bubalus bubalis GN=H2B PE=2 SV=1	126	13897.56	4	AS4AL2_BUBBU	9
20	K2C3_HUMAN	sp P12035 K2C3_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 3 OS=Homo sapiens GN=KRT73 PE=1 SV=2	626	64648.59	7	K2C3_HUMAN	8
21	LAP2A_HUMAN	sp P42166 LAP2A_HUMAN Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=1 SV=2	685	75445.63	7	LAP2A_HUMAN	8
22	QCR1_HUMAN	sp P31930 QCR1_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC1 PE=1 SV=3	484	53269.69	7	QCR1_HUMAN	8
23	D3ZX56_RAT	tr D3ZX56 D3ZX56_RAT Putative uncharacterized protein ENSRNOP0000020291 OS=Rattus norvegicus PE=4 SV=1	455	50115	6	D3ZX56_RAT	8
24	DBPA_HUMAN	sp P16989 DBPA_HUMAN DNA-binding protein A OS=Homo sapiens GN=CSDA PE=1 SV=4	364	40066.03	6	DBPA_HUMAN	8
25	ATD3A_HUMAN	sp Q9N17 ATD3A_HUMAN ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS=Homo sapiens GN=ATAD3A PE=1 SV=2	650	71564.64	7	ATD3A_HUMAN	7
26	Q549N5_HUMAN	tr Q549N5 Q549N5_HUMAN Signal recognition particle receptor beta subunit OS=Homo sapiens GN=SRPRB PE=2 SV=1	269	29683.76	7	Q549N5_HUMAN	7
27	Q59Y2_HUMAN	tr Q59Y2 Q59Y2_HUMAN Ribosomal protein L4 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	447	49252.98	7	Q59Y2_HUMAN	7
28	B4DH02_HUMAN	tr B4DH02 B4DH02_HUMAN cDNA FLJ50510, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	865	95156.57	6	B4DH02_HUMAN	7
29	Q5VDD0_HUMAN	tr Q5VDD0 Q5VDD0_HUMAN Ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=2 SV=1	185	20431.58	6	Q5VDD0_HUMAN	7
30	A59B94_BOVIN	tr A59B94 A59B94_BOVIN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Bos taurus GN=HNRPH2 PE=2 SV=1	450	49503.38	5	A59B94_BOVIN	7
31	AK897_HUMAN	tr AK897 AK897_HUMAN cDNA FLJ78886, highly similar to Homo sapiens nucleoporin 93kDa (NUP93), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	848	93323.62	6	AK897_HUMAN	6
32	B4DV17_HUMAN	tr B4DV17 B4DV17_HUMAN cDNA FLJ54176, highly similar to Signal recognition particle 68kDa protein OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	547	60189.37	6	B4DV17_HUMAN	6
33	Q6AZ64_RAT	tr Q6AZ64 Q6AZ64_RAT X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6, isoform CRA, a OS=Rattus norvegicus GN=	633	69727.96	6	Q6AZ64_RAT	6
34	RBM28_HUMAN	sp Q9N17 RBM28_HUMAN RNA-binding protein 28 OS=Homo sapiens GN=RBM28 PE=1 SV=3	778	85684.74	6	RBM28_HUMAN	6
35	B2RU06_HUMAN	tr B2RU06 B2RU06_HUMAN EIF4G1 protein OS=Homo sapiens GN=EIF4G1 PE=2 SV=1	1607	176807	5	B2RU06_HUMAN	6
36	Q9XSU9_CANIFA	tr Q9XSU9 Q9XSU9_CANIFA Ribosomal protein S14 (Fragment) OS=Canis familiaris GN=rrpS14 PE=2 SV=1	76	8441.65	5	Q9XSU9_CANIFA	6
37	A2CT2_HUMAN	tr A2CT2 A2CT2_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 4-like protein OS=Homo sapiens GN=HSP4L PE=2 SV=1	867	95478.91	5	A2CT2_HUMAN	5
38	A4D0Z3_HUMAN	tr A4D0Z3 A4D0Z3_HUMAN ADP-ribosylation factor 5 OS=Homo sapiens GN=ARF5 PE=2 SV=1	187	20630.62	5	A4D0Z3_HUMAN	5
39	A8K4K6_HUMAN	tr A8K4K6 A8K4K6_HUMAN cDNA FLJ78033, highly similar to Homo sapiens protein disulfide isomerase family A, member 4, mRNA OS=H	665	73157.08	5	A8K4K6_HUMAN	5
40	B2RDG1_HUMAN	tr B2RDG1 B2RDG1_HUMAN cDNA, FLJ96593 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	542	59526.71	5	B2RDG1_HUMAN	5
41	D3DPQ3_HUMAN	tr D3DPQ3 D3DPQ3_HUMAN Retinoblastoma binding protein 4, isoform CRA, a OS=Homo sapiens GN=RBBP4 PE=4 SV=1	435	47866	5	D3DPQ3_HUMAN	5
42	A0MNN5_HUMAN	tr A0MNN5 A0MNN5_HUMAN CDW4/GRWD1 OS=Homo sapiens GN=GRWD1 PE=2 SV=1	452	49724.06	4	A0MNN5_HUMAN	5
43	B0LM41_HUMAN	tr B0LM41 B0LM41_HUMAN Transcriptional coactivator CoA2 OS=Homo sapiens GN=RBM14/RBM14 fusion PE=2 SV=1	339	37346.97	4	B0LM41_HUMAN	5
44	Q5LJ98_HUMAN	tr Q5LJ98 Q5LJ98_HUMAN Putative uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=TROVE2 PE=2 SV=1	537	59129.49	4	Q5LJ98_HUMAN	5
45	Q7Z3K9_HUMAN	tr Q7Z3K9 Q7Z3K9_HUMAN Putative uncharacterized protein DKFZp781L0540 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DKFZp781L0540 PE=1	818	90062.68	4	Q7Z3K9_HUMAN	5
46	I1C07_HUMAN	sp P10321 I1C07_HUMAN HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain OS=Homo sapiens GN=HLA-C PE=1 SV=3	373	41136.14	4	I1C07_HUMAN	4
47	AK8U1_HUMAN	tr AK8U1 AK8U1_HUMAN cDNA FLJ77762, highly similar to Homo sapiens culin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1), mR	1254	137941.3	4	AK8U1_HUMAN	4
48	AK9U6_HUMAN	tr AK9U6 AK9U6_HUMAN cDNA FLJ76121, highly similar to Homo sapiens zinc finger CCHC-type, antiviral 1 (ZC3HAV1), transcript vari	935	102879.6	4	AK9U6_HUMAN	4
49	BOAZO4_HUMAN	tr BOAZO4 BOAZO4_HUMAN cDNA, FLJ79494, highly similar to Structural maintenance of chromosome 3 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1288	141777.4	4	BOAZO4_HUMAN	4
50	B2R6D0_HUMAN	tr B2R6D0 B2R6D0_HUMAN cDNA, FLJ92896, highly similar to Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATP	970	106797.1	4	B2R6D0_HUMAN	4
51	B2R7V4_HUMAN	tr B2R7V4 B2R7V4_HUMAN cDNA, FLJ93619, highly similar to Homo sapiens PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog (yeast) (PRPF	536	58988.21	4	B2R7V4_HUMAN	4
52	B3GOE6_HUMAN	tr B3GOE6 B3GOE6_HUMAN DEAD box polypeptide 27 OS=Homo sapiens GN=DDX27 PE=2 SV=1	790	89616.46	4	B3GOE6_HUMAN	4
53	B3KMX0_HUMAN	tr B3KMX0 B3KMX0_HUMAN cDNA FLJ12837 fs, clone NT2RP200328, highly similar to DNA replication licensing factor MCM4 OS=Homo	882	97113.91	4	B3KMX0_HUMAN	4
54	B3KQ33_HUMAN	tr B3KQ33 B3KQ33_HUMAN cDNA FLJ32715 fs, clone TEST12000784, highly similar to Importin-4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1092	120180.4	4	B3KQ33_HUMAN	4
55	B3KRC6_HUMAN	tr B3KRC6 B3KRC6_HUMAN cDNA FLJ34004 fs, clone FCBB1000232, highly similar to Cytochrome P450 51A1 (EC 1.14.13.70) OS=Ho	470	51731.51	4	B3KRC6_HUMAN	4
56	B4DF41_HUMAN	tr B4DF41 B4DF41_HUMAN cDNA FLJ55677, highly similar to DNA mismatch repair protein MSH6 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1266	139261.1	4	B4DF41_HUMAN	4
57	B4DM22_HUMAN	tr B4DM22 B4DM22_HUMAN cDNA FLJ53537, highly similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 OS=Homo sapiens PE=2	909	99991.59	4	B4DM22_HUMAN	4
58	B4DPX4_HUMAN	tr B4DPX4 B4DPX4_HUMAN cDNA FLJ54106, moderately similar to Synaptic vesicle membrane protein VAT1 homolog (EC 1.1.1.1) OS=Ho	325	35038.77	4	B4DPX4_HUMAN	4
59	B4DR63_HUMAN	tr B4DR63 B4DR63_HUMAN cDNA FLJ58247, highly similar to 26S proteasome regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	375	41255.24	4	B4DR63_HUMAN	4
60	B4DY23_HUMAN	tr B4DY23 B4DY23_HUMAN cDNA FLJ61188, highly similar to Basigin OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	280	28642.42	4	B4DY23_HUMAN	4
61	CDC2_HUMAN	sp P08483 CDC2_HUMAN Cell division control protein 2 homolog OS=Homo sapiens GN=CDC2 PE=1 SV=2	310	34116.89	4	CDC2_HUMAN	4
62	DYHC1_HUMAN	sp Q14234 DYHC1_HUMAN Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=DYNC1H1 PE=1 SV=5	4861	53489.98	4	DYHC1_HUMAN	4
63	MLEC_HUMAN	sp Q14165 MLEC_HUMAN Mlectin OS=Homo sapiens GN=MLEC PE=1 SV=1	294	32394.65	4	MLEC_HUMAN	4
64	NOL11_HUMAN	sp Q9H8H0 NOL11_HUMAN Nucleolar protein 11 OS=Homo sapiens GN=NOL11 PE=1 SV=1	745	82047.28	4	NOL11_HUMAN	4
65	NOMO1_HUMAN	sp Q15155 NOMO1_HUMAN Nodal modulator 1 OS=Homo sapiens GN=NOMO1 PE=1 SV=5	1229	132502.8	4	NOMO1_HUMAN	4
66	NOP58_HUMAN	sp Q9Y2X3 NOP58_HUMAN Nucleolar protein 58 OS=Homo sapiens GN=NOP58 PE=1 SV=1	541	59540.52	4	NOP58_HUMAN	4
67	PR57_HUMAN	sp P35998 PR57_HUMAN 26S protease regulatory subunit 7 OS=Homo sapiens GN=PSMC2 PE=1 SV=3	445	49002.27	4	PR57_HUMAN	4
68	Q1XH33_PANTR	tr Q1XH33 Q1XH33_PANTR Major histocompatibility complex class I, C OS=Pan troglodytes GN=Patr-C PE=3 SV=1	375	41318.27	4	Q1XH33_PANTR	4
69	Q5TCU6_HUMAN	tr Q5TCU6 Q5TCU6_HUMAN Talin 1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=2 SV=1	2363	260030.3	4	Q5TCU6_HUMAN	4
70	RL10A_PIG	sp P53027 RL10A_PIG 60S ribosomal protein L10a (Fragment) OS=Sus scrofa GN=RPL10A PE=2 SV=3	172	18953.97	4	RL10A_PIG	4
71	STT3A_HUMAN	sp P46977 STT3A_HUMAN Dolichyl-diphosphoglycerate-protein glycosyltransferase subunit STT3A OS=Homo sapiens GN=STT3A	737	81100.08	4	STT3A_HUMAN	4
72	DDX47_HUMAN	sp Q9H0S4 DDX47_HUMAN Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47 OS=Homo sapiens GN=DDX47 PE=1 SV=1	462	50854.64	3	DDX47_HUMAN	4
73	WDR82_HUMAN	sp Q9U9N9 WDR82_HUMAN WD repeat-containing protein 82 OS=Homo sapiens GN=WDR82 PE=1 SV=1	322	35455.62	3	WDR82_HUMAN	4
74	A0LQ5_HUMAN	tr A0LQ5 A0LQ5_HUMAN BXDC2 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=BXDC2 PE=2 SV=1	358	39384.85	3	A0LQ5_HUMAN	3
75	A0LUU0_HUMAN	tr A0LUU0 A0LUU0_HUMAN TCOF1 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TCOF1 PE=2 SV=1	1343	144244.8	3	A0LUU0_HUMAN	3
76	A2829_HUMAN	tr A2829 A2829_HUMAN NF-kappaB repressing factor (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NKRF PE=2 SV=1	612	67408.19	3	A2829_HUMAN	3
77	AK8V6_HUMAN	tr AK8V6 AK8V6_HUMAN cDNA FLJ78321 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	203	22396.23	3	AK8V6_HUMAN	3
78	AK83A8_HUMAN	tr AK83A8 AK83A8_HUMAN cDNA FLJ75085, highly similar to Homo sapiens glutaminyl-tRNA synthetase (QARS), mRNA OS=Homo sapi	806	88665.24	3	AK83A8_HUMAN	3
79	AK84K9_HUMAN	tr AK84K9 AK84K9_HUMAN cDNA FLJ76109 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	318	35010.48	3	AK84K9_HUMAN	3
80	AK84T8_HUMAN	tr AK84T8 AK84T8_HUMAN Condensin complex subunit 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	756	83255.52	3	AK84T8_HUMAN	3
81	AK85Y7_HUMAN	tr AK85Y7 AK85Y7_HUMAN cDNA FLJ78655, highly similar to Homo sapiens exportin 5 (XPO5), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1257	138331	3	AK85Y7_HUMAN	3
82	AK88B2_HUMAN	tr AK88B2 AK88B2_HUMAN cDNA FLJ78127, highly similar to Homo sapiens SFRS protein kinase 1 (SRPK1), mRNA OS=Homo sapiens P	690	74811.16	3	AK88B2_HUMAN	3
83	AK8AH7_HUMAN	tr AK8AH7 AK8AH7_HUMAN cDNA FLJ75444, highly similar to Homo sapiens protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha (PR	416	45818.07	3	AK8AH7_HUMAN	3
84	A8MXX9_HUMAN	tr A8MXX9 A8MXX9_HUMAN Putative uncharacterized protein DCTN1 OS=Homo sapiens GN=DCTN1 PE=4 SV=1	1294	142361.4	3	A8MXX9_HUMAN	3
85	ABCE1_HUMAN	sp P61221 ABCE1_HUMAN ATP-binding cassette sub-family E member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCE1 PE=1 SV=1	620	68240.38	3	ABCE1_HUMAN	3
86	ATPSL_HUMAN	sp Q75984 ATPSL_HUMAN ATP synthase subunit g, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATPSL PE=1 SV=3	103	11421.24	3	ATPSL_HUMAN	3
87	B0S7P4_HUMAN	tr B0S7P4 B0S7P4_HUMAN Mitochondrial ribosomal protein S18B OS=Homo sapiens GN=MRPS18B PE=2 SV=1	267	29377.01	3	B0S7P4_HUMAN	3
88	B0V043_HUMAN	tr B0V043 B0V043_HUMAN Valyl-tRNA synthetase OS=Homo sapiens GN=VARS PE=3 SV=1	1287	141631.8	3	B0V043_HUMAN	3
89	B2RDK6_HUMAN	tr B2RDK6 B2RDK6_HUMAN cDNA, FLJ96556, highly similar to Homo sapiens SPFH domain family, member 1 (SPFH1), mRNA OS=Homo	354	39031.29	3	B2RDK6_HUMAN	3
90	B3KMV5_HUMAN	tr B3KMV5 B3KMV5_HUMAN cDNA FLJ12728 fs, clone NT2RP200040, highly similar to Protein FAM82A OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1121	123342.2	3	B3KMV5_HUMAN	3
91	B3KNF6_HUMAN	tr B3KNF6 B3KNF6_HUMAN Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae), isoform CRA, c OS=Homo sapiens GN=SEC61A1 PE=2 SV=1	479	52686.69	3	B3KNF6_HUMAN	3
92	B3KQ43_HUMAN	tr B3KQ43 B3KQ43_HUMAN cDNA FLJ32791 fs, clone TEST1202365, highly similar to helicase MOV10 (EC 3.6.1.1) OS=Homo sapiens P	428	42078.48	3	B3KQ43_HUMAN	3
93	B3KRS5_HUMAN	tr B3KRS5 B3KRS5_HUMAN Histone deacetylase 2, isoform CRA, a OS=Homo sapiens GN=HDAC2 PE=2 SV=1	477	52478.51	3	B3KRS5_HUMAN	3
94	B4DFL2_HUMAN	tr B4DFL2 B4DFL2_HUMAN cDNA FLJ50469, highly similar to Isocitrate dehydrogenase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	414	45459.93	3	B4DFL2_HUMAN	3
95	B4DK2_HUMAN	tr B4DK2 B4DK2_HUMAN cDNA FLJ60565, highly similar to Nuclear pore complex protein Nup153 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1441	158589.7	3	B4DK2_HUMAN	3
96	B4DJ30_HUMAN	tr B4DJ30 B4DJ30_HUMAN cDNA FLJ61290, highly similar to Neutral alpha-glucosidase AB OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1032	113538.8	3	B4DJ30_HUMAN	3
97	B4DJK0_HUMAN	tr B4DJK0 B4DJK0_HUMAN cDNA FLJ57379, highly similar to Splicing factor, arginine/serine-rich 5 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	132	14572.3	3	B4DJK0_HUMAN	3
98	B4DK71_HUMAN	tr B4DK71 B4DK71_HUMAN cDNA FLJ55660, highly similar to Homo sapiens SAC1 suppressor of actin mutations 1-like (SACML), mRNA	557	61326.79	3	B4DK71_HUMAN	3
99	B4DKZ6_HUMAN	tr B4DKZ6 B4DKZ6_HUMAN cDNA FLJ61096, highly similar to THO complex subunit 2 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	882	97106.66	3	B4DKZ6_HUMAN	3

100	B4DLG2_HUMAN	tr B4DLG2 B4DLG2_HUMAN cDNA FLJ58196, highly similar to Zinc finger CCHC domain-containing protein 11A OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	755	83105.14	3	B4DLG2_HUMAN	3
101	B4DLT2_HUMAN	tr B4DLT2 B4DLT2_HUMAN cDNA FLJ56637, highly similar to Nuclear pore complex protein Nup155 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1388	162733.9	3	B4DLT2_HUMAN	3
102	B4DRS4_HUMAN	tr B4DRS4 B4DRS4_HUMAN cDNA FLJ60139, highly similar to Homo sapiens HIV TAT specific factor 1 (HTATSF1), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	750	82542.13	3	B4DRS4_HUMAN	3
103	B4DFZ2_HUMAN	tr B4DFZ2 B4DFZ2_HUMAN cDNA FLJ59571, highly similar to Eukaryotic translation initiation factor 4gamma 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1007	110817.4	3	B4DFZ2_HUMAN	3
104	B4EOG4_HUMAN	tr B4EOG4 B4EOG4_HUMAN cDNA FLJ60207, highly similar to PHD finger protein 6 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	341	37604.09	3	B4EOG4_HUMAN	3
105	B7Z8M7_HUMAN	tr B7Z8M7 B7Z8M7_HUMAN cDNA FLJ57768, highly similar to Ras-related protein Rab-1A OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	174	19205.67	3	B7Z8M7_HUMAN	3
106	B7Z841_HUMAN	tr B7Z841 B7Z841_HUMAN cDNA, FLJ79405, highly similar to Homo sapiens solute carrier family 25, member 24, transcript variant 1, mRNA	486	53540.32	3	B7Z841_HUMAN	3
107	CA077_HUMAN	sp Q9Y3Y2 CA077_HUMAN Uncharacterized protein C1orf77 OS=Homo sapiens GN=C1orf77 PE=1 SV=2	239	26380.28	3	CA077_HUMAN	3
108	CCD47_HUMAN	sp Q96A33 CCD47_HUMAN Coiled-coil domain-containing protein 47 OS=Homo sapiens GN=CCDC47 PE=1 SV=1	510	56123.42	3	CCD47_HUMAN	3
109	COX41_HUMAN	sp P13073 COX41_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX41 PE=1 SV=1	178	19621.07	3	COX41_HUMAN	3
110	D3DUS7_HUMAN	tr D3DUS7 D3DUS7_HUMAN Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase OS=Homo sapiens GN=USP5 PE=3 SV=1	878	96637.68	3	D3DUS7_HUMAN	3
111	DSG2_HUMAN	sp Q14126 DSG2_HUMAN Desmoglein-2 OS=Homo sapiens GN=DSG2 PE=1 SV=2	1117	122889.4	3	DSG2_HUMAN	3
112	GCN1L_HUMAN	sp Q92616 GCN1L_HUMAN Translational activator GCN1 OS=Homo sapiens GN=GCN1L1 PE=1 SV=6	2681	294967.4	3	GCN1L_HUMAN	3
113	HNRL2_HUMAN	sp Q1K1M3 HNRL2_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=HNRPUL2 PE=1 SV=1	778	85622.38	3	HNRL2_HUMAN	3
114	LUC7L_HUMAN	sp Q9NQ29 LUC7L_HUMAN Putative RNA-binding protein Luc7-like 1 OS=Homo sapiens GN=LUC7L PE=1 SV=1	397	43701.32	3	LUC7L_HUMAN	3
115	MBB1A_HUMAN	sp Q9BG0Q MBB1A_HUMAN Myb-binding protein 1A OS=Homo sapiens GN=MYBB1A PE=1 SV=2	1359	149577.4	3	MBB1A_HUMAN	3
116	PSD12_HUMAN	sp Q02323 PSD12_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Homo sapiens GN=PSMD12 PE=1 SV=3	484	53269.72	3	PSD12_HUMAN	3
117	QA1GY1_HUMAN	tr QA1GY1 QA1GY1_HUMAN Cellular nucleic acid binding protein beta variant 1 OS=Homo sapiens GN=ZNF9 PE=2 SV=1	182	20112.76	3	QA1GY1_HUMAN	3
118	Q5U0C0_HUMAN	tr Q5U0C0 Q5U0C0_HUMAN Ribosomal protein L15 OS=Homo sapiens GN=RPL15 PE=1 SV=1	220	24227.05	3	Q5U0C0_HUMAN	3
119	RAB14_HUMAN	sp P11061 RAB14_HUMAN Ras-related protein Rab-14 OS=Homo sapiens GN=RAB14 PE=1 SV=4	219	24110.01	3	RAB14_HUMAN	3
120	RT34_HUMAN	sp P82930 RT34_HUMAN 28S ribosomal protein S34, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS34 PE=1 SV=2	233	25682.47	3	RT34_HUMAN	3
121	TDF2_HUMAN	sp Q5QJ61 TDF2_HUMAN Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=DNITIP2 PE=1 SV=2	767	84417.86	3	TDF2_HUMAN	3
122	TOM40_HUMAN	sp O96008 TOM40_HUMAN Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog OS=Homo sapiens GN=TOMM40 PE=1 SV=1	348	38211.27	3	TOM40_HUMAN	3
123	B2R4C0_HUMAN	tr B2R4C0 B2R4C0_HUMAN cDNA, FLJ92035, highly similar to Homo sapiens ribosomal protein L18a (RPL18A), mRNA OS=Homo sapiens	190	20978.8	2	B2R4C0_HUMAN	3
124	TM205_HUMAN	sp Q9UW68 TM205_HUMAN Transmembrane protein 205 OS=Homo sapiens GN=TMEM205 PE=1 SV=1	195	21469	2	TM205_HUMAN	3
125	AFJ47_HUMAN	tr AFJ47 AFJ47_HUMAN SAFB2 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SAFB2 PE=2 SV=1	521	57340.06	2	AFJ47_HUMAN	2
126	A3RJH1_HUMAN	tr A3RJH1 A3RJH1_HUMAN DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1, isoform CRA_d OS=Homo sapiens GN=DDX1 PE=2 SV=1	748	82379.76	2	A3RJH1_HUMAN	2
127	A6NEL6_HUMAN	tr A6NEL6 A6NEL6_HUMAN Putative uncharacterized protein LARP4B OS=Homo sapiens GN=LARP4B PE=4 SV=3	362	39647.5	2	A6NEL6_HUMAN	2
128	A6NEM2_HUMAN	tr A6NEM2 A6NEM2_HUMAN Putative uncharacterized protein HFC1 OS=Homo sapiens GN=HFC1 PE=4 SV=2	1957	215338.4	2	A6NEM2_HUMAN	2
129	A6C120_HUMAN	tr A6C120 A6C120_HUMAN 150 kDa oxygen-regulated protein OS=Homo sapiens GN=ORP150 PE=2 SV=1	1013	111494.3	2	A6C120_HUMAN	2
130	A8K0D2_HUMAN	tr A8K0D2 A8K0D2_HUMAN cDNA FLJ77740, highly similar to Homo sapiens 7-dehydrocholesterol reductase, mRNA OS=Homo sapiens P	503	55170.05	2	A8K0D2_HUMAN	2
131	A8K3Y5_HUMAN	tr A8K3Y5 A8K3Y5_HUMAN cDNA FLJ78186 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	399	43979.77	2	A8K3Y5_HUMAN	2
132	A8K3Z5_HUMAN	tr A8K3Z5 A8K3Z5_HUMAN cDNA FLJ76613, highly similar to Homo sapiens nucleoporin 35kDa (NUP35), transcript variant 1, mRNA OS=H	317	34906.58	2	A8K3Z5_HUMAN	2
133	A8K479_HUMAN	tr A8K479 A8K479_HUMAN cDNA FLJ77421, highly similar to Homo sapiens autophagic p542 mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	277	30475.7	2	A8K479_HUMAN	2
134	A8K6I4_HUMAN	tr A8K6I4 A8K6I4_HUMAN cDNA FLJ76877, highly similar to Homo sapiens superantigen virilicidin 2-like 2 (SKV2L2), mRNA OS=Homo	1078	116939.2	2	A8K6I4_HUMAN	2
135	A8K7A6_HUMAN	tr A8K7A6 A8K7A6_HUMAN cDNA FLJ71162, highly similar to Homo sapiens SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1 (SMC	899	98960.74	2	A8K7A6_HUMAN	2
136	A8K847_HUMAN	tr A8K847 A8K847_HUMAN cDNA FLJ75229, highly similar to Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4 (SE	409	44995.59	2	A8K847_HUMAN	2
137	A8K8J9_HUMAN	tr A8K8J9 A8K8J9_HUMAN Dynactin 2 (P50), isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=DCTN2 PE=2 SV=1	314	34579.25	2	A8K8J9_HUMAN	2
138	A8K9B9_HUMAN	tr A8K9B9 A8K9B9_HUMAN cDNA FLJ73791, highly similar to Homo sapiens EH-domain containing 4 (EHD4), mRNA OS=Homo sapiens P	557	61345.57	2	A8K9B9_HUMAN	2
139	A8MUM5_HUMAN	tr A8MUM5 A8MUM5_HUMAN Putative uncharacterized protein TOR1AIP1 OS=Homo sapiens GN=TOR1AIP1 PE=4 SV=2	604	66540.36	2	A8MUM5_HUMAN	2
140	A8MXH2_HUMAN	tr A8MXH2 A8MXH2_HUMAN Putative uncharacterized protein NAP1L4 OS=Homo sapiens GN=NAP1L4 PE=3 SV=1	204	22488.28	2	A8MXH2_HUMAN	2
141	ACSL4_HUMAN	sp Q80489 ACSL4_HUMAN Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4 OS=Homo sapiens GN=ACSL4 PE=1 SV=2	729	80220.15	2	ACSL4_HUMAN	2
142	AMP1_HUMAN	sp Q12904 AMP1_HUMAN Aminocyclitol synthase complex-interacting multifunctional protein 1 OS=Homo sapiens GN=AMP1 PE=1 SV	314	34616.22	2	AMP1_HUMAN	2
143	AMP2_HUMAN	sp P50579 AMP2_HUMAN Methionine aminopeptidase 2 OS=Homo sapiens GN=METAP2 PE=1 SV=1	488	53713.46	2	AMP2_HUMAN	2
144	ARL1_HUMAN	sp P40616 ARL1_HUMAN ADP-ribosylation factor-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=ARL1 PE=1 SV=1	186	20518.48	2	ARL1_HUMAN	2
145	AT2B1_HUMAN	sp P23020 AT2B1_HUMAN Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 OS=Homo sapiens GN=ATP2B1 PE=1 SV=3	1269	139637.2	2	AT2B1_HUMAN	2
146	B1AHF3_HUMAN	tr B1AHF3 B1AHF3_HUMAN Cytochrome b5 reductase 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CYB5B3 PE=4 SV=1	151	16686.93	2	B1AHF3_HUMAN	2
147	B2R4R9_HUMAN	tr B2R4R9 B2R4R9_HUMAN HCG26477 OS=Homo sapiens GN=RP928 PE=4 SV=1	71	7893.22	2	B2R4R9_HUMAN	2
148	B2R5U3_HUMAN	tr B2R5U3 B2R5U3_HUMAN EH-domain containing 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=EHD1 PE=2 SV=1	551	60465.68	2	B2R5U3_HUMAN	2
149	B2R6D7_HUMAN	tr B2R6D7 B2R6D7_HUMAN cDNA, FLJ92904, highly similar to Homo sapiens casein kinase 2, alpha 1 polypeptide (CSNK2A1), mRNA OS	410	45184.76	2	B2R6D7_HUMAN	2
150	B2R791_HUMAN	tr B2R791 B2R791_HUMAN cDNA, FLJ93335, highly similar to Homo sapiens PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast) (PRPF	705	77638.9	2	B2R791_HUMAN	2
151	B2R7W0_HUMAN	tr B2R7W0 B2R7W0_HUMAN cDNA, FLJ93628, Homo sapiens methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (NAD-dependent), methylenetetra	340	37467.98	2	B2R7W0_HUMAN	2
152	B2RAR5_HUMAN	tr B2RAR5 B2RAR5_HUMAN cDNA, FLJ95067 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	977	107517.5	2	B2RAR5_HUMAN	2
153	B2RAX6_HUMAN	tr B2RAX6 B2RAX6_HUMAN cDNA, FLJ95176, Homo sapiens CGH-48 protein (CGH48), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	524	57671.14	2	B2RAX6_HUMAN	2
154	B2RD24_HUMAN	tr B2RD24 B2RD24_HUMAN cDNA, FLJ96424 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	729	80216.12	2	B2RD24_HUMAN	2
155	B2RD96_HUMAN	tr B2RD96 B2RD96_HUMAN cDNA, FLJ96514 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	213	23524.29	2	B2RD96_HUMAN	2
156	B2RWNS_HUMAN	tr B2RWNS B2RWNS_HUMAN HEAT repeat containing 1 OS=Homo sapiens GN=HEATR1 PE=2 SV=1	2220	24475.1	2	B2RWNS_HUMAN	2
157	B2RW9P_HUMAN	tr B2RW9P B2RW9P_HUMAN protein OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=2 SV=1	2097	230270.24	2	B2RW9P_HUMAN	2
158	B3KM81_HUMAN	tr B3KM81 B3KM81_HUMAN cDNA FLJ10471, clone NT2R2P000045, highly similar to DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondr	455	50079.97	2	B3KM81_HUMAN	2
159	B3KM85_HUMAN	tr B3KM85 B3KM85_HUMAN cDNA FLJ10686, clone NT2R2P0000252, highly similar to Nuclear GTP-binding protein 1 OS=Homo sapi	674	7423.67	2	B3KM85_HUMAN	2
160	B3KMP6_HUMAN	tr B3KMP6 B3KMP6_HUMAN cDNA FLJ11861, clone HEMBA1006885, highly similar to Uroline synthetase co-reduced bacterial homo	238	26206.26	2	B3KMP6_HUMAN	2
161	B3KPV5_HUMAN	tr B3KPV5 B3KPV5_HUMAN cDNA FLJ32300, clone PROST2002227, highly similar to U3 small nuclear ribonucleoprotein protein MPP	694	76412.21	2	B3KPV5_HUMAN	2
162	B3KRR8_HUMAN	tr B3KRR8 B3KRR8_HUMAN cDNA FLJ34760, clone NT2NE2001889, highly similar to WD repeat protein 6 OS=Homo sapiens PE=2 SV	343	37764	2	B3KRR8_HUMAN	2
163	B3KTJ9_HUMAN	tr B3KTJ9 B3KTJ9_HUMAN cDNA FLJ38393, clone FEBRA2007212 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	940	103493	2	B3KTJ9_HUMAN	2
164	B3KU91_HUMAN	tr B3KU91 B3KU91_HUMAN cDNA FLJ33831, clone PERIC2004422, highly similar to HEAT repeat-containing protein 2 OS=Homo sapi	612	67391.95	2	B3KU91_HUMAN	2
165	B3KUJ0_HUMAN	tr B3KUJ0 B3KUJ0_HUMAN cDNA FLJ39996, clone STOMA2002166, highly similar to Splicing factor 3B subunit 4 OS=Homo sapiens PE	404	44503.18	2	B3KUJ0_HUMAN	2
166	B3KW72_HUMAN	tr B3KW72 B3KW72_HUMAN cDNA FLJ43638, clone SPLEN2003945, highly similar to IMPORTIN ALPHA-1 SUBUNIT OS=Homo sapi	346	38087.27	2	B3KW72_HUMAN	2
167	B3KY63_HUMAN	tr B3KY63 B3KY63_HUMAN cDNA FLJ16830, clone UTERU3022536, highly similar to Chromodomain helicase-DNA-binding protein 4 (EC	1955	215148.9	2	B3KY63_HUMAN	2
168	B4DDM6_HUMAN	tr B4DDM6 B4DDM6_HUMAN cDNA FLJ57899, highly similar to Mitotic checkpoint protein BUB3 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	260	28620.03	2	B4DDM6_HUMAN	2
169	B4DH29_HUMAN	tr B4DH29 B4DH29_HUMAN DNA-directed RNA polymerase OS=Homo sapiens GN=POLR2B PE=2 SV=1	1148	126336.34	2	B4DH29_HUMAN	2
170	B4DH89_HUMAN	tr B4DH89 B4DH89_HUMAN cDNA FLJ58887, highly similar to Anamorsin (Cytokine-induced apoptosis inhibitor 1) (CUA001) OS=Homo sa	199	21930.53	2	B4DH89_HUMAN	2
171	B4DI5_HUMAN	tr B4DI5 B4DI5_HUMAN cDNA FLJ33988, highly similar to Importin alpha-7 subunit OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	548	60344.59	2	B4DI5_HUMAN	2
172	B4DL39_HUMAN	tr B4DL39 B4DL39_HUMAN cDNA FLJ57316, highly similar to DNA mismatch repair protein Msh2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	697	76740.27	2	B4DL39_HUMAN	2
173	B4DQI6_HUMAN	tr B4DQI6 B4DQI6_HUMAN cDNA FLJ50614, highly similar to Transformer-2 protein homolog OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	187	20633.98	2	B4DQI6_HUMAN	2
174	B4DQK8_HUMAN	tr B4DQK8 B4DQK8_HUMAN cDNA FLJ54750, moderately similar to Pyruvate-5-carboxylate reductase 2 (EC 1.5.1.2) OS=Homo sapiens P	336	37008.69	2	B4DQK8_HUMAN	2
175	B4DRG9_HUMAN	tr B4DRG9 B4DRG9_HUMAN cDNA FLJ51951, highly similar to Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 (Fragment) OS=	680	74869.5	2	B4DRG9_HUMAN	2
176	B4DT58_HUMAN	tr B4DT58 B4DT58_HUMAN cDNA FLJ54147, highly similar to Zinc finger protein ubi-4 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	218	24039.7	2	B4DT58_HUMAN	2
177	B4DTK7_HUMAN	tr B4DTK7 B4DTK7_HUMAN cDNA FLJ61387, highly similar to Homo sapiens conserved nuclear protein NHN1 (NHN1), mRNA OS=Homo	992	109141.1	2	B4DTK7_HUMAN	2
178	B4DUT2_HUMAN	tr B4DUT2 B4DUT2_HUMAN cDNA FLJ53206 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	805	88654.75	2	B4DUT2_HUMAN	2
179	B4E040_HUMAN	tr B4E040 B4E040_HUMAN cDNA FLJ55177, highly similar to Ras-related protein Rab-B OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	237	26121.3	2	B4E040_HUMAN	2
180	B7Z522_HUMAN	tr B7Z522 B7Z522_HUMAN cDNA FLJ61162, highly similar to Ras-related protein R-Ras2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	221	24372.09	2	B7Z522_HUMAN	2
181	B7Z6I3_HUMAN	tr B7Z6I3 B7Z6I3_HUMAN DNA ligase OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	747	82270.04	2	B7Z6I3_HUMAN	2
182	B7Z8P5_HUMAN	tr B7Z8P5 B7Z8P5_HUMAN cDNA FLJ51438, highly similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36 (EC 3.6.1.-) (Fragment) OS=	917	100935	2	B7Z8P5_HUMAN	2
183	B9ZVX0_HUMAN	tr B9ZVX0 B9ZVX0_HUMAN Diaphanous homolog 1 (Drosophila), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=DIAPH1 PE=4 SV=1	1267	139472.6	2	B9ZVX0_HUMAN	2
184	BYST_HUMAN	sp Q13895 BYST_HUMAN Bystin OS=Homo sapiens GN=BYSL PE=1 SV=3	452	49761.94	2	BYST_HUMAN	2
185	C9J436_HUMAN	tr C9J436 C9J436_HUMAN Putative uncharacterized protein PRRC1 OS=Homo sapiens GN=PRRC1 PE=4 SV=1	448	48493.81	2	C9J436_HUMAN	2
186	C9J4Z3_HUMAN	tr C9J4Z3 C9J4Z3_HUMAN Putative uncharacterized protein RPL37A OS=Homo sapiens GN=RPL37A PE=4 SV=1	69	7618.94	2	C9J4Z3_HUMAN	2
187	C9J8W7_HUMAN	tr C9J8W7 C9J8W7_HUMAN HCG18290 OS=Homo sapiens GN=HCG_18290 PE=4 SV=1	143	15836.61	2	C9J8W7_HUMAN	2
188	C9JBR1_HUMAN	tr C9JBR1 C9JBR1_HUMAN Putative uncharacterized protein RIF1 OS=Homo sapiens GN=RIF1 PE=4 SV=1	2468	271533.7	2	C9JBR1_HUMAN	2
189	C9JH19_HUMAN	tr C9JH19 C9JH19_HUMAN Putative uncharacterized protein CTSD OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=3 SV=1	298	32885.44	2	C9JH19_HUMAN	2
190	C9JYF2_HUMAN	tr C9JYF2 C9JYF2_HUMAN Putative uncharacterized protein FAM162A OS=Homo sapiens GN=FAM162A PE=4 SV=1	152	16732.81	2	C9JYF2_HUMAN	2
191	CC124_HUMAN	sp Q96C77 CC124_HUMAN Coiled-coil domain-containing protein 124 OS=Homo sapiens GN=CCDC124 PE=1 SV=1	234	25819.56	2	CC124_HUMAN	2
192	CIR1A_HUMAN	sp Q96936 CIR1A_HUMAN Cirhin OS=Homo sapiens GN=CIRH1A PE=1 SV=1	704	77525.65	2	CIR1A_HUMAN	2
193	CLPX_HUMAN	sp O76031 CLPX_HUMAN ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CLPX PE=1 SV	635	69922.01	2	CLPX_HUMAN	2
194	CND3_HUMAN	sp Q9BFX3 CND3_HUMAN Condensin complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=NCAPG PE=1 SV=1	1048	115345.5	2	CND3_HUMAN	2
195	COX5A_HUMAN	sp P20674 COX5A_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=2	153	16922.75	2	COX5A_HUMAN	2
196	D3DNQ9_HUMAN	tr D3DNQ9 D3DNQ9_HUMAN Transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=TLX1R1 PE=4 SV=1	510	56187.32	2	D3DNQ9_HUMAN	2
197	D3DP46_HUMAN	tr D3DP46 D3DP46_HUMAN Signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SPCS3	185	20356.58	2	D3DP46_HUMAN	2
198	D3DQA4_HUMAN	tr D3DQA4 D3DQA4_HUMAN SAR1 gene homolog B (S. cerevisiae), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SAR1B PE=2 SV=1	204	22509.55	2	D3DQA4_HUMAN	2
199	D3D6V7_HUMAN	tr D3D6V7 D3D6V7_HUMAN HCG1996054, isoform CRA_e OS=Homo sapiens GN=HCG_1996054 PE=3 SV=1	208	22987.83	2	D3D6V7_HUMAN	2

200	DYL1_HUMAN	sp P61367 DYL1_HUMAN Dynein light chain 1, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=DYNLL1 PE=1 SV=1	94	10359,11	2	DYL1_HUMAN	2
201	ESYT2_HUMAN	sp A0FGR8 ESYT2_HUMAN Extended synaptotagmin-2 OS=Homo sapiens GN=ESYT2 PE=1 SV=1	934	102807,1	2	ESYT2_HUMAN	2
202	F120A_HUMAN	sp Q9N2B3 F120A_HUMAN Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=FAM120A PE=1 SV=2	1118	123008	2	F120A_HUMAN	2
203	FAB9A_HUMAN	sp Q8NCA5 FAB9A_HUMAN FAB9A OS=Homo sapiens GN=FAB9A PE=1 SV=1	507	55822,51	2	FAB9A_HUMAN	2
204	GSDMA_HUMAN	sp Q96Q45 GSDMA_HUMAN Gasdermin-A OS=Homo sapiens GN=GSDMA PE=2 SV=4	451	49618,93	2	GSDMA_HUMAN	2
205	HM13_HUMAN	sp Q8TCT9 HM13_HUMAN Minor histocompatibility antigen H13 OS=Homo sapiens GN=HM13 PE=1 SV=1	379	41746,66	2	HM13_HUMAN	2
206	IPO8_HUMAN	sp O15397 IPO8_HUMAN Importin-8 OS=Homo sapiens GN=IPO8 PE=1 SV=2	1099	120944,7	2	IPO8_HUMAN	2
207	KI67_HUMAN	sp P46013 KI67_HUMAN Antigen KI-67 OS=Homo sapiens GN=MKI67 PE=1 SV=2	3275	360345,2	2	KI67_HUMAN	2
208	LARP7_HUMAN	sp Q4G0J3 LARP7_HUMAN La-related protein 7 OS=Homo sapiens GN=LARP7 PE=1 SV=1	610	67142,52	2	LARP7_HUMAN	2
209	LBR_HUMAN	sp Q14739 LBR_HUMAN Lamin-B receptor OS=Homo sapiens GN=LBR PE=1 SV=2	645	70993,92	2	LBR_HUMAN	2
210	LYRIC_HUMAN	sp Q86UE4 LYRIC_HUMAN Protein LYRIC OS=Homo sapiens GN=MTDH PE=1 SV=2	579	63798,81	2	LYRIC_HUMAN	2
211	MEP50_HUMAN	sp Q9BQA1 MEP50_HUMAN Methylosome protein 50 OS=Homo sapiens GN=WDR77 PE=1 SV=1	333	36701,07	2	MEP50_HUMAN	2
212	NDU4A_HUMAN	sp Q00483 NDU4A_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=NDU4A PE=1 SV=2	85	9411,9	2	NDU4A_HUMAN	2
213	NDU53_HUMAN	sp O75489 NDU53_HUMAN NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDU53 PE=1 SV=1	275	30318,68	2	NDU53_HUMAN	2
214	NNMT_HUMAN	sp Q13423 NNMT_HUMAN NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NNMT PE=1 SV=3	1041	114563,8	2	NNMT_HUMAN	2
215	NUMA1_HUMAN	sp Q14980 NUMA1_HUMAN Nuclear mitotic apparatus protein 1 OS=Homo sapiens GN=NUMA1 PE=1 SV=2	2164	23815,2	2	NUMA1_HUMAN	2
216	NXF1_HUMAN	sp Q9UBU9 NXF1_HUMAN Nuclear RNA export factor 1 OS=Homo sapiens GN=NXF1 PE=1 SV=1	641	70570,55	2	NXF1_HUMAN	2
217	OXSR1_HUMAN	sp O85747 OXSR1_HUMAN Serine/threonine-protein kinase OSR1 OS=Homo sapiens GN=OXSR1 PE=1 SV=1	529	58271,16	2	OXSR1_HUMAN	2
218	P97621_RAT	tr P97621 P97621_RAT Polyubiquitin (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Uba52 PE=2 SV=1	41	4605,39	2	P97621_RAT	2
219	PAF1_HUMAN	sp Q8N7H5 PAF1_HUMAN RNA polymerase II-associated factor 1 homolog OS=Homo sapiens GN=PAF1 PE=1 SV=2	546	60083,06	2	PAF1_HUMAN	2
220	PMT_HUMAN	sp P12061 PMT_HUMAN Protein-L-isospartate (D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=3	225	24805,65	2	PMT_HUMAN	2
221	PRP8_HUMAN	sp Q8P2C9 PRP8_HUMAN Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 OS=Homo sapiens GN=PRPF8 PE=1 SV=2	2495	274530,2	2	PRP8_HUMAN	2
222	PWP2_HUMAN	sp Q15269 PWP2_HUMAN Periodic tryptophan protein 2 homolog OS=Homo sapiens GN=PWP2 PE=1 SV=2	939	10356,6	2	PWP2_HUMAN	2
223	Q2NKT5_BOVIN	tr Q2NKT5 Q2NKT5_BOVIN Sec61 beta subunit OS=Bos taurus GN=SEC61B PE=4 SV=1	90	9995,11	2	Q2NKT5_BOVIN	2
224	Q32P46_HUMAN	tr Q32P46 Q32P46_HUMAN Mitochondrial ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=MRPL11 PE=2 SV=1	165	18251,02	2	Q32P46_HUMAN	2
225	Q53G2_HUMAN	tr Q53G2 Q53G2_HUMAN RAB4A, member RAS oncogene family variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	223	24601,32	2	Q53G2_HUMAN	2
226	Q53H34_HUMAN	tr Q53H34 Q53H34_HUMAN Ribosomal protein L13a variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	214	23591,32	2	Q53H34_HUMAN	2
227	Q68E02_HUMAN	tr Q68E02 Q68E02_HUMAN Putative uncharacterized protein DKFZp686I1650 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DKFZp686I1650 PE=2 SV=1	718	78995,42	2	Q68E02_HUMAN	2
228	Q96F8_HUMAN	tr Q96F8 Q96F8_HUMAN ACAT1 protein OS=Homo sapiens GN=ACAT1 PE=2 SV=1	158	17475,34	2	Q96F8_HUMAN	2
229	RAB8A_HUMAN	sp P61006 RAB8A_HUMAN Ras-related protein Rab-8A OS=Homo sapiens GN=RAB8A PE=1 SV=1	216	23824,25	2	RAB8A_HUMAN	2
230	RBM26_HUMAN	sp P81696 RBM26_HUMAN RNA-binding protein 26 OS=Homo sapiens GN=RBM26 PE=1 SV=3	1035	113863,4	2	RBM26_HUMAN	2
231	RB2_HUMAN	sp P49792 RB2_HUMAN E3 SUMO-protein ligase RanBP2 OS=Homo sapiens GN=RANBP2 PE=1 SV=2	3287	361668,9	2	RB2_HUMAN	2
232	RENT1_HUMAN	sp Q92900 RENT1_HUMAN Regulator of nonsense transcripts 1 OS=Homo sapiens GN=UPF1 PE=1 SV=2	1141	125578,2	2	RENT1_HUMAN	2
233	RL34_HUMAN	sp P49207 RL34_HUMAN 60S ribosomal protein L34 OS=Homo sapiens GN=RL34 PE=1 SV=3	120	13284,47	2	RL34_HUMAN	2
234	RL36_HUMAN	sp Q9Y3U8 RL36_HUMAN 60S ribosomal protein L36 OS=Homo sapiens GN=RL36 PE=1 SV=3	111	12293,89	2	RL36_HUMAN	2
235	RM7_HUMAN	sp Q9B2E1 RM7_HUMAN 39S ribosomal protein L37, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL37 PE=1 SV=2	441	48600,29	2	RM7_HUMAN	2
236	RRP5_HUMAN	sp Q14690 RRP5_HUMAN Protein RRP5 homolog OS=Homo sapiens GN=PDCD11 PE=1 SV=3	1906	20927,19	2	RRP5_HUMAN	2
237	RRS1_HUMAN	sp Q15050 RRS1_HUMAN Ribosome biogenesis regulatory protein homolog OS=Homo sapiens GN=RRS1 PE=1 SV=2	374	41216,15	2	RRS1_HUMAN	2
238	STT3B_HUMAN	sp Q8TCT2 STT3B_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3B OS=Homo sapiens GN=STT3B	856	94240,91	2	STT3B_HUMAN	2
239	TM111_HUMAN	sp Q9P0I2 TM111_HUMAN Transmembrane protein 111 OS=Homo sapiens GN=TMEM111 PE=1 SV=3	272	29932,37	2	TM111_HUMAN	2
240	WDR5_HUMAN	sp P61964 WDR5_HUMAN WD repeat-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=WDR5 PE=1 SV=1	337	37135,67	2	WDR5_HUMAN	2

Tableau R6 : Groupe 3, Protéines enrichies significativement dans Trisk 95-GFP (< à 3).

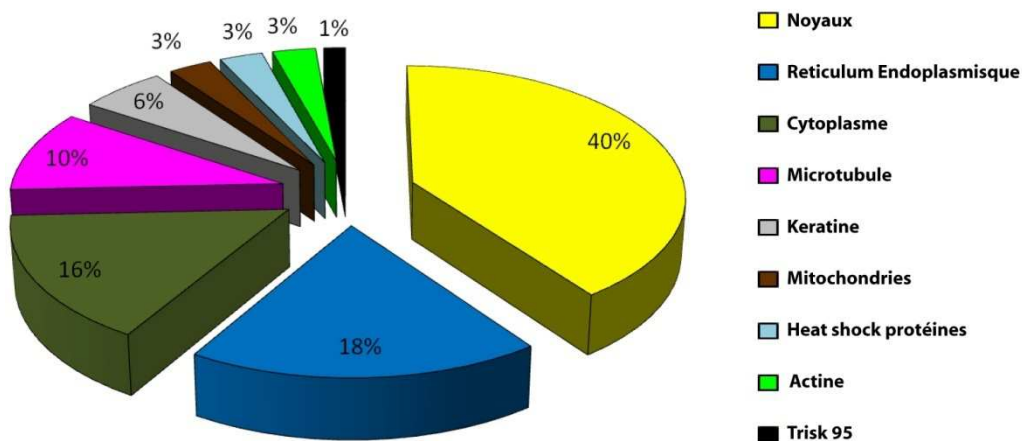
	Accession	Description	Length	Mass	SC (IP-T95) / SC (pEGFP)
1	PRKDC_HUMAN	sp P78527 PRKDC_HUMAN DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PRKDC PE=1 SV=1	4299	472962,6	44,00
2	C9JC37_HUMAN	tr C9JC37 C9JC37_HUMAN Putative uncharacterized protein DHX30 OS=Homo sapiens GN=DHX30 PE=4 SV=1	1193	131332,4	11,00
3	MYH9_HUMAN	sp P35579 MYH9_HUMAN Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	2067	227447,3	10,00
4	A4QP00_HUMAN	tr A4QP00 A4QP00_HUMAN IQ motif containing GTPase activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=IQGAP1 PE=2 SV=1	1724	198698,7	9,00
5	B3KY60_HUMAN	tr B3KY60 B3KY60_HUMAN cDNA FLJ16777 fis, clone BRHIP2029567, highly similar to Cell division cycle 5-like prote	840	92411,65	9,00
6	A6NDY9_HUMAN	tr A6NDY9 A6NDY9_HUMAN Putative uncharacterized protein FLNA OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=4 SV=3	2311	248149,3	8,00
7	B4DIN9_HUMAN	tr B4DIN9 B4DIN9_HUMAN cDNA FLJ54000, highly similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitoc	691	75974,35	8,00
8	IPO7_HUMAN	sp O95373 IPO7_HUMAN Importin-7 OS=Homo sapiens GN=IPO7 PE=1 SV=1	1097	120751,4	8,00
9	A4FU77_HUMAN	tr A4FU77 A4FU77_HUMAN SNRNP200 protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SNRNP200 PE=2 SV=1	1975	217341,1	7,00
10	A8K962_HUMAN	tr A8K962 A8K962_HUMAN cDNA FLJ77827, highly similar to Human upstream binding factor (hUBF) OS=Homo sap	815	89693,3	7,00
11	D3DSF3_HUMAN	tr D3DSF3 D3DSF3_HUMAN Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, phosphoribosylglycinamide synthetase, e	990	108953,5	7,00
12	OST48_HUMAN	sp P39656 OST48_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Hom	462	50912,92	7,00
13	A8K529_HUMAN	tr A8K529 A8K529_HUMAN cDNA FLJ76184, highly similar to Homo sapiens NOL1/NOP2/Sun domain family, memb	791	87015,57	7,00
14	DSC1_HUMAN	sp Q08554 DSC1_HUMAN Desmocollin-1 OS=Homo sapiens GN=DSC1 PE=1 SV=2	921	101406,3	6,00
15	Q59G75_HUMAN	tr Q59G75 Q59G75_HUMAN Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	1341	147619,5	6,00
16	B2R5N6_HUMAN	tr B2R5N6 B2R5N6_HUMAN cDNA, FLJ92546, highly similar to Homo sapiens inner membrane protein, mitochondrial	763	83976,26	6,00
17	GNL3_HUMAN	sp Q9BY27 GNL3_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein-like 3 OS=Homo sapiens GN=GNL3 PE=1 SV=2	567	62386,31	6,00
18	Q3SYB4_HUMAN	tr Q3SYB4 Q3SYB4_HUMAN SERPINB12 protein OS=Homo sapiens GN=SERPINB12 PE=2 SV=1	443	48814,33	6,00
19	COPB_HUMAN	sp P53618 COPB_HUMAN Coatamer subunit beta OS=Homo sapiens GN=COPB1 PE=1 SV=3	983	108214,2	6,00
20	Q08E58_HUMAN	tr Q08E58 Q08E58_HUMAN Cell growth-inhibiting protein 34 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	182	20081,57	6,00
21	SC22B_HUMAN	sp O75396 SC22B_HUMAN Vesicle-trafficking protein SEC22b OS=Homo sapiens GN=SEC22B PE=1 SV=3	226	24895,81	6,00
22	CYTA_HUMAN	sp P01040 CYTA_HUMAN Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=1 SV=1	99	10999,66	6,00
23	SYEP_HUMAN	sp P07814 SYEP_HUMAN Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase OS=Homo sapiens GN=EPRS PE=1 SV=5	1564	172079,7	5,00
24	CKAP4_HUMAN	sp Q07065 CKAP4_HUMAN Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=CKAP4 PE=1 SV=2	600	66078,7	5,00
25	A8K492_HUMAN	tr A8K492 A8K492_HUMAN cDNA FLJ76789, highly similar to Homo sapiens methionine-tRNA synthetase (MARS), m	929	102277,4	5,00
26	A8K781_HUMAN	tr A8K781 A8K781_HUMAN cDNA FLJ75299, highly similar to Xenopus laevis proteasome (prosome, macropain) 26S	432	47577,6	5,00
27	B2RCM2_HUMAN	tr B2RCM2 B2RCM2_HUMAN cDNA, FLJ96156, highly similar to Homo sapiens leucyl-tRNA synthetase (LARS), mRN	1232	135549,9	5,00
28	B4DLN6_HUMAN	tr B4DLN6 B4DLN6_HUMAN cDNA FLJ59033, highly similar to Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) OS=Homo sa	468	51554,77	5,00
29	C9JHZ3_HUMAN	tr C9JHZ3 C9JHZ3_HUMAN Putative uncharacterized protein RRP1B OS=Homo sapiens GN=RRP1B PE=4 SV=1	749	82412,97	5,00
30	IF6_HUMAN	sp P56537 IF6_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Homo sapiens GN=EIF6 PE=1 SV=1	245	27014,06	5,00
31	LETM1_HUMAN	sp O95202 LETM1_HUMAN LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=	763	83986,21	5,00
32	TNPO1_HUMAN	sp Q92973 TNPO1_HUMAN Transportin-1 OS=Homo sapiens GN=TNPO1 PE=1 SV=2	943	103771,3	5,00
33	XPO1_HUMAN	sp O14980 XPO1_HUMAN Exportin-1 OS=Homo sapiens GN=XPO1 PE=1 SV=1	1131	124446,5	5,00
34	AAAT_HUMAN	sp Q15758 AAAT_HUMAN Neutral amino acid transporter B(0) OS=Homo sapiens GN=SLC1A5 PE=1 SV=2	522	57018,42	5,00
35	Q59GK9_HUMAN	tr Q59GK9 Q59GK9_HUMAN Ribosomal protein L21 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	172	18927,24	5,00
36	B3KSH1_HUMAN	tr B3KSH1 B3KSH1_HUMAN HCG1784554, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HCG_1784554 PE=2 SV=1	356	39235,98	5,00
37	ROA0_HUMAN	sp Q13151 ROA0_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	281	30965,74	5,00
38	A8K6V3_HUMAN	tr A8K6V3 A8K6V3_HUMAN cDNA FLJ78677, highly similar to Homo sapiens splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa (Sf	1240	136404,4	4,50
39	FAS_HUMAN	sp P49327 FAS_HUMAN Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3	2507	275877,3	4,14
40	A6NDN7_HUMAN	tr A6NDN7 A6NDN7_HUMAN Putative uncharacterized protein ATP2A2 OS=Homo sapiens GN=ATP2A2 PE=3 SV=2	1008	110019,9	4,00
41	EIF3A_HUMAN	sp Q14152 EIF3A_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=1 SV=1	1516	166867,5	4,00
42	QCR2_HUMAN	sp P22695 QCR2_HUMAN Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE	441	48556,84	4,00
43	A6NKT1_HUMAN	tr A6NKT1 A6NKT1_HUMAN Putative uncharacterized protein RPN2 OS=Homo sapiens GN=RPN2 PE=4 SV=1	512	56325,37	4,00
44	HNRDL_MOUSE	sp Q92130 HNRDL_MOUSE Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Mus musculus GN=Hnrpd PE=1 SV=1	306	33709,16	4,00
45	Q549C5_HUMAN	tr Q549C5 Q549C5_HUMAN HCG2010808, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=MSTO65 PE=2 SV=1	141	15511,78	4,00
46	A2BF75_HUMAN	tr A2BF75 A2BF75_HUMAN ATP-binding cassette sub-family F (GCN20) member 1 OS=Homo sapiens GN=ABCF1	875	96250,35	4,00
47	A8K4W2_HUMAN	tr A8K4W2 A8K4W2_HUMAN cDNA FLJ78635, highly similar to Homo sapiens ATP synthase, H+ transporting, mitoc	262	28919,33	4,00
48	A8K588_HUMAN	tr A8K588 A8K588_HUMAN cDNA FLJ76823, highly similar to Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 6 (Sf	359	39578,36	4,00
49	ATP5H_HUMAN	sp O75947 ATP5H_HUMAN ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5H PE=1 SV=3	168	18536,52	4,00



50	B3KXZ4_HUMAN	tr B3KXZ4 B3KXZ4_HUMAN cDNA FLJ46429 fis, clone THYMU3014372, highly similar to DNA replication licensing fac	835	91898,48	4,00
51	B4DJX1_HUMAN	tr B4DJX1 B4DJX1_HUMAN cDNA FLJ50978, highly similar to Dihydropolyllysine-residue acetyltransferase component	591	63056,74	4,00
52	B5BUB5_HUMAN	tr B5BUB5 B5BUB5_HUMAN Autoantigen La (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SSB PE=2 SV=1	427	47009,24	4,00
53	D3DUK4_HUMAN	tr D3DUK4 D3DUK4_HUMAN Lysyl-tRNA synthetase OS=Homo sapiens GN=KARS PE=3 SV=1	653	71907,61	4,00
54	RS25_HUMAN	sp P62851 RS25_HUMAN 40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1	125	13781,68	4,00
55	A2A3R6_HUMAN	tr A2A3R6 A2A3R6_HUMAN Ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens GN=RPS6 PE=2 SV=1	261	28806,94	4,00
56	B0AZV0_HUMAN	tr B0AZV0 B0AZV0_HUMAN cDNA, FLJ79540, highly similar to Serine-threonine kinase receptor-associated protein OS	261	28716,16	4,00
57	B0QY89_HUMAN	tr B0QY89 B0QY89_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E interacting protein OS=Homo sapiens	646	71084,73	4,00
58	SRP14_PONAB	sp Q5R8X7 SRP14_PONAB Signal recognition particle 14 kDa protein OS=Pongo abelii GN=SRP14 PE=2 SV=1	136	14648,84	4,00
59	AT1A1_HUMAN	sp P05237 AT1A1_HUMAN Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1	1037	114135,4	3,50
60	B4E1K7_HUMAN	tr B4E1K7 B4E1K7_HUMAN cDNA FLJ61039, highly similar to Stomatatin-like protein 2 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	307	33316,62	3,50
61	B3KQ79_HUMAN	tr B3KQ79 B3KQ79_HUMAN B-cell receptor-associated protein 31, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=BCAP31	317	34901,37	3,50
62	CMC2_HUMAN	sp Q9UJ0J CMC2_HUMAN Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A13	676	74464,54	3,50
63	MDHM_HUMAN	sp P40926 MDHM_HUMAN Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3	328	35936,9	3,50
64	Q9BTQ7_HUMAN	tr Q9BTQ7 Q9BTQ7_HUMAN Similar to ribosomal protein L23 (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	129	14236,64	3,50
65	A6NKA3_HUMAN	tr A6NKA3 A6NKA3_HUMAN Coatomer protein complex, subunit epsilon, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=CO	261	28778,57	3,50
66	M2OM_HUMAN	sp Q02978 M2OM_HUMAN Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein OS=Homo sapiens GN=SLC25A11 PE	310	34183,81	3,50
67	B4DZ8_HUMAN	tr B4DZ8 B4DZ8_HUMAN Coatomer protein complex, subunit beta 2 (Beta prime), isoform CRA_b OS=Homo sapien	907	99838,9	3,33
68	ECHA_HUMAN	sp P40939 ECHA_HUMAN Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 S	760	83688,15	3,33
69	D3DNB6_HUMAN	tr D3DNB6 D3DNB6_HUMAN Ribophorin I, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=4 SV=1	623	68622,78	3,25
70	DESP_HUMAN	sp P15924 DESP_HUMAN Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DESP PE=1 SV=3	3033	33363,2	3,14
71	PLAK_HUMAN	sp P14923 PLAK_HUMAN Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3	748	82316,53	3,00
72	NOP2_HUMAN	sp P46087 NOP2_HUMAN Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2 OS=Homo sapiens GN=NOP2 PE=1 S	813	89535,02	3,00
73	ANXA2_HUMAN	sp P07355 ANXA2_HUMAN Annexin A2 OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=1 SV=2	350	38579,81	3,00
74	G3BP1_HUMAN	sp Q13283 G3BP1_HUMAN Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 S	474	52189,1	3,00
75	A9LN06_HUMAN	tr A9LN06 A9LN06_HUMAN Phosphoglycerate mutase 5, long isoform OS=Homo sapiens GN=PGAM5-L PE=2 SV=2	292	32176,55	3,00
76	B2RSU1_HUMAN	tr B2RSU1 B2RSU1_HUMAN cDNA, FLJ92620, highly similar to Homo sapiens staphylococcal nuclease domain cont	911	100293,6	3,00
77	D3DQN2_HUMAN	tr D3DQN2 D3DQN2_HUMAN Sideroflexin 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SFNX1 PE=4 SV=1	325	35836,27	3,00
78	PRDX6_HUMAN	sp P30041 PRDX6_HUMAN Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3	228	25133,23	3,00
79	RL10A_HUMAN	sp P62906 RL10A_HUMAN 60S ribosomal protein L10a OS=Homo sapiens GN=RPL10A PE=1 SV=2	226	24959,49	3,00
80	SRP72_HUMAN	sp O76094 SRP72_HUMAN Signal recognition particle 72 kDa protein OS=Homo sapiens GN=SRP72 PE=1 SV=3	677	74559,97	3,00
81	ATPG_HUMAN	sp P36542 ATPG_HUMAN ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5C1 PE=1 SV=3	300	33023,26	3,00
82	B4E0S6_HUMAN	tr B4E0S6 B4E0S6_HUMAN cDNA FLJ55635, highly similar to pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase	819	90162,33	3,00
83	D3DR44_HUMAN	tr D3DR44 D3DR44_HUMAN Aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN	798	87871,34	3,00
84	MARCS_HUMAN	sp P29966 MARCS_HUMAN Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCS PE=1 S	288	31706,93	3,00
85	A2BDD9_HUMAN	tr A2BDD9 A2BDD9_HUMAN AMOT protein OS=Homo sapiens GN=AMOT PE=2 SV=1	662	72928,23	3,00
86	A8K622_HUMAN	tr A8K622 A8K622_HUMAN cDNA FLJ75871, highly similar to Homo sapiens staufen, RNA binding protein (STAU), tra	576	63392,7	3,00
87	A8MWD3_HUMAN	tr A8MWD3 A8MWD3_HUMAN Putative uncharacterized protein EIF3D OS=Homo sapiens GN=EIF3D PE=4 SV=1	586	64489,63	3,00
88	ANM1_HUMAN	sp Q99873 ANM1_HUMAN Protein arginine N-methyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=PRMT1 PE=1 SV=2	382	40528,75	3,00
89	APMAP_HUMAN	sp Q9HDC9 APMAP_HUMAN Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=	423	46621,91	3,00
90	APT_HUMAN	sp P07741 APT_HUMAN Adenine phosphoribosyltransferase OS=Homo sapiens GN=APRT PE=1 SV=2	180	19766,5	3,00
91	B1ARP8_HUMAN	tr B1ARP8 B1ARP8_HUMAN Mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila) OS=Homo sapiens GN=MA	117	12892,62	3,00
92	B2R4D8_HUMAN	tr B2R4D8 B2R4D8_HUMAN 60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	143	15759,72	3,00
93	B2R665_HUMAN	tr B2R665 B2R665_HUMAN cDNA, FLJ92810, highly similar to Homo sapiens protein phosphatase 1G (formerly 2C),	544	59888,93	3,00
94	B2R679_HUMAN	tr B2R679 B2R679_HUMAN cDNA, FLJ92825, highly similar to Homo sapiens SAR1a gene homolog 1 (S. cerevisiae)	203	22394,55	3,00
95	B2R806_HUMAN	tr B2R806 B2R806_HUMAN cDNA, FLJ93685, highly similar to Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3,	478	52622,5	3,00
96	B2R8A2_HUMAN	tr B2R8A2 B2R8A2_HUMAN cDNA, FLJ93804, highly similar to Homo sapiens gp25L2 protein (HSGP25L2G), mRNA	228	25175,95	3,00
97	B2RNR6_HUMAN	tr B2RNR6 B2RNR6_HUMAN Zinc finger RNA binding protein OS=Homo sapiens GN=ZFR PE=2 SV=1	1063	116949,0	3,00
98	B3KNE7_HUMAN	tr B3KNE7 B3KNE7_HUMAN cDNA FLJ14468 fis, clone MAMMA1000734, highly similar to Translocation protein SEC6	438	48242,02	3,00
99	B3KRR1_HUMAN	tr B3KRR1 B3KRR1_HUMAN cDNA FLJ34725 fis, clone MESAN2005958, highly similar to RNA-binding protein Luc7-	370	40706,68	3,00
100	B3KT66_HUMAN	tr B3KT66 B3KT66_HUMAN Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6, isoform CRA_c OS=H	369	40599,68	3,00
101	B3KXA2_HUMAN	tr B3KXA2 B3KXA2_HUMAN cDNA FLJ45031 fis, clone BRAWH3018548, highly similar to Vinculin OS=Homo sapiens	1007	110864,1	3,00
102	B4DEA6_HUMAN	tr B4DEA6 B4DEA6_HUMAN cDNA FLJ56566, highly similar to Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containi	289	31808,6	3,00
103	B4DEX8_HUMAN	tr B4DEX8 B4DEX8_HUMAN S-adenosylmethionine synthetase OS=Homo sapiens GN=MAT2A PE=2 SV=1	363	40027,38	3,00
104	B4DL12_HUMAN	tr B4DL12 B4DL12_HUMAN cDNA FLJ53754, highly similar to Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	183	20217,52	3,00
105	B4DMQ5_HUMAN	tr B4DMQ5 B4DMQ5_HUMAN cDNA FLJ51998, highly similar to Ras-related protein Rab-2A OS=Homo sapiens PE=	190	20948,37	3,00
106	B4DQ08_HUMAN	tr B4DQ08 B4DQ08_HUMAN cDNA FLJ53406, highly similar to U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolo	745	82040,83	3,00
107	B4DR45_HUMAN	tr B4DR45 B4DR45_HUMAN cDNA FLJ61339, highly similar to Alanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.7) OS=Homo sapie	1000	110016,8	3,00
108	B4DYYS_HUMAN	tr B4DYYS B4DYYS_HUMAN cDNA FLJ56671, highly similar to Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens	1033	113661,9	3,00
109	B4DZ88_HUMAN	tr B4DZ88 B4DZ88_HUMAN KTN1 protein OS=Homo sapiens GN=KTN1 PE=2 SV=1	1392	153178,7	3,00
110	B4E2W0_HUMAN	tr B4E2W0 B4E2W0_HUMAN cDNA FLJ56214, highly similar to Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS	444	48848,22	3,00
111	B8Y929_HUMAN	tr B8Y929 B8Y929_HUMAN Ribosomal protein L22-like 2 OS=Homo sapiens GN=RPL22L2 PE=2 SV=1	134	14781,73	3,00
112	C9JIS1_HUMAN	tr C9JIS1 C9JIS1_HUMAN Putative uncharacterized protein GNB2 OS=Homo sapiens GN=GNB2 PE=4 SV=1	232	25521,53	3,00
113	CKAP5_HUMAN	sp Q14008 CKAP5_HUMAN Cytoskeleton-associated protein 5 OS=Homo sapiens GN=CKAP5 PE=1 SV=3	2064	227062,4	3,00
114	D3DS00_HUMAN	tr D3DS00 D3DS00_HUMAN Nucleoside phosphorylase, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=NP PE=4 SV=1	293	32325,24	3,00
115	D3DSW0_HUMAN	tr D3DSW0 D3DSW0_HUMAN SPFH domain family, member 2, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SPFH2 PE	343	37815,45	3,00
116	LAS1L_HUMAN	sp Q9Y4W2 LAS1L_HUMAN Protein LAS1 homolog OS=Homo sapiens GN=LAS1L PE=1 SV=2	762	83828,54	3,00
117	NUDC_HUMAN	sp Q9Y266 NUDC_HUMAN Nuclear migration protein nudC OS=Homo sapiens GN=NUDC PE=1 SV=1	347	38276,15	3,00
118	PRS10_HUMAN	sp P62333 PRS10_HUMAN 26S protease regulatory subunit 10B OS=Homo sapiens GN=PSMC6 PE=1 SV=1	403	44430,21	3,00
119	PSD11_HUMAN	sp O00231 PSD11_HUMAN 26S protease regulatory subunit 11 OS=Homo sapiens GN=PSMD11 PE	433	47719,15	3,00
120	PURA_HUMAN	sp Q00577 PURA_HUMAN Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Homo sapiens GN=PURA PE=1 SV=2	318	34985,37	3,00
121	Q5G69_HUMAN	tr Q5G69 Q5G69_HUMAN Translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (Fragment) OS=Homo sapie	469	51633,61	3,00
122	Q59GB3_HUMAN	tr Q59GB3 Q59GB3_HUMAN Ribonuclease/angiogenin inhibitor variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	324	35721,79	3,00
123	Q5TDG3_HUMAN	tr Q5TDG3 Q5TDG3_HUMAN WD repeat domain 3 OS=Homo sapiens GN=WDR3 PE=2 SV=1	973	107115,2	3,00
124	Q6IAM7_HUMAN	tr Q6IAM7 Q6IAM7_HUMAN SPC18 protein OS=Homo sapiens GN=SPC18 PE=2 SV=1	187	20598,08	3,00
125	RL35A_HUMAN	sp P18077 RL35A_HUMAN 60S ribosomal protein L35a OS=Homo sapiens GN=RPL35A PE=1 SV=2	114	12577,76	3,00
126	RUXF_HUMAN	sp P62306 RUXF_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=SNRPF PE=1 SV=1	88	9718,78	3,00
127	SSRD_HUMAN	sp P51571 SSRD_HUMAN Translocin-associated protein subunit delta OS=Homo sapiens GN=SSR4 PE=1 SV=1	172	18986,61	3,00
128	TBL3_HUMAN	sp Q12788 TBL3_HUMAN Transducin beta-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=TBL3 PE=1 SV=2	819	90130,1	3,00
129	TMX1_HUMAN	sp Q9H3N1 TMX1_HUMAN Thioredoxin-related transmembrane protein 1 OS=Homo sapiens GN=TMX1 PE=1 SV=1	292	32169,45	3,00
130	USO1_HUMAN	sp O60763 USO1_HUMAN General vesicular transport factor p115 OS=Homo sapiens GN=USO1 PE=1 SV=2	988	108740,9	3,00
131	VDAC3_HUMAN	sp Q9Y277 VDAC3_HUMAN Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 OS=Homo sapiens GN=VDAC3 PE	281	30927,19	3,00
132	A8K9K4_HUMAN	tr A8K9K4 A8K9K4_HUMAN cDNA FLJ75504, highly similar to Homo sapiens glucosidase 1, mRNA OS=Homo sapien	566	62296,26	3,00
133	AN32A_HUMAN	sp P39687 AN32A_HUMAN Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A OS=Homo sapiens GN=A	260	28682,32	3,00
134	B7Z792_HUMAN	tr B7Z792 B7Z792_HUMAN cDNA FLJ53932, highly similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit, mitoc	424	46654,48	3,00
135	BAZ1A_HUMAN	sp Q9NRL2 BAZ1A_HUMAN Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A OS=Homo sapiens GN=BAZ1A	1638	180245,6	3,00
136	PSME3_HUMAN	sp P61289 PSME3_HUMAN Proteasome activator complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSME3 PE=1 SV=1	269	29601,6	3,00

Les analyses en spectrométrie de masse des échantillons Trisk 95-GFP et EGFP ont été satisfaisantes. En effet sur les 437 protéines de l'échantillon contrôle, EGFP est évalué comme la protéine la plus représentée (spectral count=372). Il en est de même dans l'échantillon Trisk 95-GFP : Sur les 797 protéines, la protéine de fusion GFP sort aussi en 1<sup>ère</sup> position (spectral count=111) et la protéine Trisk 95 a été identifiée à la 36<sup>ème</sup> position (spectral count=26). L'identification de Trisk 95 en 36<sup>ème</sup> position peut être expliquée par l'utilisation de la trypsine avant l'analyse au spectromètre de masse. En effet, la trypsine coupe les protéines au niveau des résidus arginines et lysines, or Trisk 95 contient 14 arginines (R) et 148 lysines (K) sur les 687 acides aminés qui composent cette protéine. Il y a au total 162 sites de coupure de la trypsine sur Trisk 95. La taille des fragments ainsi générés au cours de la digestion tryptique de Trisk 95 est peut être inférieure au seuil fixé dans la base de données (Annexe 2).

L'analyse en spectrométrie de masse étant qualitativement correcte, nous nous sommes intéressés aux groupes 2 et 3 pour identifier le ou les potentiel(s) partenaire(s). Il est observable dans un premier temps que parmi les 100 premières protéines identifiées dans le groupe 2 (protéines exclusivement co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP), Trisk 95-GFP co-immunoprécipite notamment des protéines du noyau (40%), des protéines du RE (18%), des protéines cytoplasmiques (16%), des protéines microtubulaires (10%). Certes, certaines protéines comme celles du noyau, ont été identifiées majoritairement, mais cela est probablement dû au continuum existant entre la membrane nucléaire et celle du RE. Ce criblage a permis de mettre en évidence des protéines microtubulaires (montrant une fois encore le lien entre Trisk 95 et les MTs), des protéines du RE (compartiment spécifique de la triadine) et d'autres protéines comme des protéines de compartimentalisation membranaire ou ayant la capacité à déformer les membranes de reticulum (Figure R24).



**Figure R24 :** Graphique représentant la distribution cellulaire des 100 premières protéines immunoprécipitées et identifiées par l'analyse de spectrométrie de masse. Ces protéines ont été spécifiquement co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP (groupe 2). Les protéines ont été classées selon les différents compartiments de la cellule. Parmi ces protéines identifiées, certaines semblent intéressantes car elles appartiennent aux compartiments cellulaires attendus (RE, protéines microtubulaires) pour être le partenaire potentiel de Trisk 95.

L'ensemble des groupes 2 et 3 représentent au total 377 protéines. Parmi ces protéines, nous avons sélectionnés les partenaires putatifs de Trisk 95 selon quatre critères : [i] leur abondance dans le crible (évalué dans la rubrique 'spectral count'), [ii] leur localisation (les protéines sont-elles exprimées à la membrane du reticulum ?), [iii] leur expression (les protéines sont-elles exprimées dans le muscle ?) et [iv] leur capacité à lier le réseau de microtubules. Parmi ces 377 protéines, cinq protéines possèdent plusieurs des critères listés ci-dessus.

## B) Caractérisation des cinq protéines sélectionnées dans des cellules COS-7.

Les cinq protéines sélectionnées ont été classées par ordre décroissant en fonction de leur spectral count. La Malectine et la protéine Lyric sont des protéines du groupe 2 (exclusivement co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP). CLIMP-63, l'Erlin2 et la kinectine sont des protéines appartenant au groupe 3 (avec un enrichissement de 5 fois, 3 fois et 3 fois respectivement). La Malectine, l'Erlin2, la Kinectine et la protéine Lyric sont des protéines transmembranaires qui sont exprimées dans le muscle et qui présentent deux ou trois des critères énoncés précédemment. CLIMP-63 est l'unique protéine présentant tous les critères de sélection. (Tableau R7 et R8).

NOM	Gene	Spectral Count	Accession	Groupe 2	Groupe 3
<b>CLIMP-63</b> Cytoskeleton Associated protein 4 p63	<b>CKAP4</b>	<b>10</b>	CKAP4_HUMAN		<b>5X</b>
<b>Malectine</b>	<b>MLEC</b>	<b>4</b>	MLEC_HUMAN	<b>X</b>	
<b>Erlin-2</b> Stomatin-prohibitin-flotillin HflC/K domain-containing protein 2	<b>ERLIN2</b>	<b>3</b>	ERLN2_HUMAN		<b>3X</b>
<b>Kinectine</b> CG-1 antigen Kinesin receptor	<b>KTN1</b>	<b>3</b>	KTN1_HUMAN		<b>3X</b>
<b>Protéine LYRIC</b> 3D3/LYRIC AEG-1, Metadherin	<b>MTDH</b>	<b>2</b>	LYRIC_HUMAN	<b>X</b>	

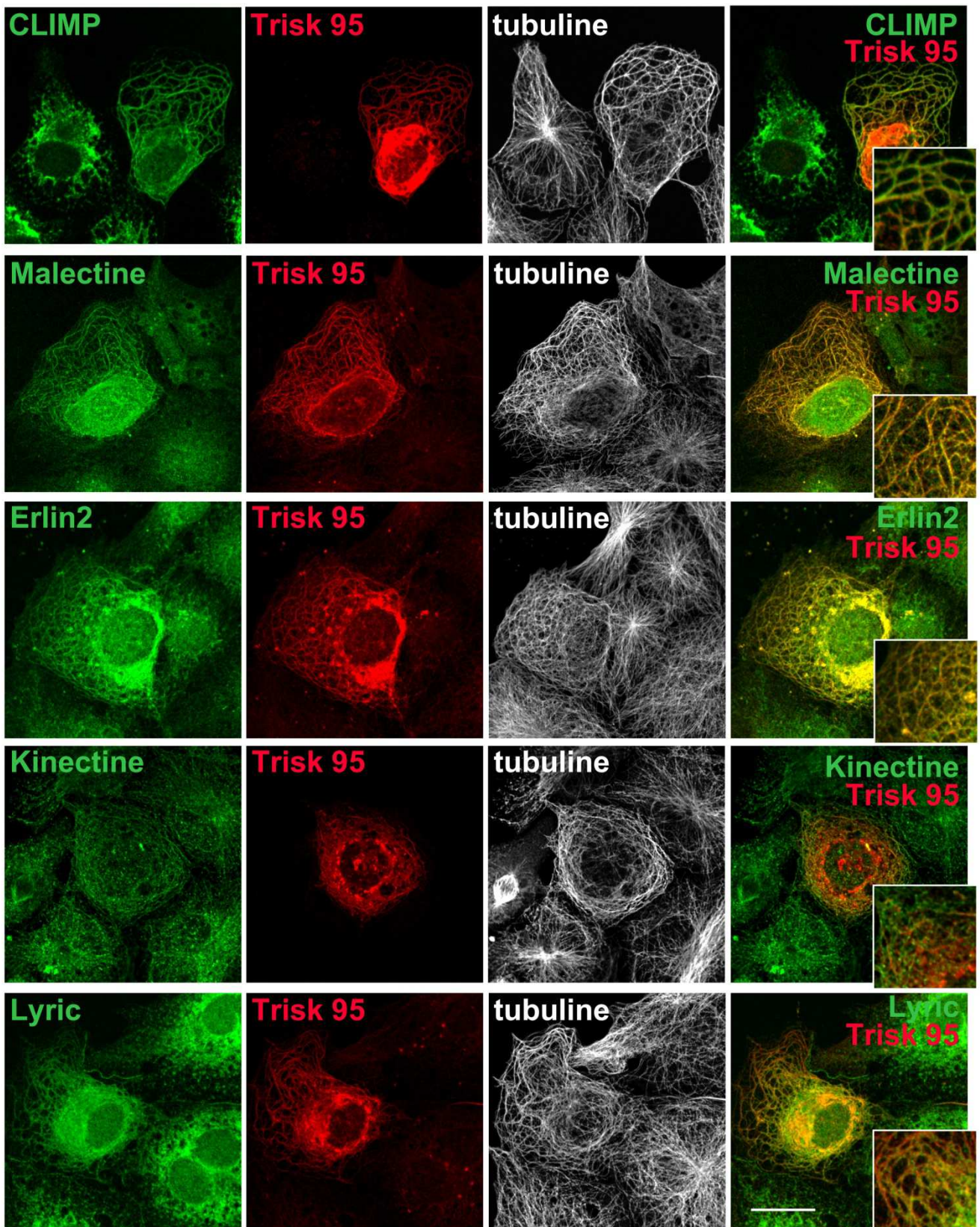
**Tableau R7 : Protéines intéressantes identifiées après spectrométrie de masse.** Les expériences de co-immunoprécipitations ont été réalisées à partir de cellules HEK293 transfectées avec Trisk 95-GFP ou EGFP. Le groupe 2 correspond aux protéines spécifiquement co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP et absentes des protéines co-immunoprécipitées avec EGFP. Le groupe 3 correspond aux protéines co-immunoprécipitées avec Trisk 95-GFP et EGFP mais enrichies de manière significative dans la fraction Trisk 95-GFP (**5X** ou **3X**= protéine enrichie 5 ou 3 fois). **Spectral Count** correspond au nombre de peptides identifiées pour chaque protéine. **Accession** correspond au nom utilisé dans des bases de données telles que UniProtKB.

NOM	DESCRIPTION
<b>CLIMP-63</b>	location subcellulaire : membrane du reticulum endoplasmique (liaison avec les microtubules) médie l'ancrage du reticulum sur les microtubules protéine ubiquitaire domaines coiled-coil protéine transmembranaire de type II
<b>Malectine</b>	location subcellulaire : membrane du reticulum endoplasmique peut jouer un rôle dans les étapes précoces de la N-glycosylation des protéines protéine de liaison d'hydrate de carbone avec une préférence pour le ligand Glc2 -N- glycane exprimé dans le muscle protéine transmembranaire de type I
<b>Erlin-2</b>	location subcellulaire : membrane du reticulum endoplasmique composant du complexe ERLIN1/ERLIN2 médie la dégradation par l'ERAD (endoplasmic reticulum-associated degradation) de l'IP3R impliqué dans la dégradation de ITPR1 par la voie ERAD protéine transmembranaire de type II
<b>Kinectine</b>	location subcellulaire : membrane du reticulum endoplasmique récepteur pour la kinesine (impliqué dans la motilité "kinesin-driven vesicle") s'accumule dans des complexes d'adhérence (intégrine) domaine coiled-coil protéine transmembranaire de type II
<b>Protéine LYRIC</b>	location subcellulaire : membrane du reticulum endoplasmique impliqué dans les jonctions cellulaires : active le facteur nucléaire de transcription NF-kappa-B interagit avec BCIPP, CREBBP/CBP et RELA/p65 exprimé dans le muscle squelettique et dans le cœur protéine transmembranaire de type II

**Tableau R8 : Description des protéines intéressantes d'après le Tableau R7.**

Pour tester ces cinq candidats potentiels, nous avons regardé par immunofluorescence si ces candidats pourraient colocaliser avec Trisk 95 (Figure R25). Trisk 95 a été exprimée dans des cellules COS-7 puis les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-Trisk 95 (en rouge), anti-tubuline (gris) et avec des anticorps commerciaux dirigés contre CLIMP-63, la Malectine, l'Erlin2, la Kinectine ou la protéine Lyric (en vert). Dans les cellules exhibant des RLS induites par Trisk 95, seule la Kinectine présente un marquage qui ne colocalise que très partiellement avec le phénotype RLS. Au contraire, CLIMP-63, la Malectine, l'Erlin2 et la protéine Lyric révèlent une colocalisation au niveau des RLS induits par Trisk 95. Ces cellules transfectées présentent aussi une désorganisation des microtubules qui co-alignent avec les RLS. Pour contrôle, les cellules non-transfectées présentent un reticulum normal et une organisation radiale des microtubules autour d'un centrosome. Ainsi l'expression de Trisk 95 pourrait induire une redistribution d'une de ces protéines et une réorganisation des microtubules, ce qui suggère une association entre la triadine et l'une de ces protéines.

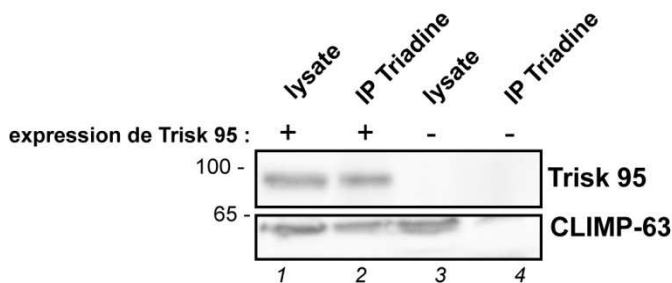
Cependant seul le marquage de CLIMP-63 démontre une colocalisation nette et parfaite avec Trisk 95 (Figure R25, première ligne). Étant donné cette colocalisation dans les cellules COS-7 et que CLIMP-63 est décrite par ailleurs comme pouvant lier directement le RE aux microtubules, nous avons décidé de concentrer nos expériences sur cette protéine.



**Figure R25 :** Les RLS induits par Trisk 95 co-localisent clairement avec les protéines endogènes Malectine, Erlin2, Lyric et CLIMP-63 dans les cellules COS-7. Après transfection de Trisk 95 dans les cellules COS-7, la localisation de Trisk 95 (rouge), des microtubules (tubuline, gris) et, respectivement, de la Malectine, l'Erlin2, la protéine Lyric, la kinectine ou CLIMP-63 (vert) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

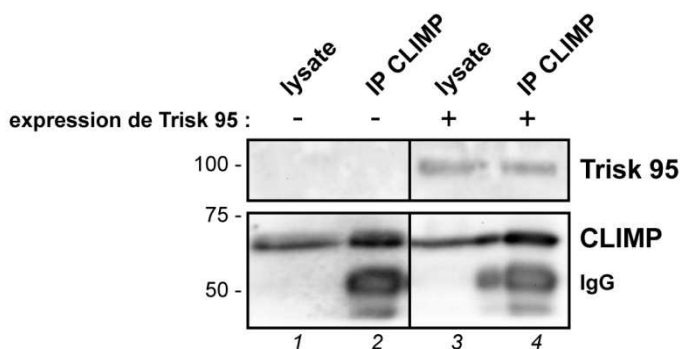
### C) Trisk 95 est associée avec CLIMP-63 endogène dans des cellules HEK293.

Comme nous l'avons montré en spectrométrie de masse, CLIMP-63 est co-immunoprécipitée avec Trisk 95-GFP dans les cellules HEK293. Pour confirmer ce résultat, Trisk 95 dépourvue de sa protéine de fusion GFP a été exprimée dans des cellules HEK293. Après une solubilisation adaptée aux protéines membranaires, l'immunoprécipitation de Trisk 95 a permis d'observer que CLIMP-63 est présente dans les protéines co-immunoprécipitées avec Trisk 95 (Figure R26, ligne 2) alors qu'elle est absente des immunoprécipitations réalisées sur des cellules non transfectées (Figure R26, ligne 4). CLIMP-63 endogène co-immunoprécipite donc avec Trisk 95.



**Figure R26 : Immunoprécipitation de Trisk 95.** Les lysats (**lysate**, lignes **1, 3**) ont été réalisés sur des cellules HEK293 non transfectées (lignes **3, 4**) ou transfectées avec Trisk 95 (lignes **1, 2**). Les expériences d'IP (**IP**, lignes **2, 4**) ont été réalisées sur ces lysats avec un anticorps anti-Cterminal Trisk 95. Trisk 95 est visible à 95 kDa et CLIMP-63 à 63 kDa.

L'immunoprécipitation reverse de CLIMP-63 a ensuite été réalisée. La Figure R27 montre que Trisk 95 est présente dans les protéines co-immunoprécipitées avec CLIMP-63 (Figure R27, ligne 4).



**Figure R27 : Immunoprécipitation de CLIMP-63.** Les lysats (**lysate**, lignes **1, 3**) ont été réalisés sur des cellules HEK293 non transfectées (lignes **1, 2**) ou transfectées avec Trisk 95 (lignes **3, 4**). Les expériences d'IP (**IP**, lignes **2, 4**) ont été réalisées sur ces lysats avec un anticorps anti-CLIMP-63. Trisk 95 est visible à 95 kDa et CLIMP-63 à 63 kDa. Les immunoglobulines (IgG) sont visibles à 50 kDa.

L'ensemble des expériences d'analyses en spectrométrie de masse, de colocalisations par immunofluorescence et d'immunoprécipitations montrent que CLIMP-63 peut s'associer à Trisk 95 dans des cellules modèles.

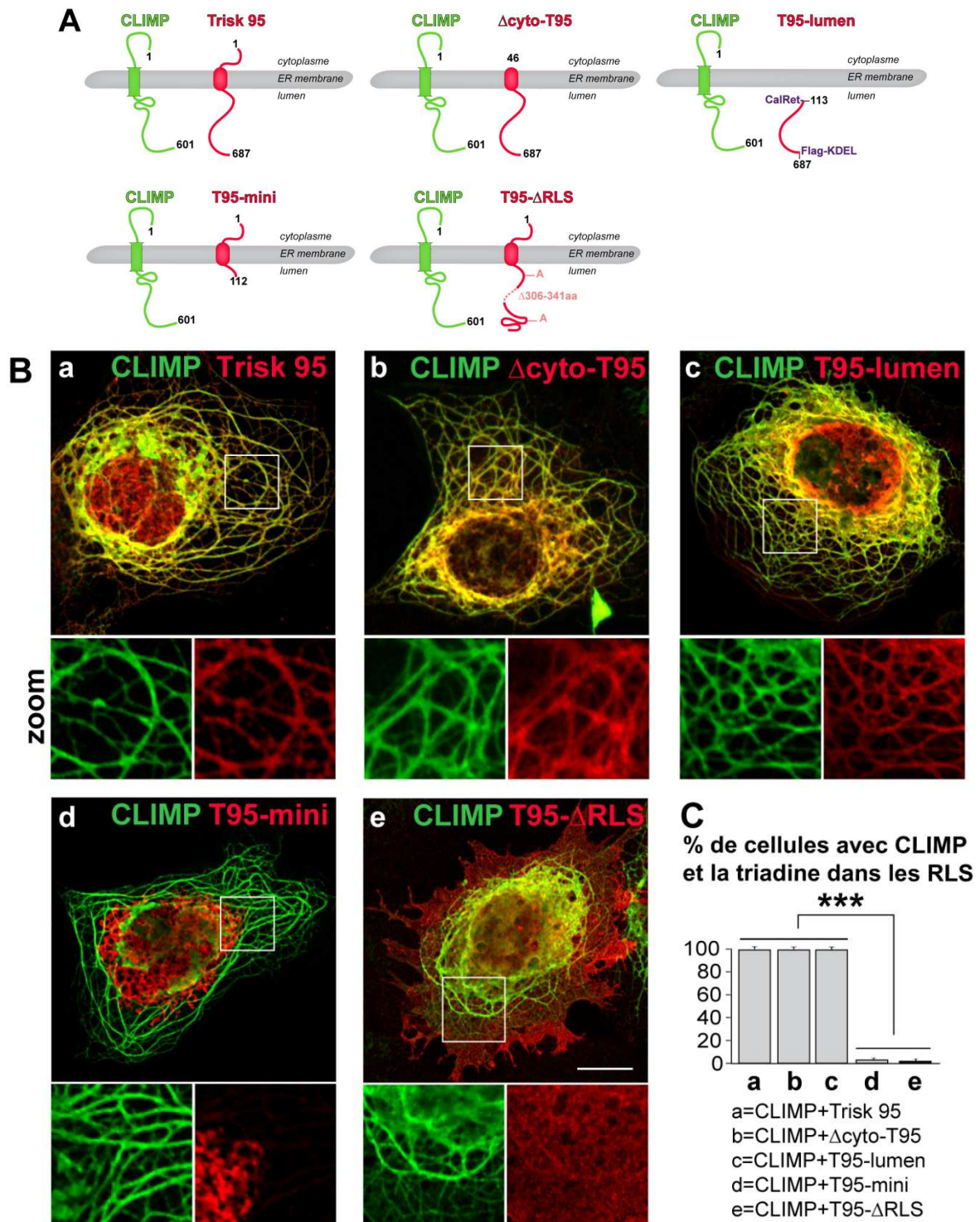
## *D) Le domaine luminal de Trisk 95 est indispensable pour son association avec CLIMP-63.*

Dans le Chapitre 1, nous avons montré que le domaine luminal de Trisk 95 contient les motifs responsables pour ses propriétés de modelage du reticulum. Nous avons voulu ensuite savoir quelles parties de Trisk 95 pouvaient interagir avec CLIMP-63.

Pour définir les domaines de Trisk 95 indispensables à l'association avec CLIMP-63, différents mutants de délétion ont été générés (Figure R28A) dont certains ont déjà été décrits dans le chapitre 1 (voir Figures R14 et R19): (i) le mutant  $\Delta$ cyto-T95 dont toute la partie N-terminale cytoplasmique a été déléetée, (ii) le mutant T95-lumen qui représente le domaine luminal sans les domaines cytoplasmiques et transmembranaire, (iii) le mutant T95-mini déléeté de toute son domaine luminal (iv) le mutant T95- $\Delta$ RLS déléeté des séquences spécifiques pour induire des RLS (délétion du motif coiled-coil et de ses deux cystéines lumineales). Il est important de rappeler que, T95-mini et T95- $\Delta$ RLS ne sont plus ou presque plus capables d'induire des RLS alors que  $\Delta$ cyto-T95 et T95-lumen seules peuvent induire des RLS (Figures R14 et R19).

La colocalisation de CLIMP-63 avec chacun des mutants a été analysée par immunofluorescence après co-transfection dans des cellules COS-7. Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CLIMP (en vert) et avec des anticorps dirigés contre le domaine N-terminal de la triadine ou contre le motif Flag (en rouge). Dans les cellules doublement transfectées avec CLIMP-63 et les mutants  $\Delta$ cyto-T95 ou T95-lumen ont un marquage qui colocalise parfaitement avec CLIMP-63 (Figure R28B b et c) comme observé pour Trisk 95 (Figure R28B a). Cent pour cent de ces cellules doublement transfectées présentent des RLS. Il semble que ces constructions de la triadine possèdent les motifs et les domaines nécessaires pour s'associer à CLIMP-63. Ces résultats suggèrent aussi qu'il existe un effet synergique entre ces constructions de la triadine et CLIMP-63 car toutes les cellules doublement transfectées présentent des RLS (voir quantification, Figure R28C). Au contraire, dans les cellules qui présentent des RLS induites par CLIMP-63, les mutants T95-mini, ou T95- $\Delta$ RLS ne colocalisent pas avec le marquage de CLIMP-63 (2% de colocalisation, Figure R28B d et e). Il semble que ces mutants ne possèdent pas les domaines suffisants pour s'associer à CLIMP-63. La quantification des cellules avec à la fois la triadine et CLIMP-63 dans des RLS résume les résultats obtenus ci-dessus (Figure R28C).

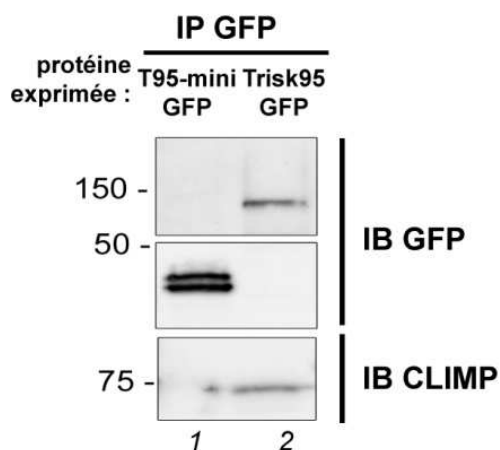




**Figure R28 : Le domaine luminal de Trisk 95 est important pour son association avec CLIMP-63.** (A) Représentations schématiques de CLIMP-63 (CLIMP), Trisk 95 et des différentes constructions de Trisk 95 délétées du domaine cytoplasmique ( $\Delta$ cyto-T95), du domaine cytoplasmique et transmembranaire (T95-lumen), du domaine luminal (T95-mini) ou des séquences spécifiques induisant les RLS (T95- $\Delta$ RLS). Les nombres indiquent les acides aminés. (B) Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec CLIMP-63 et l'une des cinq constructions la triadine. La localisation de CLIMP-63 (vert) et des différentes constructions de Trisk 95 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. Trisk 95 (a),  $\Delta$ cyto-T95 (b) et T95-lumen (c) colocalisent dans les RLS avec CLIMP tandis que T95-mini (d) et T95- $\Delta$ RLS (e) ne colocalisent pas. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. (C) Quantification des cellules présentant des RLS avec à la fois CLIMP-63 et une des constructions de Trisk 95. \*\*\* $P < 0.001$ , test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=3$  à 5 comptes de 100 cellules co-transfectées dans au minimum deux expériences pour chaque condition.

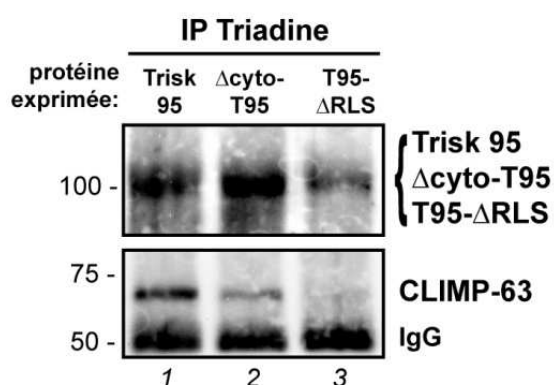
Le domaine luminal de Trisk 95 (et plus précisément son domaine coiled-coil et ses deux cystéines lumineales) semble donc indispensable pour sa liaison avec CLIMP-63.

Pour valider ces résultats, une série d'immunoprécipitation a été réalisée. J'ai transfecté dans des cellules HEK293 la triadine et ses mutants. Dans la première série et comme attendu, CLIMP-63 est co-immunoprécipitée avec Trisk 95-GFP (Figure R29, ligne 2) mais pas avec T95-mini-GFP (Figure R29, ligne 1).



**Figure R29 : Immunoprécipitation de T95-mini-GFP et de Trisk 95-GFP.** A partir de cellules HEK293 transfectées avec T95-mini-GFP (ligne 1) ou avec Trisk 95-GFP (ligne 2), les expériences d'IP ont été réalisées en utilisant le kit GFP-Trap®. Trisk 95-GFP est visible à 125 kDa, T95-mini-GFP à 45 kDa et CLIMP-63 à 63 kDa.

Dans la deuxième série, CLIMP-63 est co-immunoprécipitée avec Trisk 95 et avec  $\Delta$ cyto-T95 (Figure R30, lignes 1 et 2) mais pas avec T95- $\Delta$ RLS (Figure R30, ligne 3).

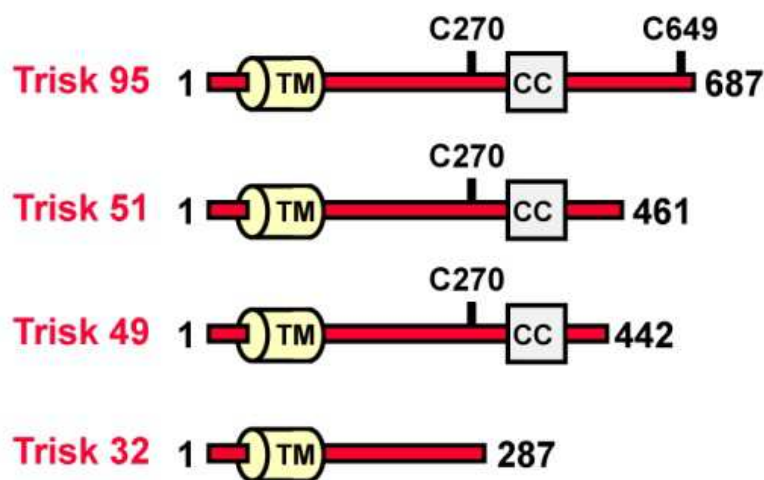


**Figure R30 : Immunoprécipitation de Trisk 95,  $\Delta$ cyto-T95 et T95- $\Delta$ RLS.** A partir de cellules HEK293 transfectées avec Trisk 95 (ligne 1), ou  $\Delta$ cyto-T95 (ligne 2) ou soit T95- $\Delta$ RLS (ligne 3), les expériences d'IP ont été réalisées en utilisant l'anticorps anti-Cterminal Trisk 95. Trisk 95,  $\Delta$ cyto-T95 et T95- $\Delta$ RLS sont visibles à environ 95 kDa, et CLIMP-63 à 63 kDa. Les immunoglobulines (IgG) sont visibles à environ 50 kDa.

Ces données montrent que le domaine luminal de Trisk 95 et ses motifs spécifiques sont responsables de son association avec CLIMP-63.

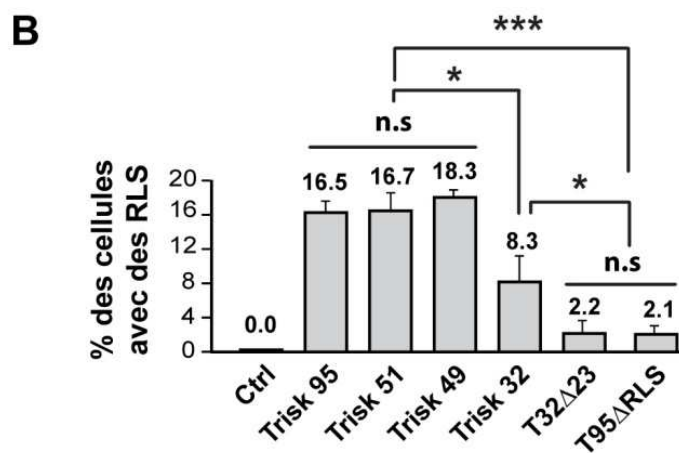
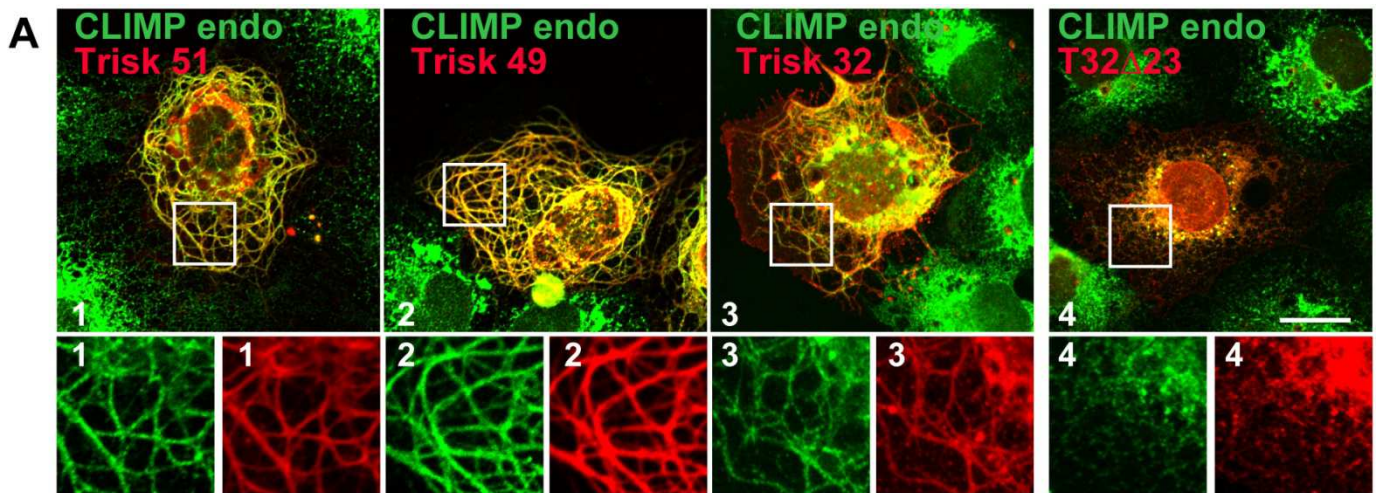
### E) Les différentes isoformes de la triadine sont associées avec CLIMP-63.

Pour savoir si CLIMP-63 peut lier les autres isoformes de la triadine, une série d'expériences avec ces isoformes a été réalisée. Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32 possèdent en commun avec Trisk 95 le domaine N-terminal, le domaine transmembranaire et une partie du domaine C-terminal. Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32 se distinguent par leurs extrémités C-terminales qui présentent des acides aminés spécifiques à chacune d'entre elles (Figure R31).



**Figure R31 : Trisk 32 est la seule isoforme qui ne possède pas de cystéines luminales et de domaine coiled-coil.** Représentations schématiques des différentes isoformes de la triadine. Les différents domaines spécifiques sont visibles = TM : le domaine transmembranaire (aa 46-66), CC: le domaine coiled-coil (aa 306-341) et C270 / C649 sont les deux cystéines luminales. Les nombres indiquent les acides aminés.

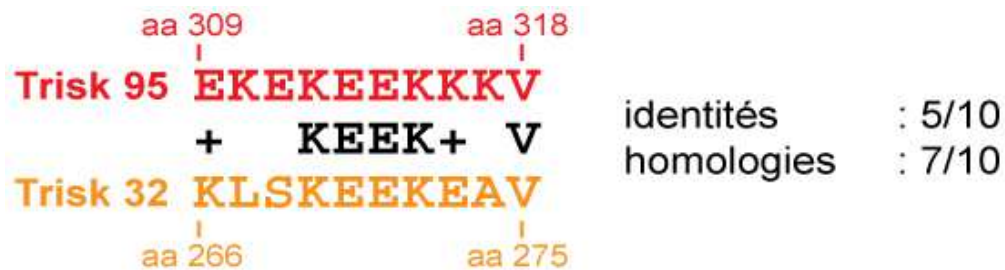
J'ai d'abord réalisé des expériences de colocalisation : Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32 ont été exprimées dans des cellules COS-7 puis les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CLIMP (en vert) et avec un anticorps développé au laboratoire dirigé contre l'extrémité N-terminal de la triadine (en rouge) (Figure R32A). Dans les cellules présentant des RLS induites par l'une de ces isoformes, CLIMP-63 colocalise avec chaque isoforme de la triadine (Figure R32A, encadrés 1, 2 et 3). La quantification des RLS montre que Trisk 51 et Trisk 49 induisent des RLS à un score identique à Trisk 95 (environ à 16%). Trisk 32 induit deux fois moins de RLS que Trisk 95 (Figure R32B).



**Figure R32 : Toutes les isoformes de la triadine colocalisent avec CLIMP-63.** (A) Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 51 (1), Trisk 49 (2), Trisk 32 (3) ou T32Δ23 (4). La localisation de CLIMP-63 endogène (CLIMP endo, vert) et des différentes constructions de la triadine (rouge) ont été mis en évidence par marquage immunofluorescent. Toutes les isoformes de la triadine sont capables de faire des RLS et CLIMP-63 endogène colocalise avec ces RLS. Seul le mutant T32Δ23 ne fait pas de RLS mais colocalise toujours avec CLIMP-63 endogène. Barre d'échelle : 20 μm. (B) Quantification des cellules transfectées présentant des RLS induits par une des isoformes de la triadine ou une des constructions T32Δ23 et T95ΔRLS. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , n.s.=non significatif, test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=3$  à 7 comptes de 100 cellules transfectées dans au minimum trois expériences pour chaque condition.

Toutefois Trisk 32 est l'isoforme naturellement dépourvue des motifs spécifiques décrits précédemment et impliqués dans les déformations de membranes. Logiquement, aucune cellule n'aurait dû présenter des RLS avec Trisk 32. La présence de la séquence spécifique de Trisk 32 en C-terminal pourrait expliquer la présence de RLS. Il semble donc que ces derniers acides aminés spécifiques à Trisk 32 soient impliqués dans l'association avec CLIMP-63. Nous avons donc par la suite étudié ces 23 acides aminés pour savoir si ces acides aminés sont responsables du phénotype RLS.

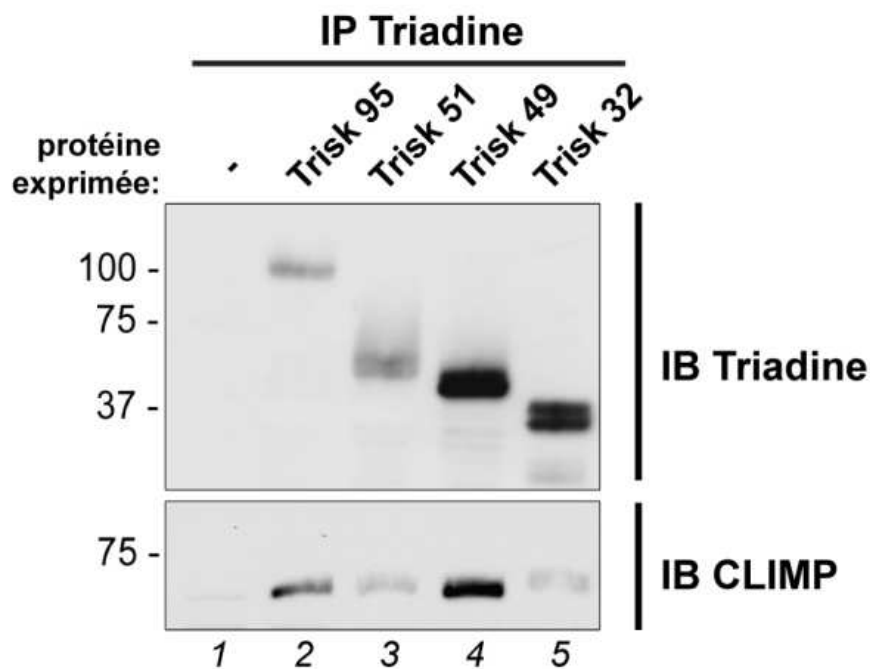
Un mutant de délétion sans les derniers acides aminés spécifique de Trisk 32 a été généré à partir de Trisk 32 : le mutant T32Δ23. Quand ce mutant est exprimé dans des cellules COS-7, rares sont les cellules présentant encore des RLS (seulement 2,1%, Figure R32A, encadré 4, et R32B). Ce nombre de cellules avec des RLS est identique au mutant T95-ΔRLS et est réduit d'environ 70% par rapport à Trisk 32 et d'environ 90% par rapport à Trisk 95. Le mutant T32Δ23 est cependant toujours localisé dans le reticulum où il colocalise avec CLIMP-63 endogène.



**Figure R33 : Alignement des séquences du domaine coiled-coil de Trisk 95 et du domaine chargé de la séquence spécifique de Trisk 32.** L'alignement montre une forte homologie de séquence (ligne au centre en noir). Les acides aminés identiques sont notés sur la ligne centrale, les acides aminés homologues sont figurés par un +.

Ainsi ces 23 acides aminés présents dans la séquence spécifique de Trisk 32 semblent importants pour la capacité de Trisk 32 de former des RLS, vraisemblablement en association avec CLIMP-63. Dans cette séquence spécifique, 10 acides aminés consécutifs des 23 (séquence KLSKEEKEAV), possèdent 50% d'identité et 70% d'homologie avec la séquence du motif coiled-coil de la triadine (Figure R33). Il existerait peut-être une séquence consensus spécifique d'environ 7 à 10 acides aminés pour la liaison avec CLIMP-63.

Trisk 95 est l'isoforme la plus longue, parmi les trois autres décrites. Pour savoir si les autres isoformes de la triadine qui ont une extrémité C-terminale plus courte s'associent avec CLIMP-63, nous avons exprimé ces isoformes dans des cellules HEK293, en utilisant des adénovirus codant pour chaque isoforme de la triadine. Nous avons réalisé une immunoprécipitation avec des anticorps contre le domaine N-terminal de la triadine pour chaque condition. La Figure R34 montre que CLIMP-63 est présente dans les protéines co-immunoprécipitées avec Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 ou Trisk32. Toutes les isoformes de la triadine sont capables de s'associer avec CLIMP-63 (Figure R34, lignes 2, 3, 4 et 5).

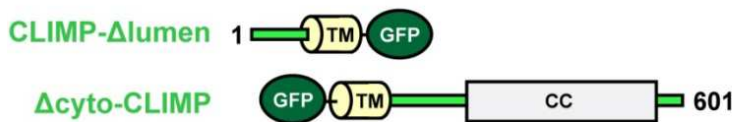


**Figure R34 : Toutes les isoformes de la triadine s'associent avec CLIMP-63.** A partir de cellules HEK293 non transfectées (ligne 1) ou transfectées avec Trisk 95 (ligne 2), Trisk 51 (ligne 3), Trisk 49 (ligne 4) ou Trisk 32 (ligne 5), les expériences d'IP ont été réalisées en utilisant l'anticorps anti-N-terminal de la triadine. Trisk 95 est visible à 95 kDa, Trisk 51 à environ 55 kDa, Trisk 49 à environ 50 kDa, Trisk 32 à environ 37 kDa et CLIMP-63 à 63 kDa. Les isoformes Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32 semblent glycosylées et présents sous une forme de double bande. Toutes les isoformes de la triadine peuvent associer CLIMP-63.

Ces résultats obtenus par co-immunoprécipitation valident les résultats obtenus par immunofluorescence et montrent que toutes les triadines décrites (Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32) sont capables de s'associer avec CLIMP-63.

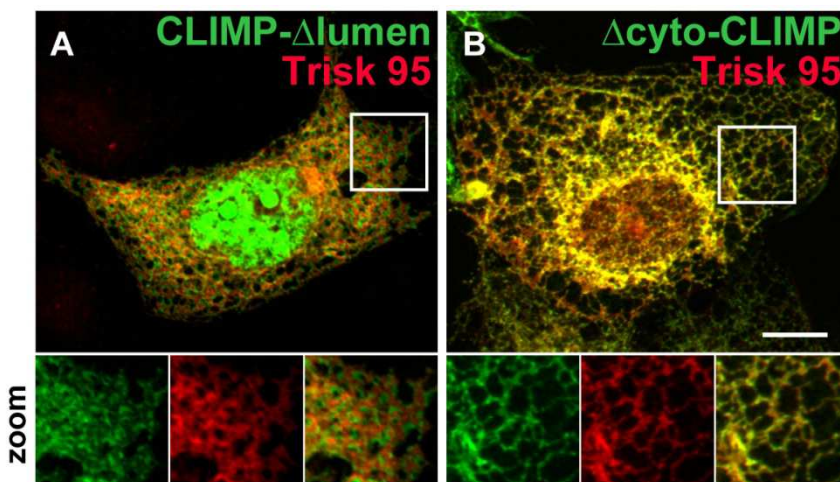
## F) Le domaine luminal de CLIMP-63 s'associe à Trisk 95.

Pour étudier les domaines de CLIMP-63 impliqués dans l'interaction avec Trisk 95, deux mutants de CLIMP-63 ont été générés. Pour le mutant CLIMP- $\Delta$ lumen, toute la partie luminale a été remplacée par une protéine de fusion GFP. A l'inverse, pour le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP, toute la partie cytoplasmique a été remplacée par une protéine de fusion GFP. (Figure R35).



**Figure R35 : Les mutants de délétion de CLIMP-63.** Représentation schématique des différents mutants CLIMP- $\Delta$ lumen et  $\Delta$ cyto-CLIMP. Ces deux mutants sont fusionnés avec une GFP (rond vert foncé). Les différents domaines spécifiques sont visibles = TM : le domaine transmembranaire (aa 107-126), CC : les domaines coiled-coil. Les nombres indiquent les acides aminés.

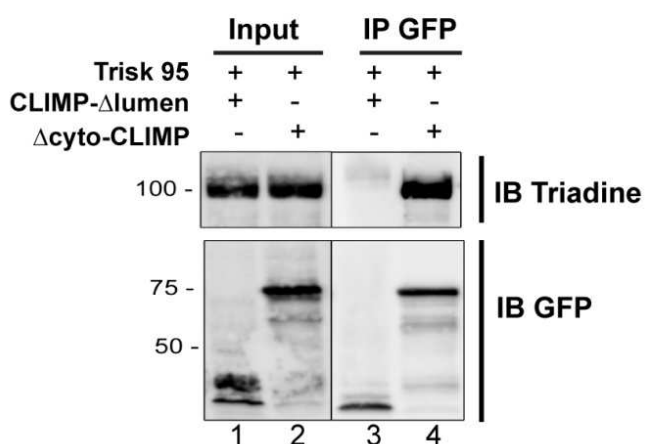
Nous avons co-transfecté Trisk 95 avec l'un ou l'autre de ces mutants. Les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CLIMP ou anti-GFP (en vert) et avec un anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de la triadine (en rouge) (Figure R36). Aucune des doubles transfections n'a permis d'observer un phénotype de RLS. Toutefois le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP présente un marquage qui colocalise avec le marquage de Trisk 95 dans le reticulum (Figure R36B, zoom) tandis que CLIMP- $\Delta$ lumen présente un marquage différent du marquage de Trisk 95 (Figure R36A, zoom).



**Figure R36 : Le domaine luminal de CLIMP-63 est important pour son association avec Trisk.** Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec Trisk95 et CLIMP- $\Delta$ lumen (A) ou  $\Delta$ cyto-CLIMP (B). La localisation des mutants de CLIMP-63 (vert) et de Trisk 95 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. Le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP colocalise avec Trisk 95 dans le RE tandis que le mutant CLIMP- $\Delta$ lumen ne colocalise pas avec Trisk 95 (zoom). CLIMP-63 délétée de ses parties luminale ou cytoplasmique n'induit plus de RLS. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

Comme pour Trisk 95, il semble que ce soit le domaine luminal de CLIMP-63 qui permette l'association avec Trisk 95.

La validation des résultats précédents a été réalisée par co-immunoprécipitation. Les cellules HEK293 ont été transduites avec un adénovirus codant pour Trisk 95 et transfectées avec le mutant CLIMP- $\Delta$ lumen ou le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP. Les immunoprécipitations ont été réalisées avec le kit GFP trap. Dans les deux conditions, chaque mutant de CLIMP-63 a été correctement immunoprécipité (Figure R37, lignes 3 et 4). Trisk 95 est présente dans les protéines co-immunoprécipitées avec le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP (Figure R37, ligne 4), mais est absente des protéines co-immunoprécipitées avec le mutant CLIMP- $\Delta$ lumen (Figure R37, ligne 3).



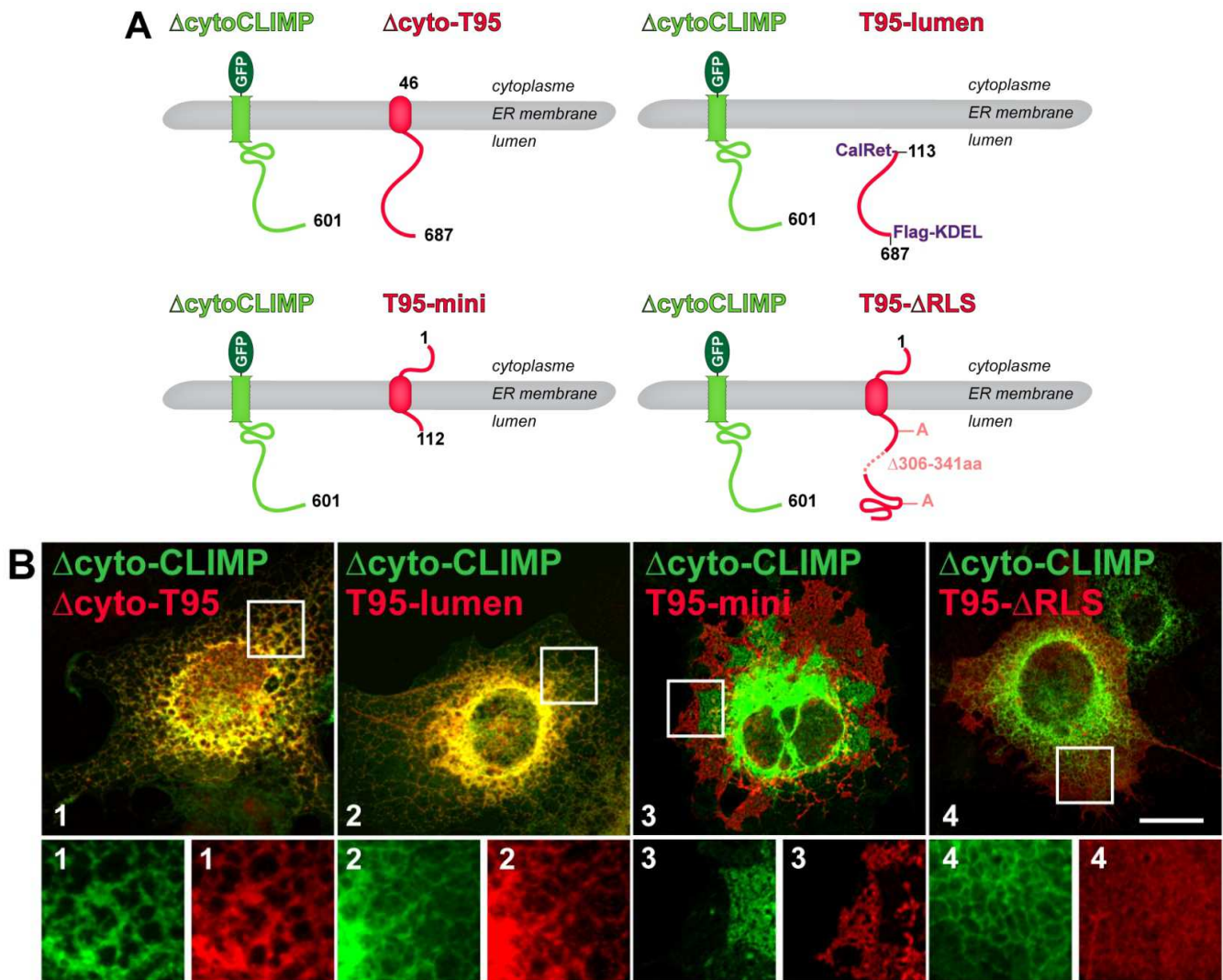
**Figure R37 : Immunoprécipitation de CLIMP- $\Delta$ lumen et  $\Delta$ cyto-CLIMP.** Les lysats (**Input**, lignes 1, 2) ont été réalisés sur des cellules HEK293 co-transfectées avec Trisk95 et CLIMP- $\Delta$ lumen (lignes 1, 3), ou  $\Delta$ cyto-CLIMP (lignes 2, 4). Les expériences d'IP (**IP GFP**, lignes 3, 4) ont été réalisées sur ces lysats en utilisant le kit GFP-Trap®. Trisk 95 est visible à 95 kDa, CLIMP- $\Delta$ lumen à environ 40 kDa, et  $\Delta$ cyto-CLIMP à 75 kDa.

Le domaine luminal de CLIMP-63 est donc important pour sa liaison avec Trisk 95. Ces résultats d'une part confirment l'association de CLIMP-63 avec Trisk 95 qui implique leur domaine luminal respectif. D'autre part ces résultats montrent aussi que le phénotype de RLS induit par la triadine semble dépendre de CLIMP-63. En effet, en présence du mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP, Trisk 95 n'est plus capable d'induire des RLS.

Pour appuyer les résultats précédant, le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP a été indépendamment co-transfecté avec chacun des mutants de Trisk 95 (décrit dans le chapitre 1, partie C). Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CLIMP (en vert) et avec un anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de la triadine ou la séquence Flag (en rouge). Sans former de RLS et comme observé avec Trisk 95, les mutants  $\Delta$ cyto-T95 et T95-lumen colocalisent avec le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP dans le reticulum (Figure R38, panels 1 et 2). Au contraire les mutants T95-mini et T95- $\Delta$ RLS présentent des marquages qui ne colocalisent pas avec le marquage du mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP (Figure R38, panels 3 et 4).



De façon surprenante, cette absence de colocalisation entre le mutant T95-mini et le mutant  $\Delta$ cyto-CLIMP est observée par une localisation strictement différente dans le reticulum qui se traduit par une exclusion mutuelle de ces deux protéines (Figure R38, panels 3).

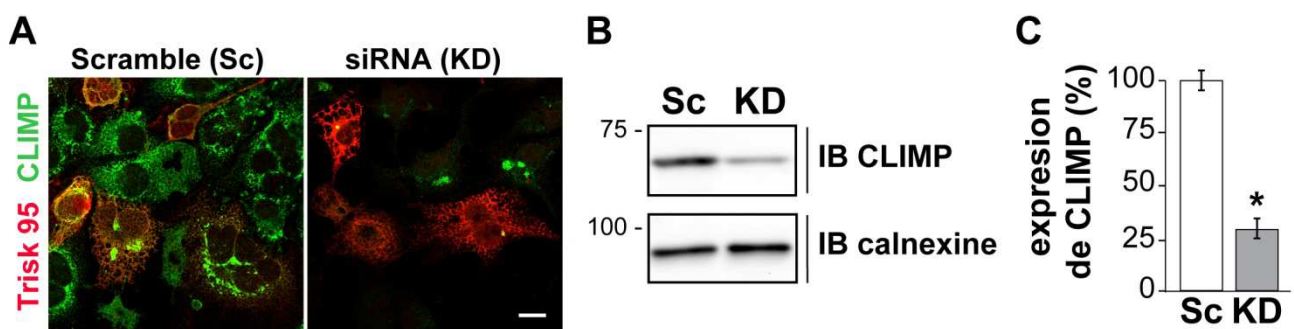


**Figure R38 : Localisations respectives de  $\Delta$ cyto-CLIMP et des mutants de la triadine dans le RE.** (A) Représentations schématiques de  $\Delta$ cyto-CLIMP et des différentes constructions de Trisk 95 délétées du domaine cytoplasmique ( $\Delta$ cyto-T95), du domaine cytoplasmique et transmembranaire (T95-lumen), du domaine luminal (T95-mini) ou des séquences spécifiques induisant les RLS (T95- $\Delta$ RLS).  $\Delta$ cyto-CLIMP est fusionnée avec une GFP (rond vert foncé). Les nombres indiquent les acides aminés. (B) Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec  $\Delta$ cyto-CLIMP et l'un des mutants de Trisk 95. La localisation de  $\Delta$ cyto-CLIMP (vert) et des différentes constructions de Trisk 95 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent.  $\Delta$ cyto-T95 (1) et T95-lumen (2) colocalisent dans le RE avec  $\Delta$ cyto-CLIMP tandis que T95-mini (3) et T95- $\Delta$ RLS (4) ne colocalisent pas. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

Ces données suggèrent encore une fois que les domaines transmembranaires de ces protéines ne jouent pas un rôle important pour l'association entre Trisk 95 et CLIMP-63. L'exclusion totale et mutuelle de ces deux protéines semble suggérer que ces protéines sont ancrées dans deux sous-domaines différents de reticulum ce qui permet d'exclure l'une de ces protéines par rapport à l'autre.

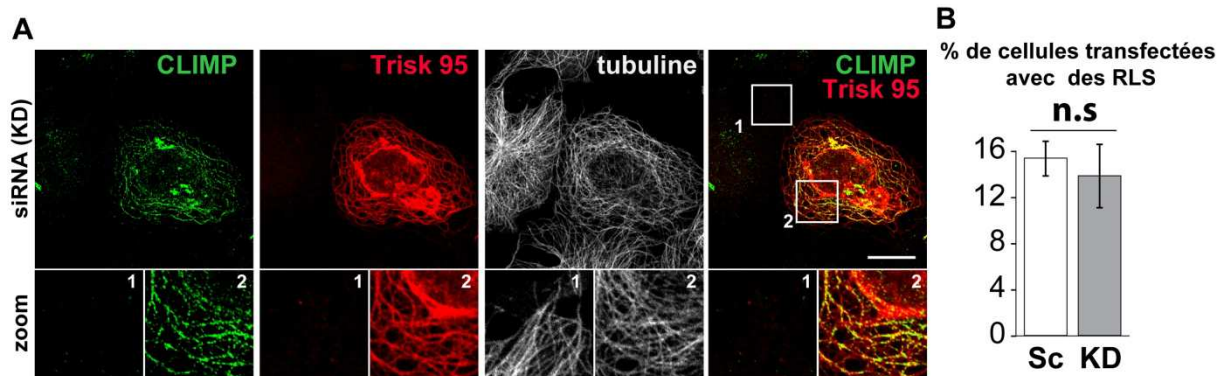
### *G) Le phénotype RLS induit par Trisk 95 dépend de CLIMP-63 et de sa capacité à lier les microtubules.*

Quand CLIMP-63 ou Trisk 95 sont indépendamment surexprimées dans des cellules modèles, cela induit des déformations de membranes de reticulum (les RLS) qui s'accompagnent d'une désorganisation du réseau de microtubules (Fourest-Lieuvain et al., 2012; Klopfenstein et al., 1998). Cependant, seule CLIMP-63 a la capacité de lier les microtubules. Notre hypothèse est que la capacité de Trisk 95 à induire des RLS serait due à sa capacité à lier et à recruter CLIMP-63. Afin de tester cette hypothèse, l'expression protéique de CLIMP-63 a été éteinte par des siRNAs dans des cellules COS-7 (Figure R39A). Les siRNAs dirigés contre CLIMP-63 ont été transfectés 28 h avant la transfection de Trisk 95 pour savoir si la capacité de Trisk 95 à induire des RLS serait inhibée dans de telles conditions. Après quantification par Western blot, nous avons constaté que les siRNAs utilisés étaient capable de diminuer d'environ 70% de l'expression de CLIMP-63 (Figure R39B et R39C).



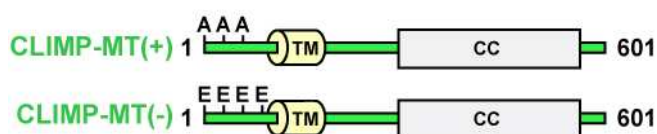
**Figure R39 : Efficacité des siRNA dirigés contre CLIMP-63.** Les siRNA-CLIMP (KD) ont été utilisés pour éteindre CLIMP-63 endogène. Un siRNA contrôle (Scramble, Sc) a été utilisé en parallèle. (A) Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 95. La localisation de CLIMP-63 (vert) et de Trisk 95 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. Barre d'échelle : 20 µm. (B) Immunoblots pour CLIMP-63 endogène et la calnexine à partir de cellules COS-7 en présence du contrôle (ligne Sc) ou du siRNA-CLIMP (ligne KD). CLIMP-63 est visible à 63 kDa, et la calnexine à 90 kDa. (C) Quantification de l'expression de CLIMP-63 réalisée à partir des immunoblots (B) rapporté à la calnexine. Les siRNA utilisés sont capables de diminuer de 70% la quantité de CLIMP-63. \* $P < 0.05$ , test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=8$  immunoblots sur trois expériences pour chaque condition.

Toutefois, cette diminution d'expression protéique n'est pas suffisante pour abolir complètement le phénotype RLS induit par Trisk 95. (Figure R40A et R40B)



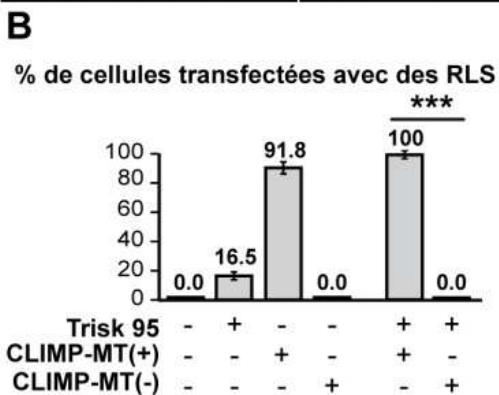
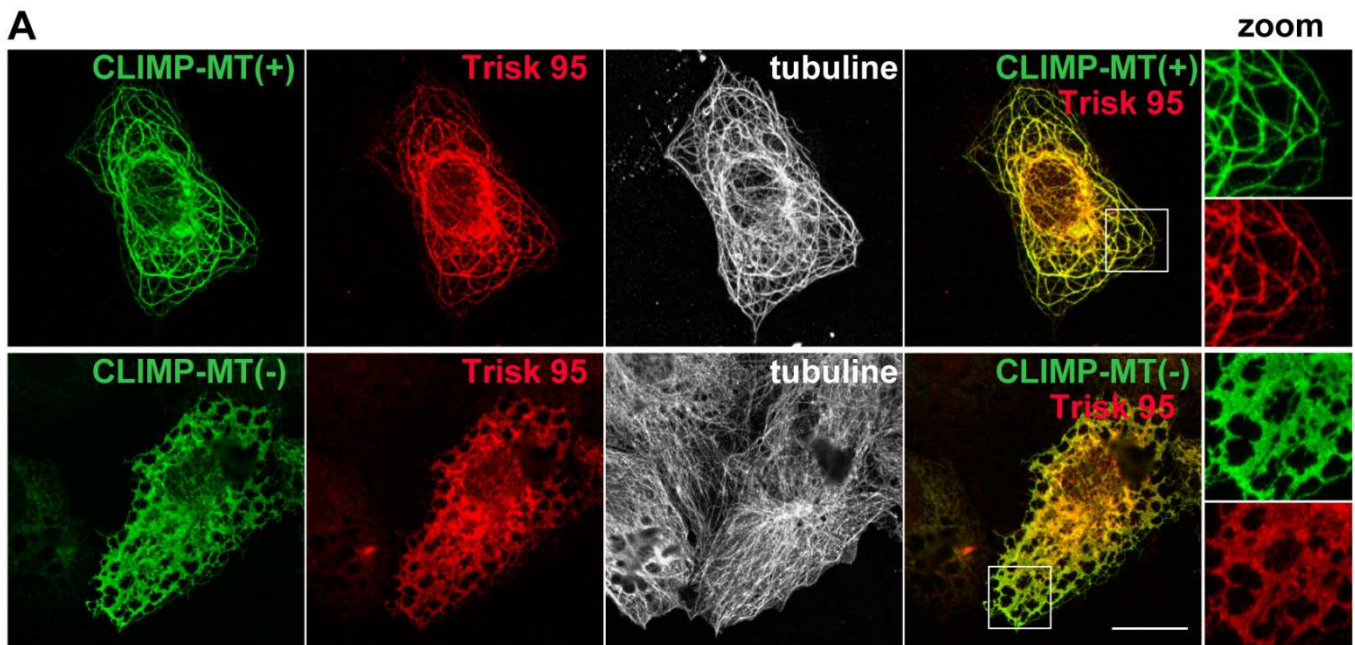
**Figure R40 :** Les siRNA dirigés contre CLIMP-63 ne sont pas assez efficaces pour abolir les RLS. Les siRNA-CLIMP (**KD**) ont été utilisés pour éteindre CLIMP-63 endogène. Un siRNA contrôle (Scramble, **Sc**) a été utilisé en parallèle. **(A)** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec Trisk 95. La localisation de CLIMP-63 (vert), des microtubules (tubuline, gris) et de Trisk 95 (rouge) ont été mis en évidence par marquage immunofluorescent. Les cellules exprimant Trisk 95 présentent des RLS et une désorganisation des microtubules (encadré **2**), ce qui n'est pas le cas dans les cellules n'exprimant pas Trisk 95 (encadré **1**). Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. **(B)** Quantifications des cellules COS-7 transfectées avec Trisk 95 présentant des RLS en présence ou non (ligne, **Sc**) de siRNA-CLIMP (ligne, **KD**). n.s.=non significatif, test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=3$  immunoblots sur trois expériences pour chaque condition.

Pour résoudre ce problème, une approche alternative fut trouvée en utilisant un mutant de CLIMP-63 qui n'est plus capable de lier les microtubules. Le mutant CLIMP-MT(-) est décrit comme un mutant phosphomimétique, c'est-à-dire que quatre sérines ont été mutées en acides glutamiques (CLIMP-S3E, S17E, S19E et S101E) dans son domaine cytoplasmique (Figure R41). La phosphorylation constitutive de ces quatre sites empêche ce mutant de se lier au réseau de microtubules (Vedrenne et al., 2005). Transfecté seul dans des cellules COS-7, le mutant CLIMP-MT(-) n'est plus capable de déformer le reticulum en RLS (Figure R42B). A l'inverse, le mutant CLIMP-MT(+) a été utilisé comme contrôle (Figure R41). Le mutant CLIMP-MT(+) est décrit comme un mutant phosphodéficient qui est toujours lié aux microtubules et dont trois sérines, cette fois, ont été mutées en alanines (CLIMP-S3A, S17A et S19A). Exprimé seul dans des cellules COS-7, le mutant CLIMP-MT(+) forme des RLS à plus de 90% dans les cellules transfectées (Figure R42B).



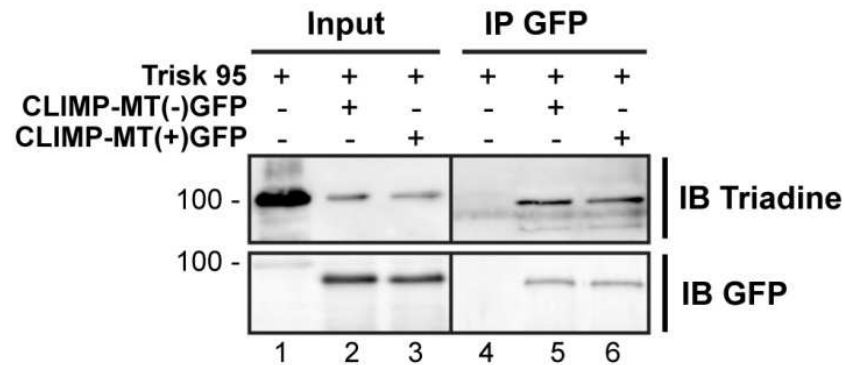
**Figure R41 :** Les mutants de phosphorylation de CLIMP-63. Représentation schématique des différents mutants CLIMP-MT(+) et CLIMP-MT(-). Les différents domaines spécifiques sont visibles = TM : le domaine transmembranaire (aa 107-126), CC: les domaines coiled-coil. Les 'A' représentent trois sérines mutées en alanine (S3A, S17A et S19A). Les 'E' représentent quatre sérines mutées en acide glutamique (CLIMP-S3E, S17E, S19E et S101E). Les nombres indiquent les acides aminés des constructions.

Ainsi Trisk 95 a été co-exprimée dans des cellules COS-7 avec CLIMP-MT(-) ou avec CLIMP-MT(+) (Figure R42A). Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CLIMP (en vert), avec un anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de la triadine (en rouge) et avec un anticorps anti-tubuline qui marque les microtubules (gris). La capacité à induire des RLS a été examinée. Cent pour cent des cellules co-transfectées avec le mutant CLIMP-MT(+) et Trisk 95 présentent des RLS et présentent un réseau de microtubules désorganisé (Figure R42B). CLIMP-MT(+), simplement transfectée, induit 91% de RLS. En effet, l'effet des surexpressions combinées de CLIMP-63 et de Trisk 95 semblent synergique. A l'opposé, les cellules co-transfectées avec le mutant CLIMP-MT(-) et Trisk 95 ne montrent jamais un phénotype de RLS (Figure R42A et R42B). De plus on observe avec ce mutant que le réseau de microtubules a une organisation normale.



**Figure R42 : Le phénotype de Trisk 95 est aboli par le mutant de CLIMP-63 qui ne lie plus les microtubules.** (A) Les cellules COS-7 ont été co-transfectées avec Trisk 95 et soit CLIMP-MT(+) soit Trisk 95+CLIMP-MT(-). La localisation des mutants de CLIMP-63 (vert) et de Trisk 95 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. Trisk 95 colocalise avec CLIMP-MT(+) dans les RLS et avec CLIMP-MT(-) sans former de RLS. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (B) Quantification des cellules présentant des RLS. \*\*\* $P$ <0.001, test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=3$  à 7 comptes de 100 cellules transfectées dans au minimum trois expériences pour chaque condition.

Cette absence de RLS n'est pas due à l'incapacité de Trisk 95 à lier le mutant CLIMP-MT(-) car nous avons montré par des expériences de co-immunoprécipitation que ces deux protéines sont associées à Trisk 95 (Figure R43, lignes 5 et 6).



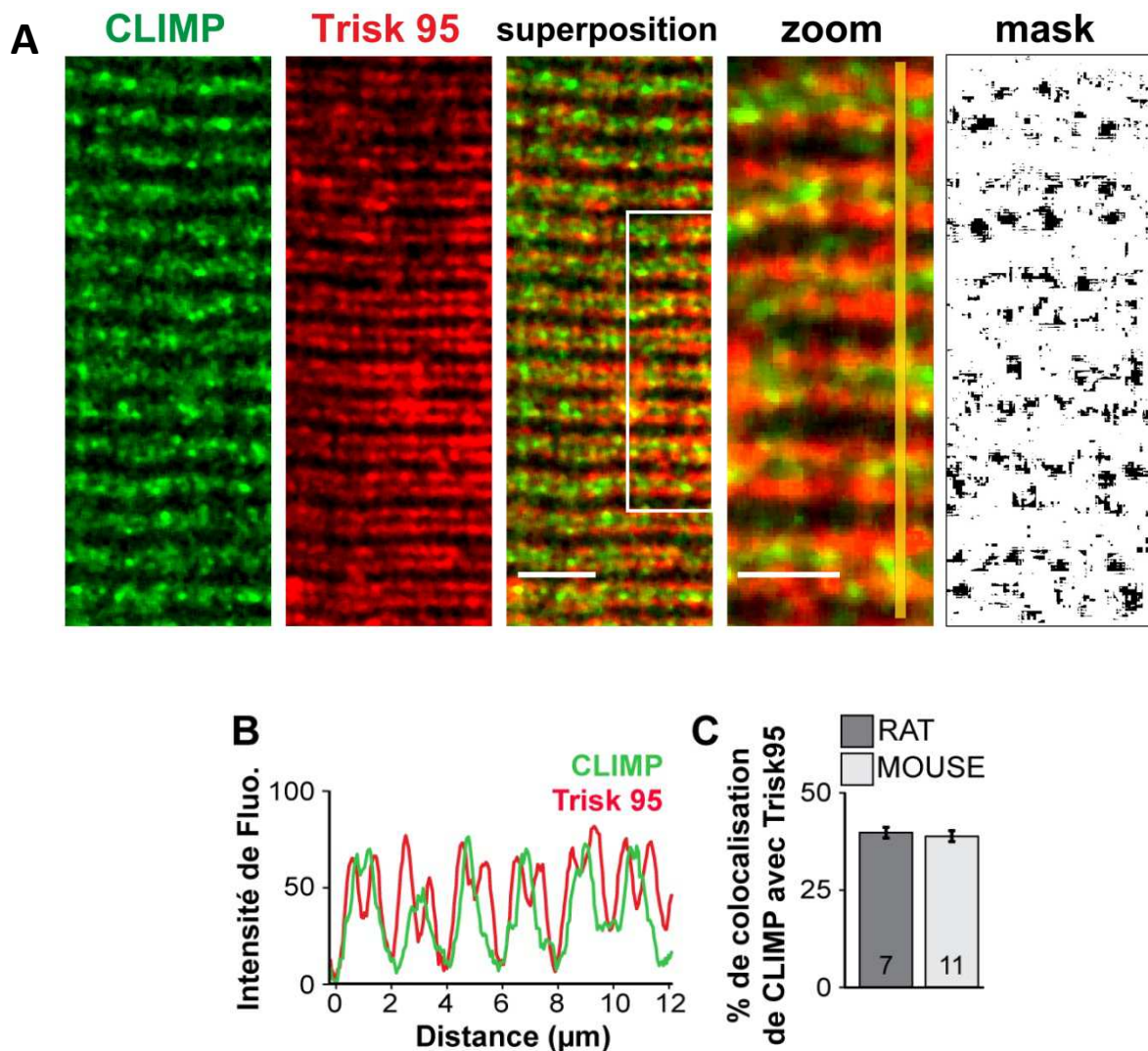
**Figure R43 : Immunoprécipitation de CLIMP-MT(+) et CLIMP-MT(-).** Les deux mutants de CLIMP-63 sont fusionnés avec une GFP en position C-terminale. Les lysats (**Input**, lignes **1, 2, 3**) ont été réalisés sur des cellules HEK293 soit transfectées avec Trisk 95 (lignes **1, 4**), soit co-transfectées avec Trisk 95 et CLIMP-MT(-) (lignes **2, 5**) ou Trisk 95+CLIMP-MT(+) (lignes **3, 6**). Les expériences d'IP (**IP GFP**, lignes **4, 5, 6**) ont été réalisées sur ces lysats en utilisant le kit GFP-Trap®. Trisk 95 est visible à 95 kDa et les deux mutants de CLIMP-63 fusionnés à la GFP à environ 90 kDa.

Ces données suggèrent que le mutant CLIMP-MT(-) agit comme un dominant négatif et donc abolit la capacité de Trisk 95 à induire des RLS. Le remodelage du RE induit par Trisk 95 dépend à la fois de CLIMP-63 et de la capacité de cette dernière à lier les microtubules.

Trisk 95 est une protéine spécifique du muscle et nous venons de démontrer l'association du trio Trisk 95/CLIMP-63/microtubules dans les cellules modèles. Qu'en est-il dans muscle ? Pour savoir s'il existe une réalité physiologique à cette association, nous avons examiné ce trio dans les cellules musculaire.

## H) Trisk 95 et CLIMP-63 sont associées dans des cellules musculaires

CLIMP-63 est une protéine ubiquitaire mais n'a jamais été caractérisée dans le muscle. Des marquages immunofluorescents de CLIMP-63 et Trisk 95 ont été réalisés dans des fibres musculaire dissociées *flexor digitorum brevis* (FDBs) de rat (Figure R44).



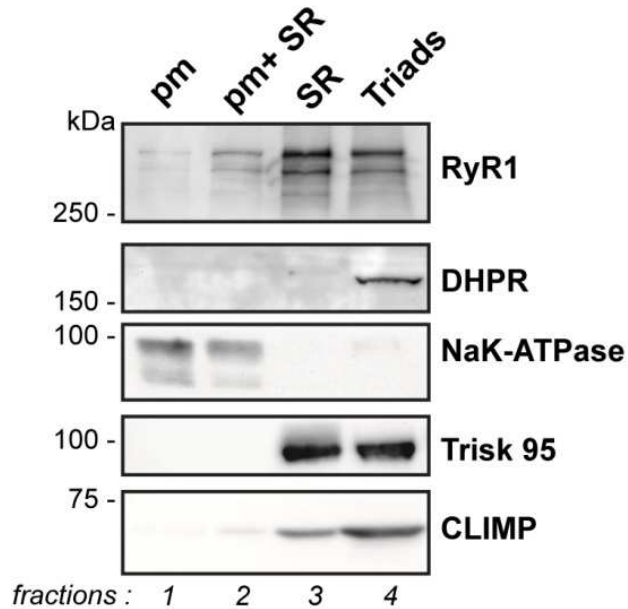
**Figure R44 : Dans les cellules musculaires, Trisk 95 colocalise souvent avec CLIMP-63.** (A) Dans des fibres dissociées de muscle FDB de souris, la localisation de CLIMP-63 (vert) et de Trisk 95 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. L'image binaire (**mask**, panel de droite) représente en noir la fraction du marquage de CLIMP-63 qui colocalise avec le marquage de Trisk 95 sur l'image zoomée. Les barres d'échelles dans l'image superposition et de zoom sont respectivement de 5 et 2.5 μm. (B) L'intensité de fluorescence en fonction de la distance a été mesurée sur six triades successives représentée par la barre jaune dans le zoom. (C) Pourcentage du marquage de CLIMP-63 qui colocalise avec le marquage de Trisk 95 dans des FDB de rat (gris foncé) et de souris (gris clair), quantifié en utilisant les images binaires comme illustré en (A). Les barres d'erreurs sont des s.e.m. Les quantifications ont été réalisées sur 7 images à partir de deux expériences sur les FDB de rat et de 11 images à partir de trois expériences sur les FDB de souris.

Les triades qui sont marquées par un anticorps anti-Trisk 95 (en rouge), présentent un pattern strié très organisé en double rangée de points transversal à l'axe de la fibre. CLIMP-63, marquée par un anticorps anti-CLIMP (en vert), présente un marquage avec des points également arrangés en stries, qui ressemble à un marquage du reticulum. Une colocalisation partielle entre les marquages de Trisk 95 et CLIMP-63 a pu être mise en évidence et validée sur le profil d'intensité de fluorescence (Figure R44A et R44B).

Des résultats similaires ont été obtenus sur des FDBs de souris. L'image de masque reflète un traitement binaire des points de colocalisation. Ce traitement des images a été réalisé sous ImageJ pour permettre une quantification de la colocalisation (Figure R44A mask). Cette quantification montre qu'il existe 40% de colocalisation entre Trisk 95 et CLIMP-63 chez le rat, et 39% chez la souris (Figure R44C). La colocalisation de CLIMP-63 avec Trisk 95 n'est donc que partielle. L'explication la plus probable vient du fait que CLIMP-63 est une protéine structurante du reticulum localisée dans tout le RS alors que Trisk 95 est une protéine spécifique de la triade qui est un sous-domaine du RS.

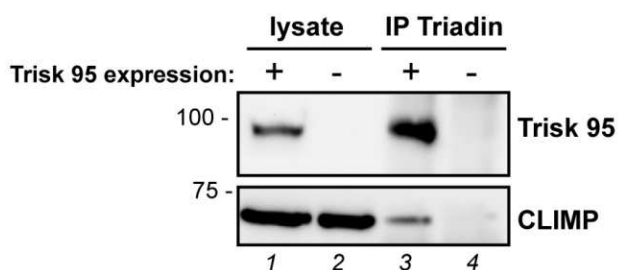
Des tests biochimiques ont permis de confirmer ce résultat. Un fractionnement cellulaire de muscle de souris adulte a été réalisé par Marine Cacheux (ancienne doctorante dans le laboratoire), définissant ainsi quatre fractions (Figure R45). La fraction 1 correspond à la membrane plasmique marquée par la présence de la pompe NaK ATPase. La fraction 2 correspond à la membrane plasmique avec le RS marqué par la présence de la pompe NaK ATPase et du RyR1. La fraction 3 correspond seulement au RS marqué par la présence du RyR1 et de Trisk 95. Tandis que la fraction 4 correspond aux triades marquées par la présence du RyR1, de Trisk 95 et du DHPR.

J'ai regardé la localisation de CLIMP-63 dans ces quatre fractions. CLIMP-63 est localisé dans les fractions 3 et 4, c'est-à-dire dans le RS et à la triade, partout où se trouve la triadine.



**Figure R45 : Fractionnement cellulaire à partir de muscle squelettique de souris.** Des microsomes de muscle squelettique de souris ont été solubilisés au froid avec du Triton-X-100 à 1% puis déposés au fond d'un gradient discontinu. Ce gradient a été soumis à une centrifugation pour séparer quatre fractions. La fraction 1 (**pm**, ligne 1) représente la fraction de la membrane plasmique. La fraction 2 (**pm+SR**, ligne 2) représente la fraction de la membrane plasmique et du RS. La fraction 3 (**SR**, ligne 3) représente la fraction du RS. La fraction 4 (**Triads**, ligne 4) représente la fraction des triades. Le RyR est visible à 500 kDa, le DHPR à 200 kDa, la pompe NaK-ATPase à environ 100 kDa, Trisk 95 à 95 kDa, et CLIMP-63 à 63 kDa.

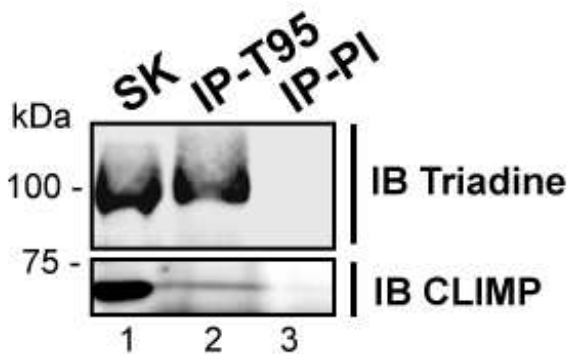
En parallèle, une série de co-immunoprécipitations a été réalisée dans des cellules musculaires. La première immunoprécipitation a été réalisée par Sarah Oddoux (ancienne doctorante dans le laboratoire) sur une lignée musculaire, les cellules L6, utilisées ici non différenciées (Figure R46). Dans ces cellules, Trisk-95 a été introduit par des adénovirus. Après l'immunoprécipitation de Trisk 95, CLIMP-63 a été observé parmi les protéines co-immunoprécipitées (Figure R46, ligne 3) alors que la même expérience dans des cellules non transduites, ne résulte pas en la présence de CLIMP-63 (Figure R46, ligne 4).



**Figure R46 : Immunoprécipitation de Trisk 95, dans des cellules L6.** A partir de cellules L6 non transduites (lignes 2, 4) ou transduites avec Trisk 95 (lignes 1, 3), les expériences d'IP (**IP triadin**, lignes 3, 4) ont été réalisées en utilisant un anticorps anti-Cterminal Trisk 95. Trisk 95 est visible à environ 95 kDa, et CLIMP-63 à 63 kDa.



La seconde série d'immunoprécipitation a été réalisée dans des muscles adultes, exprimant Trisk 95 endogène. En utilisant des anticorps anti-Trisk 95, des expériences de co-immunoprécipitation ont été faites à partir d'une fraction microsomale issue de muscle de souris adulte. La Figure R47 montre que CLIMP-63 est partiellement co-immunoprécipitée avec Trisk 95 (Figure R47, ligne 2) tandis que dans l'immunoprécipitation contrôle réalisée avec du sérum pré-immun, CLIMP-63 n'est pas présent (Figure R47, ligne 3).



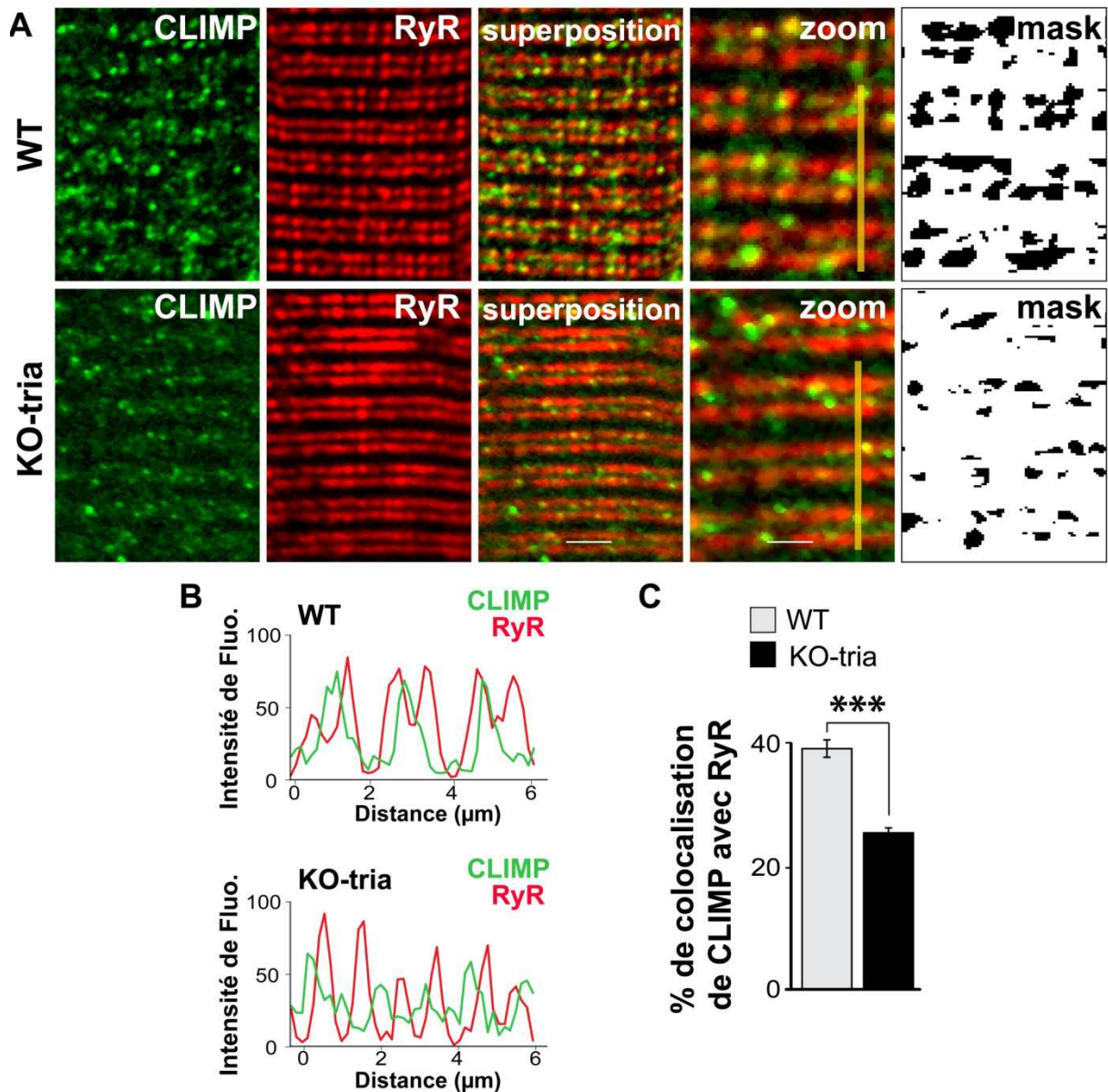
**Figure R47 : Immunoprécipitation de Trisk 95 à partir de muscle squelettique de souris.** Le lysat (SK, ligne 1) a été réalisé sur des microsomes de muscles de souris. Les expériences d'IP (lignes 2 IP-T95, 3 IP-PI) ont été réalisées sur ce lysat en utilisant un anticorps anti-Cterminal Trisk 95. Trisk 95 est visible à environ 95 kDa, et CLIMP-63 à 63 kDa.

Ces résultats de biochimie comme ceux de biologie cellulaire suggèrent que CLIMP-63 est bien un partenaire physiologique de Trisk 95 dans les cellules musculaires.

### *1) La présence de CLIMP-63 aux triades dépend de Trisk 95.*

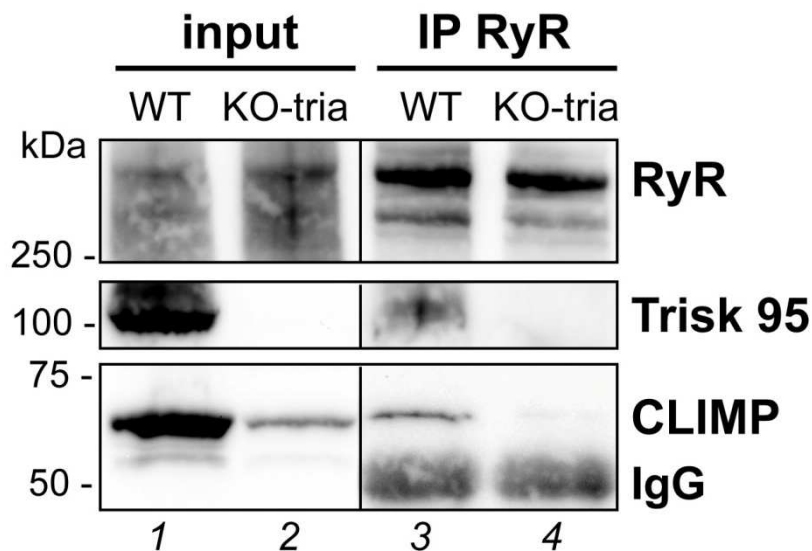
D'après nos précédents résultats, une partie de CLIMP-63 est localisée à la triade vraisemblablement via Trisk 95. La localisation de CLIMP-63 dans les FDB de souris invalidées pour le gène de la triadine (souris KO-triadine), déplétées de toutes les isoformes de la triadine, a été examinée. Les triades ont été marquées en utilisant un anticorps anti-RyR1.

Dans les FDBs de souris KO-triadine, le marquage de RyR1 en double rangées de points, reste identique aux souris wild type (WT) (Oddoux et al., 2009). Dans les souris KO-triadine, le marquage de CLIMP-63 est quant à lui moins colocalisé avec les triades que dans les souris WT (Figure R48A), ainsi que le montrent les profils d'intensité de fluorescence respectifs (Figure R48B). Par un traitement binaire des images (voir figure R44), la quantité relative de CLIMP-63 colocalisée avec le RyR1 est de 40% dans les souris WT et 26% dans les souris KO-triadine, soit une réduction significative d'environ 30% dans les souris KO-triadine (Figure R48A mask et R48C).



**Figure R48 : L'absence de triadine résulte en une délocalisation partielle de CLIMP-63.** (A) Dans des fibres dissociées de muscle FDB de souris, la localisation de CLIMP-63 (CLIMP, vert) et de RyR1 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. L'image binaire (**mask**, panel de droite) représente en noir la fraction du marquage de CLIMP-63 qui colocalise avec le marquage de RyR1 sur l'image zoomée. Les barres d'échelles dans l'image superposition et de zoom sont respectivement de 5 et 2.5  $\mu\text{m}$ . (B) L'intensité de fluorescence en fonction de la distance a été mesurée sur trois triades successives représentée par les barres jaunes dans les zooms. (C) Pourcentage du marquage de CLIMP-63 qui colocalise avec le marquage de RyR1 dans des FDB de souris WT (gris clair) et KO-triadine (noir) quantifié en utilisant les images binaires comme illustré en (A). \*\*\* $P < 0.001$ , test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n = 11$  à 6 d'images quantifiées respectivement pour les conditions WT et KO-triadine à partir de trois expériences pour chaque condition.

Des immunoprécipitations utilisant des anticorps anti-RyR1 à partir d'une fraction microsomale (Figure R49, lignes 1 et 2) issue de muscle de souris adultes WT et KO-triadine ont été réalisées. Dans les souris WT, Trisk 95 et CLIMP-63 sont co-immunoprécipitées avec les protéines immunoprécipitées avec RyR1 (Figure R49, ligne 3). Au contraire dans les souris KO-triadine, CLIMP-63 n'est pas retrouvée dans les protéines co-immunoprécipitées avec RyR1 (Figure R49, ligne 4).



**Figure R49 : Immunoprécipitation de RyR1 à partir de muscles squelettiques de souris WT et KO-triadine.** Les lysats ont été réalisés sur des microsomes de muscles de souris WT (ligne 1, WT) et KO-triadine (ligne 2, KO-tria). Les expériences d'IP (lignes 3, 4) ont été réalisées en utilisant un anticorps anti-RyR.

Nous avons également observé dans les inputs (Figure R49, lignes 1 et 2) issu de microsomes de souris, que l'expression de CLIMP-63 est diminuée dans les souris KO-triadine par rapport aux souris WT. Bien qu'il s'agisse d'un résultat préliminaire, l'absence de la triadine entrainerait une diminution de l'expression de CLIMP-63 à la triadine.

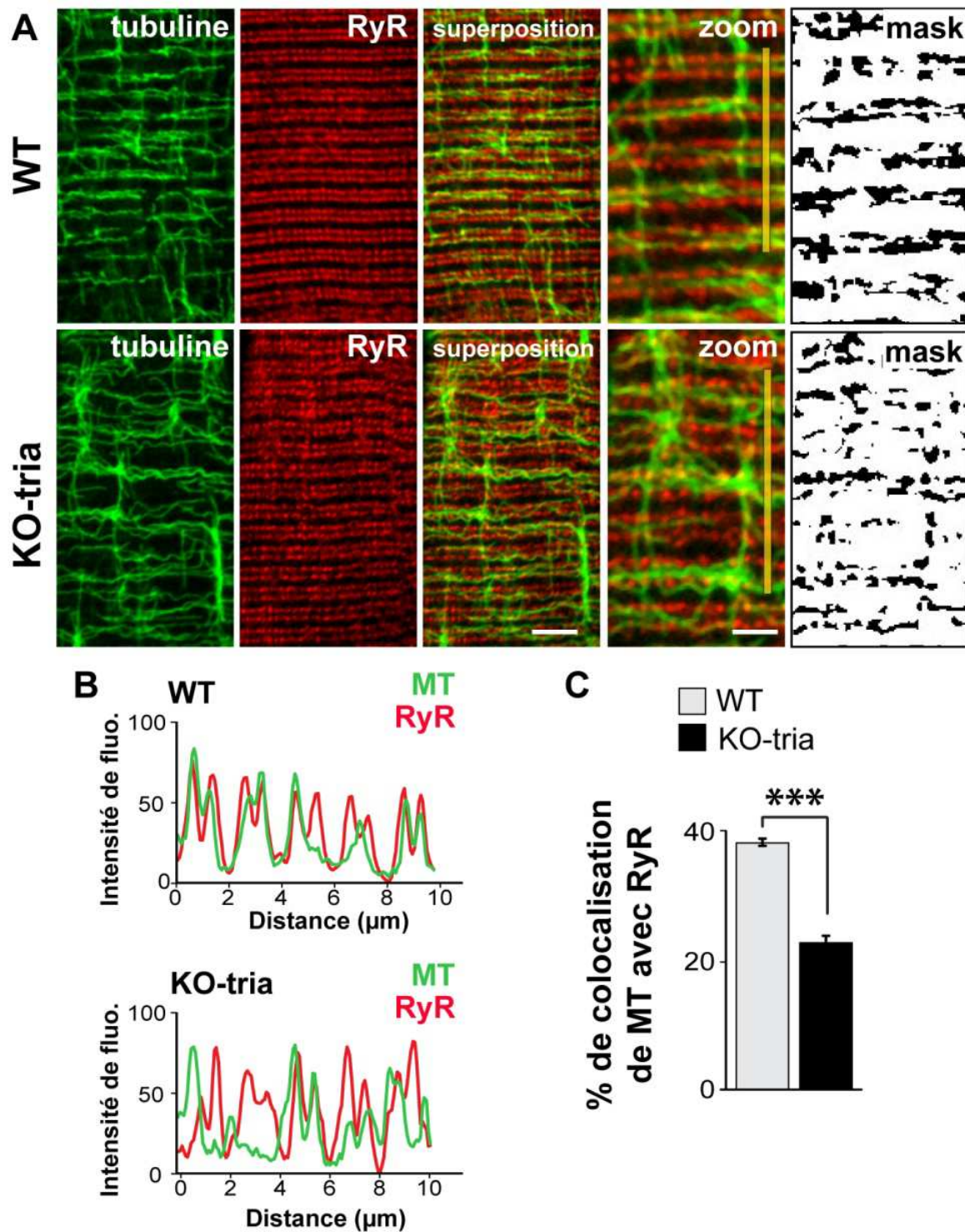
L'ensemble de ces résultats présentent une fois de plus le lien entre Trisk 95 et CLIMP-63 dans le muscle et suggèrent que CLIMP-63 est associée au complexe de relâchement du calcium par l'intermédiaire de la triadine.

## *J) L'organisation des microtubules dépend de Trisk 95 via CLIMP-63.*

Nous avons montré précédemment que CLIMP-63 a la capacité de remodeler le reticulum et de lier les microtubules. La présence de CLIMP-63 et donc des microtubules aux triades dépendrait de la présence de Trisk 95. En d'autres termes, Trisk 95 pourrait recruter les microtubules aux triades via CLIMP-63. Notre hypothèse est qu'en absence de triadines, CLIMP-63 serait moins recrutée aux triades, et donc que les microtubules établiraient moins de contact avec les triades.

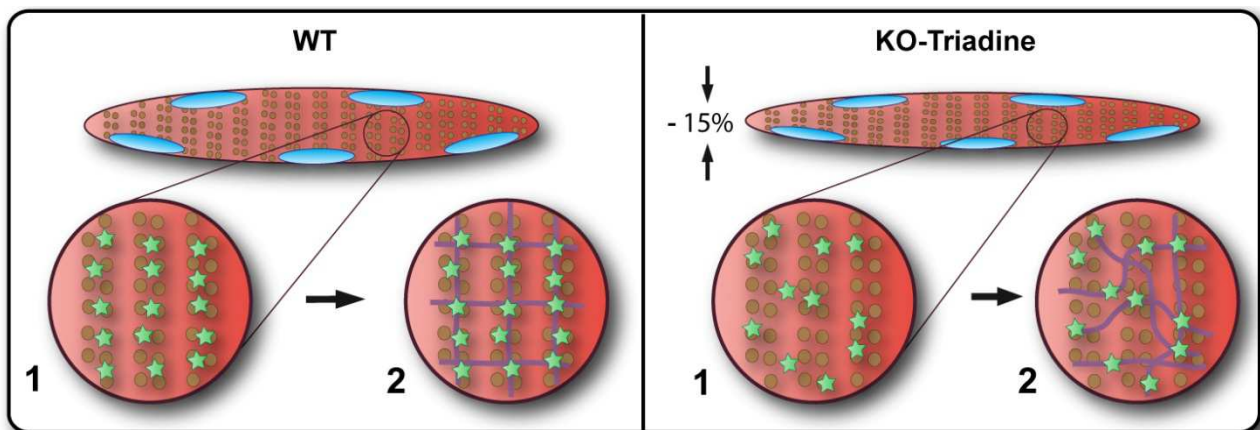
Dans ce paragraphe nous nous sommes intéressés au réseau de microtubules dans les FBDs de souris KO-triadine versus souris WT. Pour rappel, le réseau de microtubules est présent dans les souris WT sous la forme d'un réseau très spécifique et très organisé en 'quadrillage' qui s'aligne régulièrement sur les doubles rangées de points de RyR1, c'est-à-dire avec les triades (Figure R50A). Ce co-alignement est également visible sur le profil d'intensité de fluorescence (Figure R50B).





Dans les souris KO-triadine, ce réseau de microtubules est moins organisé et moins co-aligné avec les triades par rapport aux souris WT, ce qui est notamment visible sur les profils d'intensité de fluorescence des souris KO-triadine par rapport aux souris WT. Par un traitement binaire des images (voir Figure R44) la quantité relative de tubuline co-aligné avec RyR1 est de 38% dans les souris WT et 23% dans les souris KO-triadine, soit une réduction significative d'environ 40% dans les souris KO-triadine (Figure R50C).



**Figure R50 : Désorganisation du réseau de microtubules dans les muscles des souris KO-triadine.** (A) Dans des fibres dissociées de muscle FDB de souris, la localisation des microtubules (tubuline, vert) et de RyR1 (rouge) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. L'image binaire (**mask**, panel de droite) représente en noir la fraction du marquage de la tubuline qui colocalise avec le marquage de RyR1 sur l'image zoomée. Les barres d'échelles dans l'image superposition et de zoom sont respectivement de 5 et 2.5  $\mu\text{m}$ . (B) L'intensité de fluorescence en fonction de la distance a été mesurée sur cinq triades successives représentée par les barres jaunes dans les zooms. (C) Pourcentage du marquage de la tubuline (MT) qui colocalise avec le marquage de RyR1 dans des FDB de souris WT (gris clair) et KO-triadine (noir) quantifié en utilisant les images binaires comme illustré en (A). \*\*\* $P < 0.001$ , test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=9$  à 6 d'images quantifiées respectivement pour les conditions WT et KO-triadine à partir de trois expériences pour chaque condition.

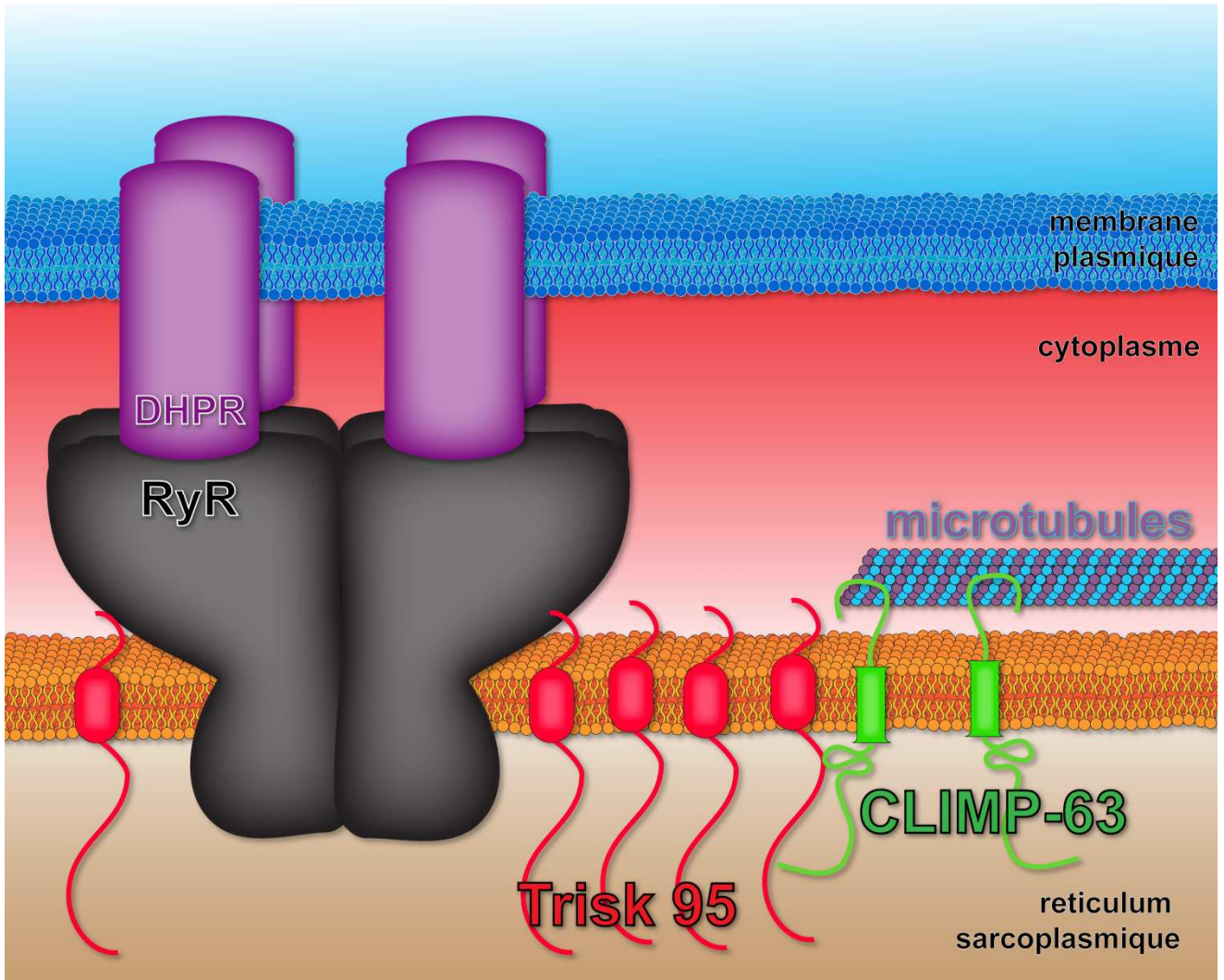
Dans les souris KO-triadine, l'organisation de CLIMP-63 et des microtubules semble différente comparée aux souris WT (Figure R51). Il semble que la localisation anormale de CLIMP-63 dans le muscle KO-triadine, provoquerai une réorganisation du réseau de microtubules dans ces cellules musculaires. Il serait donc important d'observer des cellules très différenciées qui ne possèdent plus cette association 'triade/microtubules', en utilisant par exemple le mutant CLIMP-MT(-).



- Légendes :**
-  noyaux
  -  CLIMP-63
  -  triades
  -  microtubules
- 1: zoom sans microtubules**  
**2: zoom avec microtubules**

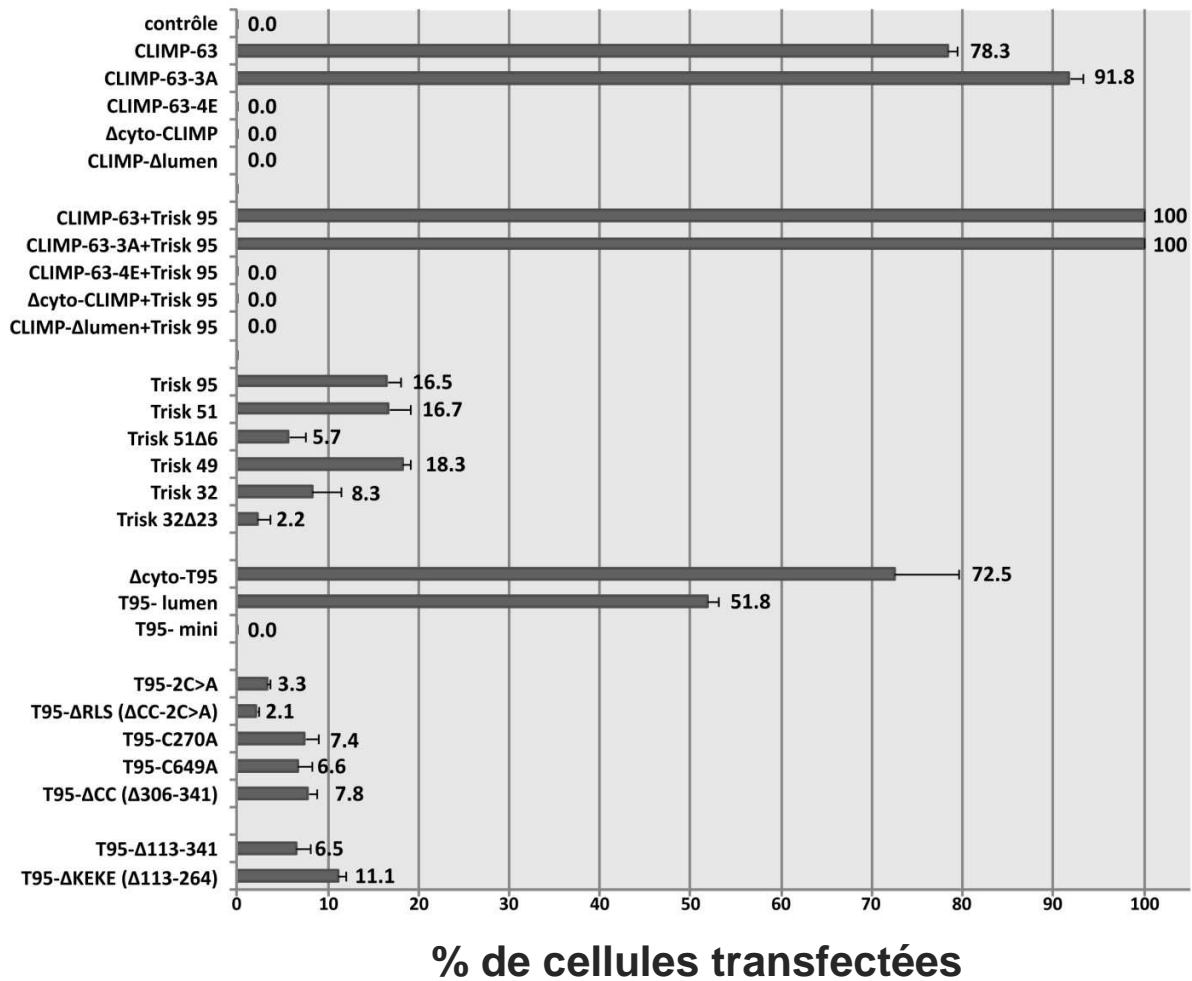
**Figure R51 : Modèle de travail = Le rôle de la triadine sur l'organisation CLIMP-63 et des microtubules dans le muscle.** Une fibre musculaire squelettique striée est représentée. Les triades sont représentées par des ronds marrons, les microtubules par des bâtonnets sombres et CLIMP-63 par des étoiles en vert. Les noyaux sont en bleu. En absence de triadine, les fibres sont légèrement hypotrophiées, de l'ordre de 15% (Oddoux et al., 2009) et présentent une délocalisation de CLIMP-63. Cette délocalisation de CLIMP-63 dans les fibres musculaires pourrait être une des raisons qui expliquerait la désorganisation du réseau de microtubules présent dans les souris KO-triadine.

Ces résultats suggèrent encore un lien potentiel entre les triades et les microtubules mais cette fois-ci dans les cellules musculaires (Figure R52). Ce lien pourrait être rompu en absence de la paire Trisk 95/CLIMP-63.



**Figure R52 : Modèle de travail = Le trio Trisk 95/CLIMP-63/microtubules permet de faire le lien entre le RS jonctionnel des triades et le réseau de microtubules.** Trisk 95 (en rouge) se lie à RyR1 (en noir) qui est couplé physiquement au DHPR (en violet), canal des tubules-T (membrane plasmique). Trisk 95 s'associe aussi avec CLIMP-63 (en vert) qui interagit directement avec les microtubules dans le cytoplasme des cellules musculaires.

## Rope-like structures



Annexe 1 : Fiche récapitulative des pourcentages de cellules transfectées présentant des RLS induits par les différentes constructions



Annexe 2 : Les potentiels sites de coupe de la trypsine sur la séquence de Trisk 95 et EGFP. Les sites de coupe de la trypsine figurent en rouge. **R** représente les résidus Arginine et **K** les résidus Lysine. Seulement quatre fragments supérieurs à 20 aa sont présents pour Trisk 95 (A).



# Perspectives et Discussions

---



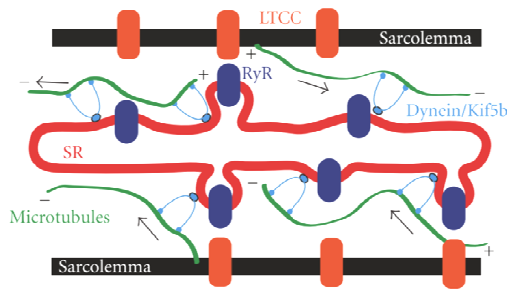
Le but de mon travail a été de mieux comprendre le rôle de la triadine et notamment de l'isoforme Trisk 95 dans le muscle squelettique. Cette étude m'a permis de mettre en évidence le rôle structural de la triadine et la découverte d'une association entre le RS et le réseau de microtubules via la triadine et CLIMP-63. Je vais par la suite discuter certains points qui m'ont paru tout à fait intéressant durant ma thèse et je vais énoncer certaines hypothèses pour essayer d'y répondre.

### *Formation et maintien des triades : Actine / Microtubule ?*

La triade est une structure très spécifique et morphologiquement unique. Dans le muscle squelettique, sa structure permet le rapprochement jusqu'à l'apposition des membranes des tubules-T et du RS via les deux canaux calciques, le DHPR et RyR1. Sa morphologie est permise grâce à l'invagination des tubules-T et aux dilatations des citernes terminales de RS. Depuis longtemps, la communauté du couplage E-C essaye de comprendre les mécanismes de la mise en place ou du maintien de la triade. C'est à partir de certaines maladies que certains éléments de réponses sont apparus. La myopathie centronucléaire est une maladie neuromusculaire héréditaire définie par la position centrale des noyaux et par des triades anormales dans les fibres musculaires (Cowling et al., 2012). La principale manifestation est une faiblesse musculaire de sévérité variable. Des mutations dans le gène *BIN-1* (codant pour l'amphiphysine 2) sont associées à ces myopathies. L'amphiphysine 2 est une protéine impliquée dans la formation des tubules-T. En association avec une protéine impliquée de la nucléation de l'actine, la protéine N-WASP, l'amphiphysine 2 a été impliquée dans la distribution des noyaux et dans la formation et la maintenance des triades (Falcone et al., 2014). La conclusion de ce travail est que l'organisation des triades serait dépendante de l'actine.

Les microtubules semblent aussi avoir un rôle important dans le développement des cellules musculaires. En effet, les microtubules sont indispensables au niveau du RS et d'une manière plus générale sont d'une importance capitale dans le muscle squelettique et cardiaque. En effet, de nombreuses études mettent en avant le rôle des microtubules dans les cellules cardiaques. Dans le cadre des hypertrophies cardiaques, la surcharge de pression systolique résulte en un excès de microtubules qui seraient responsables des dysfonctionnements contractiles (Tsutsui et al., 1993; Tsutsui et al., 1994). Le cœur est un organe autonome présentant des contractions et donc des cycles de libération/repompage du calcium permanents. Chaque potentiel d'action induit une libération de calcium. La fidélité du couplage E-C dans les myocytes ventriculaires est remarquable. Dans ces cellules cardiaques

les microtubules ont un effet sur ce couplage. Les perturbations des microtubules par la colchicine sont identiques à des stimulations  $\beta$ -adrénergiques. Ces effets résultent en une augmentation de la densité du courant calcique et des courants transitoires de calcium (Gomez et al., 2000). Dans le cœur, les microtubules via les moteurs moléculaires dynéine et kinésine (et notamment Kif5b) seraient semble-t-il d'importants régulateurs dans la motilité du reticulum sarcoplasmique (Figure P1) (Vega et al., 2011).

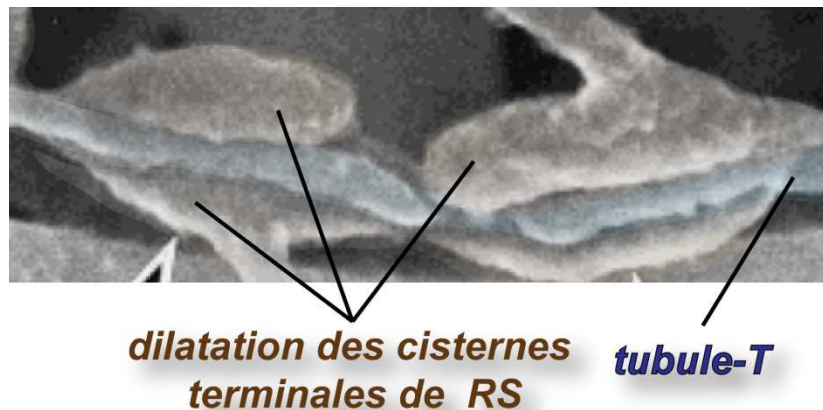


**Figure P1 : Modèle illustrant la régulation de la structure et la mobilité du RS dans des myocytes ventriculaires.** Le RS est en rouge, les RyR en bleu, les DHPR en orange (LTCC), les tubules-T en noir (sarcolemme) et les microtubules en vert. D'après (Vega et al., 2011)

Dans toutes les cellules, il existe aussi un lien étroit entre le réseau de reticulum et le réseau de microtubules associé à une dynamique interdépendante entre les deux systèmes (cf chapitre IV-1-3-1 et IV-1-3-2). Nous avons donc émis l'hypothèse que dans le muscle squelettique, il existerait aussi une interdépendance entre les microtubules et le RS et plus particulièrement au niveau des citernes terminales. Certaines études ont déjà montré dans le muscle cette interdépendance. STIM-1, protéine du RS, est capable de se déplacer le long des microtubules via son interaction avec EB1, pour établir un contact avec ORAI1 dans la membrane plasmique. Ceci permet alors de remplir les stocks calciques à partir du calcium extracellulaire lorsque les stocks sont vides. Cette nouvelle source de calcium serait cruciale pour l'induction de la différenciation de myoblastes humaines (Darbellay et al., 2009). Toujours dans le muscle, la stabilisation des microtubules par les MAP, favorise le recrutement des récepteurs à l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire (Schmidt et al., 2012). Par analogie, les microtubules pourraient favoriser le recrutement de certaines protéines au niveau de la triade. Comme la triadine est capable de s'associer avec les microtubules, nous pensons que les microtubules pourraient favoriser le recrutement de la triadine à la triade. Des études sont en cours au laboratoire.

Pour résumer, nous avons émis l'hypothèse que la formation des triades est un processus complexe qui requière d'une part la formation des tubules-T que l'on peut nommer abusivement la 'tubulogenèse' et d'autre part la formation des citernes terminales de RS.

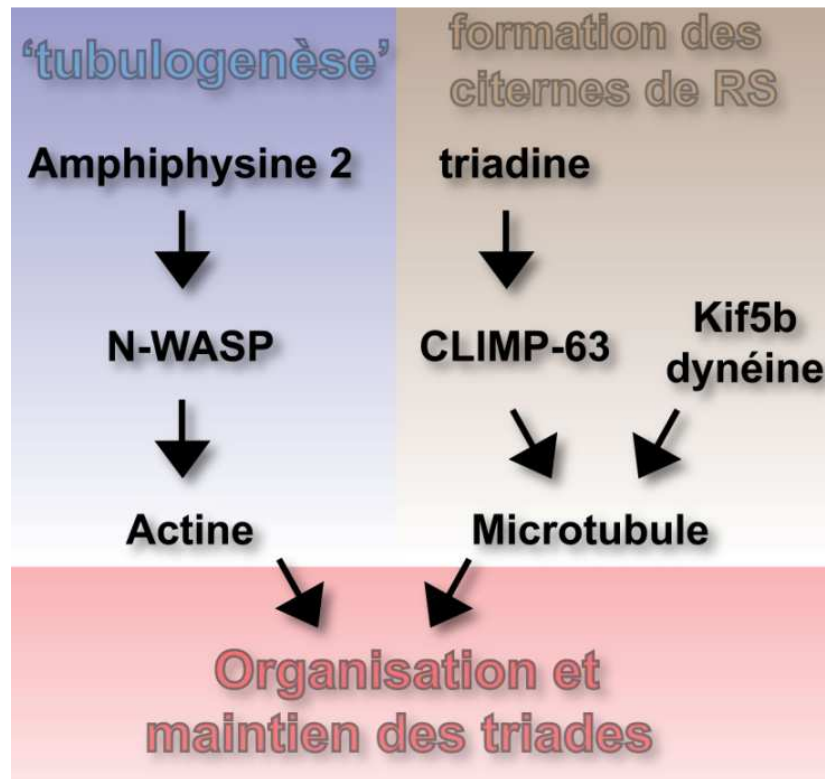
La ‘tubulogenèse’ est un processus qui semble dépendre de protéines spécifiques telles que l’amphiphysine 2, la cavéoline-3, la dynamine 2, la myotubularine ou la mitsugumine<sup>29</sup>(Al-Qusairi et al., 2009; Butler et al., 1997; Lee et al., 2002; Toussaint et al., 2011). La diminution de l’expression de certaines protéines comme de l’amphiphysine 2, de la dynamine 2 ou de la myotubularine (observé dans la myopathie centronucléaire) semble induire une mauvaise orientation des triades. De plus, ce processus semble aussi impliquer le réseau d’actine (Falcone et al., 2014).



**Figure P2 : Les citernes terminales de RS.** En haut, des dilations des citernes observées par microscopie électronique à balayage (Ogata and Yamasaki, 1997). Le tubule-T est coloré en bleu et le RS en marron clair.

A l’inverse de la ‘tubulogenèse’, peu de mécanismes sont décrits pour expliquer la formation des citernes terminales de réticulum. Dans les souris WT, les citernes de RS sont dilatées et entourent le tubule transverse pour former une structure en ‘hot dog’ (Figure P2). Le complexe de relâchement du calcium est précisément localisé au niveau de ces dilations de RS et de nombreuses souris KO pour certains gènes de ce complexe induisent des défauts dans la forme et des réductions de la dilatation des citernes (Ito et al., 2001; Oddoux et al., 2009; Paolini et al., 2007). En effet, les souris KO-triadine et les souris KO-CSQ1 présentent des citernes terminales de RS ‘aplaties’ comparé aux souris WT (cf chapitre I-4-3-3 et IV-2-4). Même si ces souris sont viables et fertiles, on peut noter toutefois que dans la souris KO triadine, l’absence de triadine conduit à une faiblesse musculaire et à une pathologie cardiaque (TVPC).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la formation des triades dépendrait à la fois du réseau d'actine qui permettrait la formation des tubules-T et aussi du réseau de microtubules qui permettrait la formation des citernes terminales de RS.



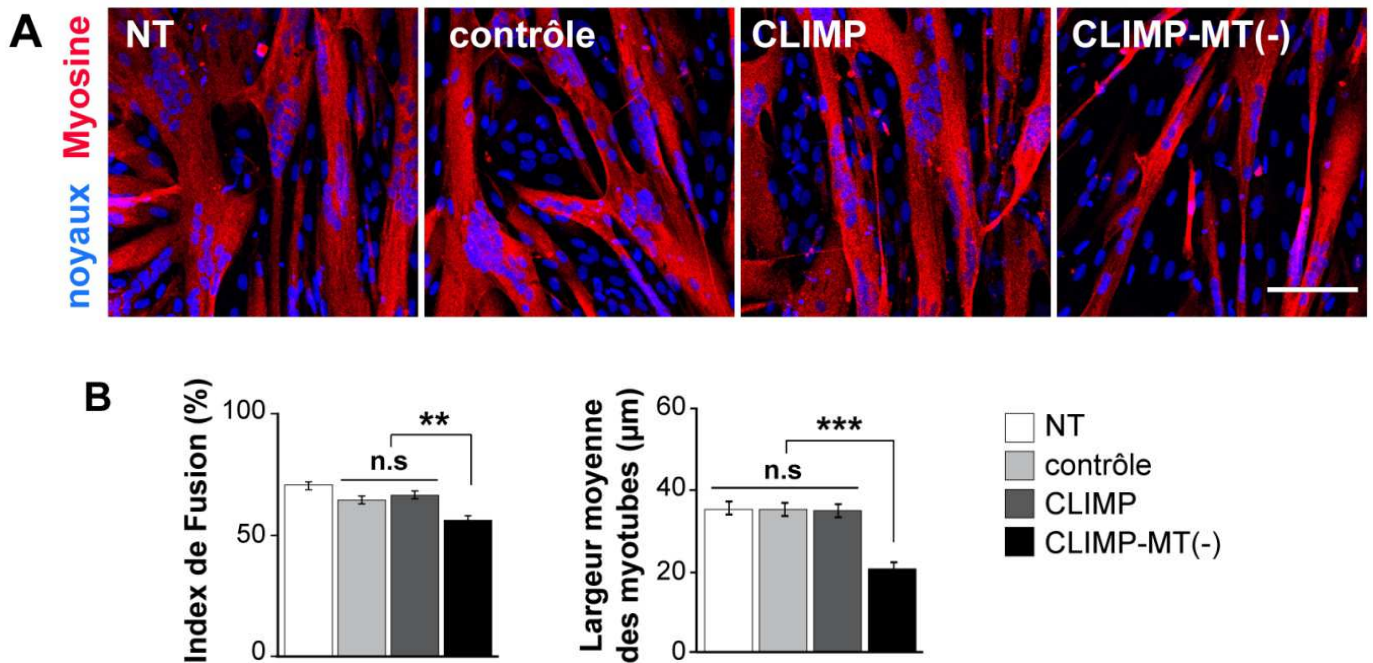
**Figure P3 : Hypothèse de travail : Représentation schématique des différentes voies qui régulent l'organisation et le maintien des triades.**

La réduction de l'expression des gènes impliqués dans la myopathie centronucléaire (amphiphysine 2, la dynamine 2 et la myotubularine) provoque une diminution des noyaux périphériques, une mauvaise orientation des triades, une diminution de la largeur des myotubes (Falcone et al., 2014). Ces trois protéines sont décrites comme des protéines indispensables pour la formation des tubules-T (Al-Qusairi et al., 2009; Butler et al., 1997; Lee et al., 2002; Toussaint et al., 2011). En outre, les gènes responsables du positionnement des noyaux et de l'organisation des triades pendant la myogenèse semblent jouer un rôle sur la largeur des myotubes. Cela suppose que les protéines impliquées dans la formation ou le maintien des triades sont aussi importantes dans le développement des cellules musculaires.

## *Le rôle de CLIMP-63 dans les cellules musculaires*

### *Utilisation du dominant négatif : CLIMP-MT(-)*

Dans un premier temps, il faudrait définir le rôle précis de CLIMP-63 dans le muscle. Les siRNA dirigés contre CLIMP-63 ne sont pas un bon modèle car l'expression de CLIMP-63 diminue seulement de 70%. Des résultats similaires ont déjà été publiés (Cui-Wang et al., 2012; Nikonov et al., 2007). L'utilisation du mutant CLIMP-MT(-) est un bon modèle pour étudier l'une des fonctions de CLIMP-63, à savoir sa capacité à lier et recruter les microtubules. Par analogie avec les protéines impliquées dans la myopathie centronucléaire, nous avons donc voulu savoir si CLIMP-63 via son interaction avec les microtubules pouvait affecter le développement des cellules musculaires. Ainsi, des myoblastes humains immortalisés ont été transduits et différenciés durant cinq jours. Les noyaux (en bleu) et la myosine (en rouge) ont été marqués (Figure P4A) pour mesurer deux paramètres morphologiques (Figure P4B): (i) l'index de fusion et (ii) la largeur moyenne des myotubes. Dans les cellules transduites avec DsRed2ER (Figure P4, contrôle), l'index de fusion et la largeur moyenne des myotubes sont identiques aux cellules transduites avec CLIMP-63 (Figure P4, CLIMP). La surexpression de CLIMP-63 dans les myotubes ne semble pas perturber la morphologie des myotubes. Cependant, dans les cellules transduites avec CLIMP-MT(-), l'index de fusion est diminué d'environ 15% et la largeur des myotubes d'environ 45% par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats préliminaires semblent indiquer que la propriété de CLIMP-63 à lier les microtubules est une propriété importante pour la morphologie des myotubes.

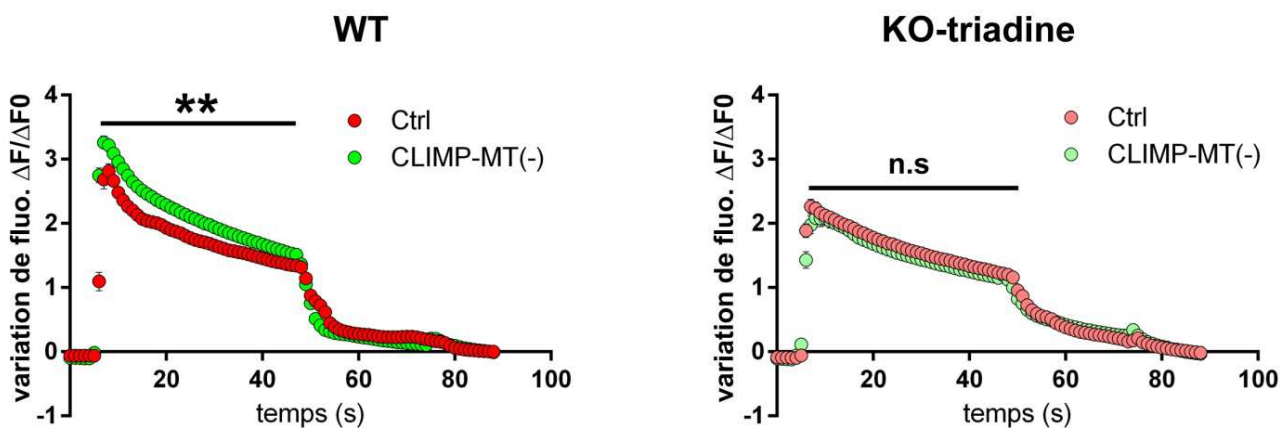


**Figure P4 : Le mutant dominant négatif de CLIMP-63 affecte le développement et la morphologie des cellules musculaire.** (A) Des myoblastes humains immortalisés ont été non transduits (panneau NT), ou transduits avec DsRed2ER (panneau **contrôle**), ou avec CLIMP-63 (panneau **CLIMP**), ou avec CLIMP-MT(-) illustrée par le panneau **CLIMP-MT(-)**. Les myoblastes ont ensuite été différenciés pendant 10 jours. La localisation de la myosine (rouge), et des noyaux (bleu) ont été mis en évidence par marquage immunofluorescent. Barre d'échelle : 100 µm. (B) L'index de fusion et la largeur moyenne des myotubes ont été quantifiées à partir des myotubes humains comme dans le (B). \*\*\* $P < 0.001$ , n.s.=non significatif, test de Mann-Whitney. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=80$  de myotubes comptés dans trois expériences pour chaque condition.

Au-delà de sa localisation au RS, pour pouvoir être définie comme une protéine du 'complexe de relâchement du calcium', une protéine doit être associée à une protéine du complexe et doit avoir un rôle dans les relâchements de calcium liés au RyR. Pour savoir si CLIMP-63 est une protéine du complexe de relâchement du calcium, nous avons réalisé avec le mutant CLIMP-MT(-) des tests d'imagerie calcique. En effet, nous avons déjà montré que CLIMP-63 est une protéine qui s'associe à Trisk 95 et qui se localise au niveau de la triade et plus précisément au niveau des citernes terminales de RS (Figure R44 et R45).



Les relâchements de calcium des cellules de souris WT et KO-triadine transduites avec le mutant CLIMP-MT(-) (en vert) ont été étudiés en imagerie calcique en appliquant un stimulus, le 4-CMC (Figure P5). Ce dernier est un agoniste du RyR1 et permet de tester directement la fonction du canal calcique. Les cellules contrôles ont été transduites avec DsRed2ER (contrôle, rouge). Dans les cellules de souris WT, la présence du mutant CLIMP-MT(-) semble avoir un effet direct sur le relâchement de calcium par RyR1. En effet, l'expression de ce mutant semble augmenter la quantité de calcium libérée par rapport aux cellules contrôles (Figure P5, WT). Au contraire dans les cellules KO-triadine, le mutant CLIMP-MT(-) ne semble pas avoir d'effet sur le relâchement de calcium par RyR1.



**Figure P5 : CLIMP-63 semble impliquée dans la régulation des relâchements de calcium.** Des myoblastes de souris WT et KO-triadine ont été transduits avec DsRed2ER (**Ctrl, rouge**), ou avec CLIMP-MT(-) (**vert**). Les myoblastes ont ensuite été différenciés pendant 3 jours. Les cellules sont chargées avec une sonde calcique Fluo4 et stimulées avec du 4-CMC 500  $\mu$ M. La stimulation induit un relâchement de calcium qui se traduit par une augmentation de fluorescence mesurée au microscope. \*\* $P < 0.01$ , n.s.=non significatif, test d'anova. Les barres d'erreurs sont des s.e.m. et  $n=89$  à 110 myotubes mesurés, dans deux expériences pour chaque condition.

Au vu de ces résultats, on peut émettre la première hypothèse que les effets fonctionnels de CLIMP-63 à la triade sont dépendants de la présence de la triadine (Figure P5, KO-triadine).

Toujours au vu de ces résultats, la propriété de CLIMP-63 à lier les microtubules semble impliquée dans la régulation des relâchements de calcium et cet effet est dépendant de la présence de la triadine. L'abolition du lien de CLIMP-63 avec les microtubules provoque une augmentation des relâchements de calcium. Les microtubules semblent avoir un rôle précis au niveau de la triade. En effet, ces expériences d'imagerie calcique suggèrent que les microtubules autour des triades régulent négativement les relâchements de calcium liés au RyR. On peut imaginer plusieurs hypothèses pour expliquer ce mécanisme :

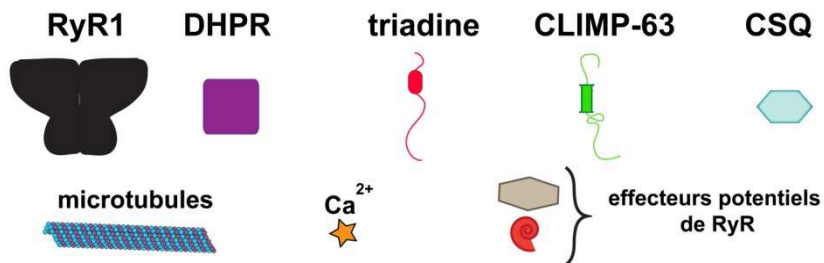
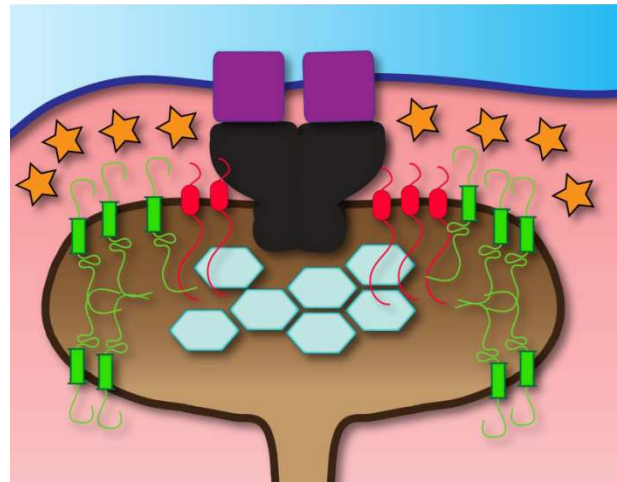
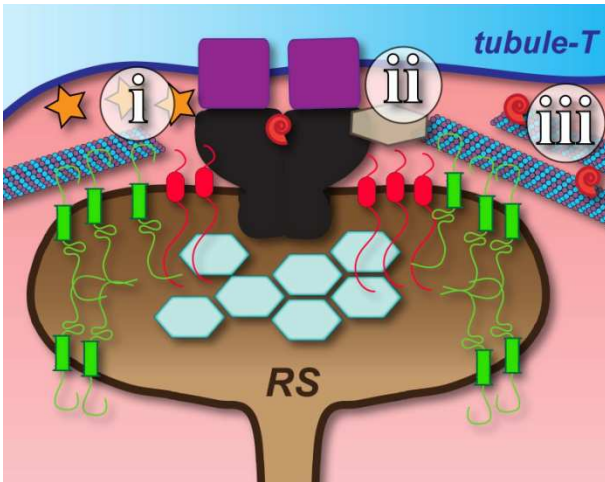
i) Les microtubules constitueraient une 'gène' stérique directe sur le RyR. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau du tubule-T active RyR. Le RyR libère alors du calcium en réponse de l'arrivée de l'influx nerveux. C'est le couplage excitation-contraction. On sait qu'à faible contraction, le calcium cytoplasmique peut activer le RyR. Au contraire, une forte concentration de calcium cytoplasmique inhibe le RyR. L'encombrement stérique des microtubules au niveau de la triade pourrait réduire l'espace disponible pour le calcium libre augmentant ainsi la concentration locale de calcium cytoplasmique ce qui inhiberait le RyR. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en présence du mutant CLIMP-MT(-), les microtubules seraient moins présents à la triade, l'espace disponible pour le calcium libre augmenterait et il faudrait donc une libération de calcium plus importante pour atteindre l'inhibition de RyR1 et l'arrêt du relâchement de calcium.

ii) Les microtubules pourraient contenir les motifs d'association avec d'autres effecteurs protéiques qui réguleraient RyR1. Dans ce cas, les microtubules réguleraient indirectement les libérations de calcium via ces effecteurs. L'absence des microtubules entraînerait aussi l'absence de ces protéines à la triade.

iii) Les microtubules sont des voies préférentielles pour le transport intracellulaires. Par exemple, RyR1 est une protéine qui possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation dans sa partie cytoplasmique. RyR est phosphorylée par la PKA et la conséquence fonctionnelle résulte en l'activation du canal RyR1 (Reiken et al., 2003). Dans le cœur, l'hyperphosphorylation de RyR2 par la PKA conduit à des arythmies cardiaques (Valdivia, 2012; Yano et al., 2006). La voie de signalisation de la phosphorylation de RyR1 pourrait impliquer le réseau de microtubules. Dans le cas présent, les microtubules pourraient ainsi indirectement réguler la fonction de RyR1 via des kinases/phosphatases.

**WT**

**CLIMP-MT(-)**



**Figure P6 : Hypothèse de travail = Le rôle des microtubules sur les relâchements de calcium liées à RyR1.**  
Les points i, ii et iii sont décrits dans le corps du texte.

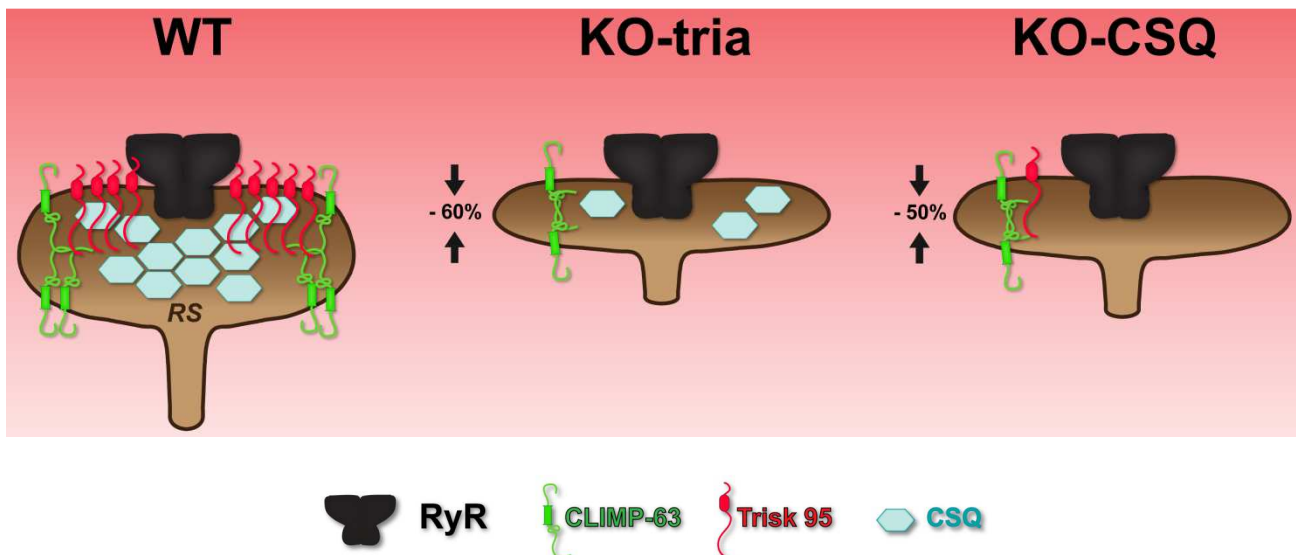
## *La souris KO-MSK-ind-CLIMP-63*

Le mutant CLIMP-MT(-) est un bon modèle d'étude pour étudier les effets du lien entre CLIMP-63 et les microtubules. Néanmoins, ce mutant ne pourra jamais remplacer une extinction de l'expression de CLIMP-63.

D'autres modèles comme une souris KO pour le gène de CLIMP-63 serait un bon modèle d'étude. Cependant à cette date, aucune souris invalidée pour le gène de CLIMP-63 n'a été publiée. CLIMP-63 est une protéine ubiquitaire importante pour la structuration du reticulum, la délétion de cette protéine pourrait ne pas être compatible avec la vie. Pour palier à ce problème, nous pourrions envisager de construire une souris avec mutagenèse somatique conditionnelle et spécifique au muscle squelettique. Créer une souris cre/lox inducible pour supprimer le gène CLIMP-63 est une solution. Avec cette souris, on pourrait définir une relation expression/fonction de CLIMP-63 dans le muscle. Ce modèle devrait permettre d'étudier l'effet de la suppression de CLIMP-63, ce qui apportera sans doute une meilleure compréhension du rôle de cette protéine dans le muscle et plus spécifiquement dans l'homéostasie calcique et de son implication dans la libération de calcium ainsi que dans la formation du compartiment dans laquelle elle est exprimée. Des cultures primaires de cellules satellites provenant cette souris *KO-MSK-ind-CLIMP-63* pourraient être utilisées pour caractériser le comportement des cellules musculaires sans CLIMP-63 ou avec une diminution progressive de l'expression de CLIMP-63. Elles permettraient de tester l'implication de CLIMP-63 dans la différenciation des myoblastes en myotubes, dans la migration ou la fusion des myoblastes, la migration des noyaux durant la myogenèse ou la formation des triades. La re-introduction de CLIMP-63 dans les cellules *KO-MSK-ind-CLIMP-63* avec des virus permettrait de tester le 'sauvetage' de l'expression de CLIMP-63 et ainsi définir correctement la relation expression/fonction de CLIMP-63 dans le muscle squelettique. Enfin, la microscopie électronique apporterait des réponses sur le rôle structurant de CLIMP-63 dans le muscle. Par exemple, est ce que la dilatation des citernes de RS est dépendante de l'expression de CLIMP-63 ? Nous avons effectivement émis l'hypothèse que CLIMP-63 est la protéine capable de stabiliser la dilatation des citernes terminales de RS. La dimérisation 'tête bêche' de la protéine provoquerait la stabilisation des citernes dans les souris WT (Figure P7, WT). Ce rôle de CLIMP-63 a déjà été décrit dans les cellules COS-7 (Shibata et al., 2010).

Nous avons observé que dans les souris KO-triadine et KO-calséquestrine 1, les citernes terminales de RS sont aplaties avec une diminution respective de 60% et 50% de l'espace luminal (Oddoux et al., 2009; Paolini et al., 2007). Nous pensons que CLIMP-63 pourrait être responsable de ce phénomène. En effet, dans la souris KO-triadine, l'absence de la triadine entraînerait une diminution de CLIMP-63 (Figure R49). Cette diminution de CLIMP-63 à la triade affecterait la largeur de la lumière des citernes terminales, ce qui expliquerait indirectement la diminution de l'expression de la CSQ1. Les niveaux d'expression de la triadine et de la CSQ semblent interdépendants. En effet, dans la souris KO-triadine, l'expression de CSQ1 diminue d'environ 75% (Oddoux et al., 2009). Nous avons émis l'hypothèse qu'en absence de triadine, la baisse de CLIMP-63 conduirait à une réduction du volume des citernes terminales, réduisant ainsi l'espace disponible pour la CSQ (Figure P7, KO-triadine).

A l'inverse, dans la souris KO-CSQ1, l'expression de la triadine semblerait diminuer (Paolini et al., 2007). Dans la souris KO-CSQ2, la diminution de l'expression de la triadine est quantifiée à environ 70% (Knollmann et al., 2006). L'expression des deux protéines semble liée. Pour expliquer les citernes aplaties dans la souris KO-CSQ1, la diminution de CLIMP-63 serait un effet indirect. En absence de CSQ, la réduction de la triadine induirait ainsi une diminution de l'expression de CLIMP-63, ce qui conduirait à une réduction du volume des citernes terminales de RS (Figure P7, KO-CSQ).

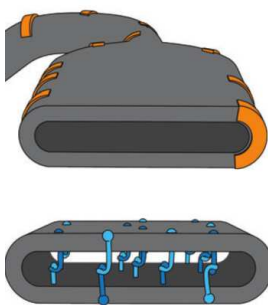


**Figure P7 : Hypothèse de travail = La dilatation des citernes terminales de RS dans la souris WT, KO-triadine et KO-CSQ1**

## Quels sont les mécanismes qui permettent de structurer le RS ?

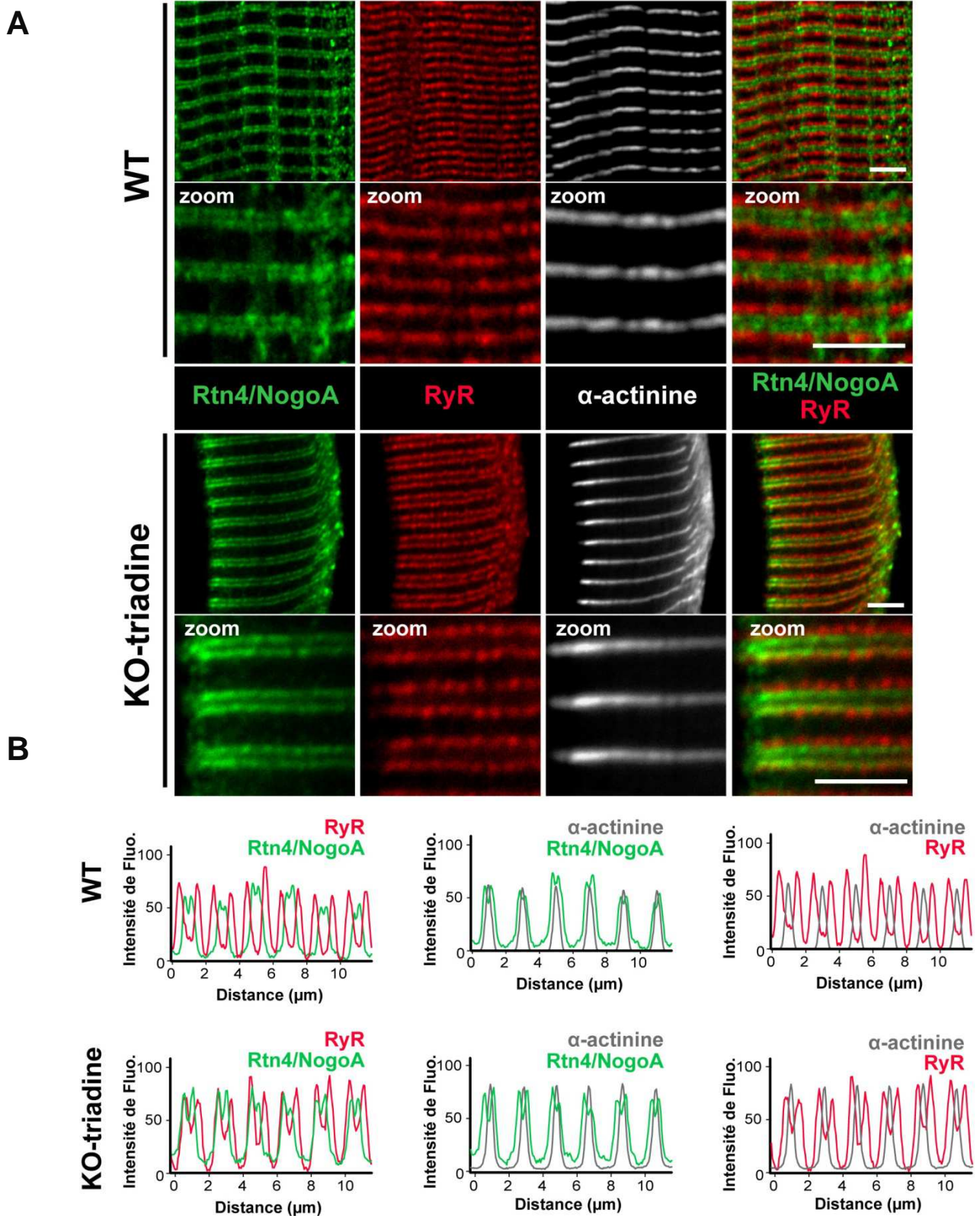
Dans les cellules, la forme du reticulum est indispensable à sa ou ses fonction(s) comme cela a été montré dans les neurones (Cui-Wang et al., 2012). Dans les cellules musculaires, le RS permet le stockage du calcium. Le RS peut aussi grâce à sa morphologie unique être le lieu de la libération de calcium pour le couplage excitation-contraction. La structure générale du RS est cruciale pour ces fonctions qui sont vitales pour le bon fonctionnement du muscle. En effet, des altérations de la forme du RS dû à l'absence des protéines du complexe de relâchement du calcium nuisent au couplage excitation-contraction (Ito et al., 2001; Oddoux et al., 2009; Paolini et al., 2007).

CLIMP-63 est une protéine nécessaire pour maintenir l'espace luminal dans le reticulum. En découvrant que CLIMP-63 est localisé au niveau des triades via la triadine, cette étude nous permis d'identifier la première protéine impliquée dans la structuration du reticulum dans le muscle. Dans le RE, quand CLIMP-63 est absente, les feuillettes de reticulum persistent mais l'espace intraluminal est altéré. CLIMP-63 n'est donc pas requise pour la formation des feuillettes de reticulum, mais est décrite pour se dimériser et ainsi réguler la dimension lumineuse des feuillettes (Figure P8) (Shibata et al., 2010). Dans le muscle squelettique, nous avons donc émis l'hypothèse que CLIMP-63 pourrait maintenir la dilatation de la lumière des citernes terminales de RS (cf chapitre, La souris KO-MSK-ind-CLIMP-63).



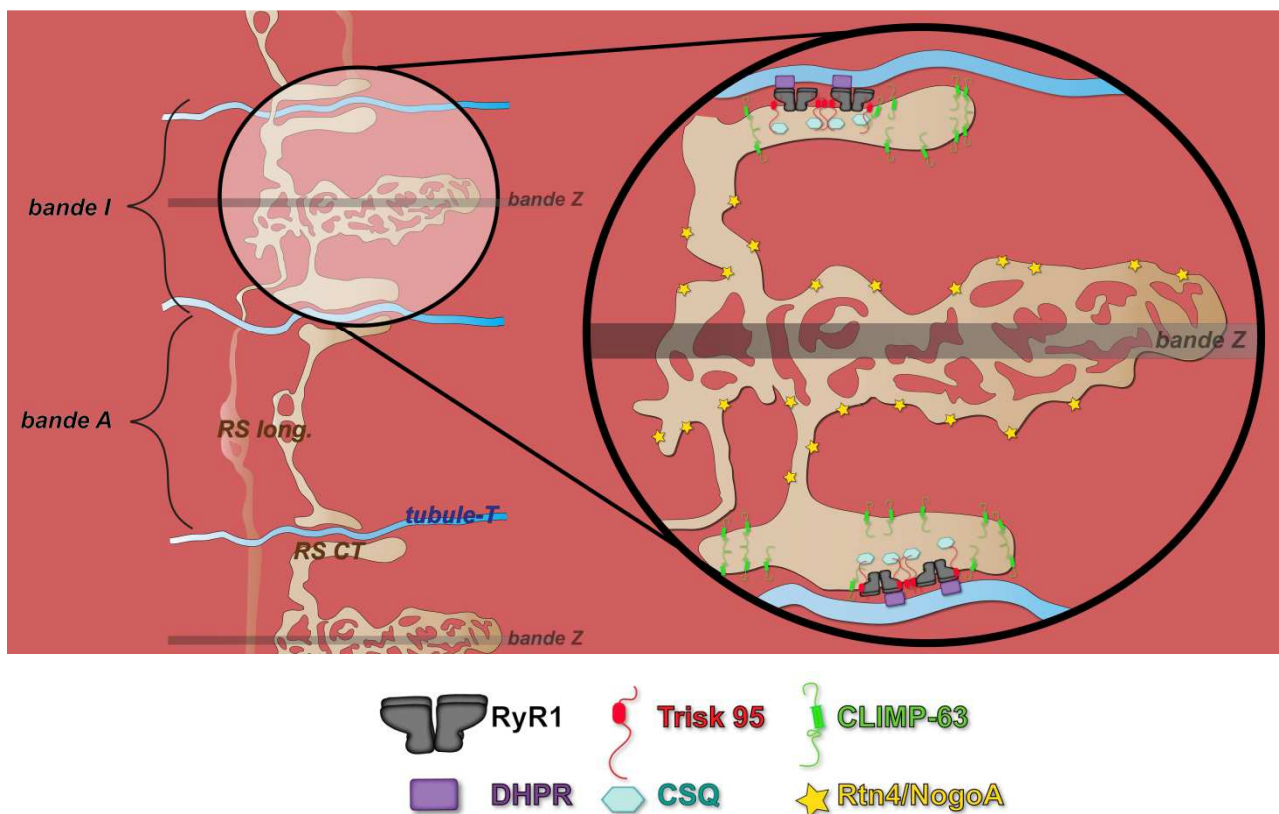
**Figure P8 : Schéma des protéines participant à la formation de RE.** En haut, les protéines du réticulum (orange) permettent la formation des tubules et feuillettes de RE en courbant les membranes. En bas, CLIMP-63 (bleu) se dimérise 'tête bêche' pour stabiliser la lumière du reticulum. D'après (Shibata et al., 2009).

Cependant CLIMP-63 n'est pas décrite comme la protéine pouvant former les feuillettes ou les tubules de reticulum (Shibata et al., 2010). CLIMP-63 semble seulement être la protéine qui stabilise ces structures. Dans le RE, ce sont les protéines du réticulum qui sont responsables de la formation des tubules et des feuillettes de reticulum (Figure P8). Mais quels sont les rôles des protéines du réticulum dans le muscle squelettique ? Existe-t-il une localisation précise pour ces protéines qui sont d'une importance primordiale dans les cellules COS-7 ?



**Figure P9 : Les protéines du réticulon se localise entre les triades et la bande Z. (A)** Dans des fibres dissociées (EDL) de muscle de souris WT et KO-triadine, la localisation des protéines du réticulon (Rtn4/NogoA, vert), de RyR1 (rouge) et de l' $\alpha$ -actinine (gris) a été mise en évidence par marquage immunofluorescent. **(B)** L'intensité de fluorescence en fonction de la distance a été mesurée sur six triades successives pour chaque condition.

Pour répondre à ces questions, des immunomarquages de CLIMP-63, RyR1, Rtn4/NogoA et  $\alpha$ -actinine ont été réalisés dans des fibres musculaires dissociées *Extensor digitorum longus* (EDL) de souris (Figure P9A). Les triades qui sont marquées par un anticorps anti-RyR1 (en rouge), présentent un pattern strié en double rangées de points transversales à l'axe de la fibre. L'  $\alpha$ -actinine (en gris) est présente au niveau de la bande Z. Rtn4/NogoA (en vert) présente également un marquage arrangés en stries, qui s'aligne entre les doubles rangées de triades. La superposition des marquages montre que les protéines du réticulon (Rtn4/NogoA) ne colocalisent ni avec les protéines de la bande Z, ni avec les protéines de la triade (Figure P9B). Les protéines du réticulon semblent se localiser au niveau de la jonction entre la bande Z et les citernes terminales de RS. De plus, dans la souris KO-triadine, la localisation de Rtn4/NogoA ne semble pas être modifiée (Figure P9B) par rapport aux souris WT. Les protéines Rtn4/NogoA semblent être localisées sur la ligne Z, au niveau de la transition entre les citernes terminales et le RS longitudinal (Figure P10).



**Figure P10 : Modèle de travail = Les protéines du réticulon semblent localisées entre les triades et la bande Z.** Une triade est représentée avec ses domaines spécifiques : les citernes terminales (RS CT) et le RS longitudinal (RS long.). Les protéines du CRC sont visibles avec RyR1 (noir), la calséquestrine (CSQ, vert clair), la triadine (Trisk 95, rouge) et CLIMP-63 et Rtn4/NogoA sont respectivement en vert et en étoiles jaunes.



Comme dans les cellules COS-7, les protéines du réticulon et la protéine CLIMP-63 semblent avoir des localisations différentes et spécifiques. CLIMP-63 semble se localiser au niveau des dilatations de reticulum et les protéines du réticulon au niveau des régions avec des courbures. En effet, les protéines du réticulon se localisent généralement dans des régions avec de hautes courbures de membranes (Kiseleva et al., 2007). Le RS est composé d'un RS jonctionnel (les citernes terminales) et d'un RS longitudinal. La localisation et la fonction de chacun de ces sous domaines est différente. Le RS jonctionnel est situé au niveau des triades et forme des dilatations de reticulum qui entourent les tubules-T (Ogata and Yamasaki, 1997). Le RS longitudinal est présent sous forme de tubes situés le long des myofibrilles qui relient deux citernes terminales. On peut émettre l'hypothèse qu'il existe une population spécifique de protéines qui permettent de déterminer la forme de ces deux sous-compartiments. Etudier les protéines du réticulon permettra, je pense, de mieux comprendre la forme d'un des deux sous-compartiments. L'utilisation de siRNA ou de shRNA dirigés contre les protéines du réticulon, ou la microscopie électronique permettrait de mieux comprendre la fonction au niveau du muscle squelettique de ces protéines.

En parallèle, il faudrait étudier les protéines qui sont décrites comme structurantes pour le reticulum. En effet aucune protéine structurante n'est connue pour être localisée au niveau du RS longitudinal. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la structure bien précise du RS longitudinal pourrait être formée et stabilisée par certaines protéines spécifiques capables de déformer le reticulum. Des protéines comme DP1/Yop1p, les protéines REEP, l'atlastine ou la spastine seraient des pistes potentielles pour avoir un rôle au niveau des membranes du RS longitudinal. En effet, certaines de ces protéines sont déjà impliquées dans des maladies musculaires.

L'identification et la caractérisation de nouvelles protéines dans les cellules musculaires permettraient à la fois de mieux comprendre le fonctionnement du muscle normal et également le muscle pathologique. L'ensemble des données que j'ai obtenues et celles en cours pourront je l'espère, permettre de comprendre l'implication de nouveaux gènes identifiés dans les myopathies.



# Publications

---



## Article 1:

Role of triadine in the organization of reticulum membrane at the muscle triad

---



## Article 2:

A link between microtubules and triads in muscle cells: role of triadin and CLIMP-63

---





# Références

---



## A

- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:309-22.
- Al-Qusairi, L., N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A.H. Beggs, B. Allard, J.L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond, and A. Buj-Bello. 2009. T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:18763-8.
- Altschaf, B.A., D.A. Arvanitis, O. Fuentes, Q. Yuan, E.G. Kranias, and H.H. Valdivia. 2011. Dual role of junctin in the regulation of ryanodine receptors and calcium release in cardiac ventricular myocytes. *J Physiol.* 589:6063-80.
- Arai, M., K. Otsu, D.H. MacLennan, and M. Periasamy. 1992. Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. *Am J Physiol.* 262:C614-20.
- Azadir, B.A., S. Di Fulvio, C. Therrien, and M. Sinnreich. 2010. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 5:e10122.

## B

- Bannykh, S.I., N. Nishimura, and W.E. Balch. 1998. Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol.* 8:21-5.
- Bannykh, S.I., T. Rowe, and W.E. Balch. 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol.* 135:19-35.
- Barbier, M., I. Martinez-Ramos, P. Townsend, and S. Alberti. 2012. Surfactant protein A blocks recognition of *Pseudomonas aeruginosa* by CKAP4/P63 on airway epithelial cells. *J Infect Dis.* 206:1753-62.
- Barlowe, C. 2010. ER sheets get roughed up. *Cell.* 143:665-6.
- Baumann, O., and B. Walz. 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 205:149-214.
- Beard, N.A., D.R. Laver, and A.F. Dulhunty. 2004. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* 85:33-69.
- Belmont, L.D., and T.J. Mitchison. 1996. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell.* 84:623-31.
- Bernales, S., K.L. McDonald, and P. Walter. 2006a. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 4:e423.
- Bernales, S., F.R. Papa, and P. Walter. 2006b. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:487-508.
- Bers, D.M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415:198-205.
- Bers, D.M., and V.M. Stiffel. 1993. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am J Physiol.* 264:C1587-93.
- Bishop, W.R., and R.M. Bell. 1988. Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol.* 4:579-610.
- Block, B.A., T. Imagawa, K.P. Campbell, and C. Franzini-Armstrong. 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.
- Bodine, S.C., E. Latres, S. Baumhueter, V.K. Lai, L. Nunez, B.A. Clarke, W.T. Poueymirou, F.J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z.Q. Pan, D.M. Valenzuela, T.M. DeChiara, T.N. Stitt, G.D. Yancopoulos, and D.J. Glass. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 294:1704-8.

- Bohm, J., F. Chevessier, A. Maues De Paula, C. Koch, S. Attarian, C. Feger, D. Hantai, P. Laforet, K. Ghorab, J.M. Vallat, M. Fardeau, D. Figarella-Branger, J. Pouget, N.B. Romero, M. Koch, C. Ebel, N. Levy, M. Krahn, B. Eymard, M. Bartoli, and J. Laporte. 2013. Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy. *Am J Hum Genet.* 92:271-8.
- Boncompagni, S., M. Thomas, J.R. Lopez, P.D. Allen, Q. Yuan, E.G. Kranias, C. Franzini-Armstrong, and C.F. Perez. 2012. Triadin/Junctin double null mouse reveals a differential role for Triadin and Junctin in anchoring CASQ to the jSR and regulating Ca(2+) homeostasis. *PLoS One.* 7:e39962.
- Boudriau, S., M. Vincent, C.H. Cote, and P.A. Rogers. 1993. Cytoskeletal structure of skeletal muscle: identification of an intricate exosarcomeric microtubule lattice in slow- and fast-twitch muscle fibers. *J Histochem Cytochem.* 41:1013-21.
- Bovia, F., P. Salmon, T. Matthes, K. Kvell, T.H. Nguyen, C. Werner-Favre, M. Barnet, M. Nagy, F. Leuba, J.F. Arrighi, V. Piguet, D. Trono, and R.H. Zubler. 2003. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood.* 101:1727-33.
- Brandt, N.R., A.H. Caswell, S.R. Wen, and J.A. Talvenheimo. 1990. Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J Membr Biol.* 113:237-51.
- Bruusgaard, J.C., K. Liestol, and K. Gundersen. 2006. Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *J Appl Physiol (1985).* 100:2024-30.
- Buckley, I.K., and K.R. Porter. 1975. Electron microscopy of critical point dried whole cultured cells. *J Microsc.* 104:107-20.
- Bulinski, J.C., and G.G. Gundersen. 1991. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays.* 13:285-93.
- Butler, M.H., C. David, G.C. Ochoa, Z. Freyberg, L. Daniell, D. Grabs, O. Cremona, and P. De Camilli. 1997. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 137:1355-67.

## C

- Cadot, B., V. Gache, E. Vasyutina, S. Falcone, C. Birchmeier, and E.R. Gomes. 2012. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep.* 13:741-9.
- Carl, S.L., K. Felix, A.H. Caswell, N.R. Brandt, W.J. Ball, Jr., P.L. Vaghy, G. Meissner, and D.G. Ferguson. 1995a. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J Cell Biol.* 129:673-82.
- Carl, S.L., K. Felix, A.H. Caswell, N.R. Brandt, J.P. Brunschwig, G. Meissner, and D.G. Ferguson. 1995b. Immunolocalization of triadin, DHP receptors, and ryanodine receptors in adult and developing skeletal muscle of rats. *Muscle Nerve.* 18:1232-43.
- Carlier, M.F., D. Didry, C. Simon, and D. Pantaloni. 1989. Mechanism of GTP hydrolysis in tubulin polymerization: characterization of the kinetic intermediate microtubule-GDP-Pi using phosphate analogues. *Biochemistry.* 28:1783-91.
- Cerrone, M., C. Napolitano, and S.G. Priori. 2009. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: A paradigm to understand mechanisms of arrhythmias associated to impaired Ca(2+) regulation. *Heart Rhythm.* 6:1652-9.
- Chopra, N., T. Yang, P. Asghari, E.D. Moore, S. Huke, B. Akin, R.A. Cattolica, C.F. Perez, T. Hlaing, B.E. Knollmann-Ritschel, L.R. Jones, I.N. Pessah, P.D. Allen, C. Franzini-Armstrong, and B.C. Knollmann. 2009. Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca2+ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:7636-41.

- Conboy, I.M., M.J. Conboy, G.M. Smythe, and T.A. Rando. 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*. 302:1575-7.
- Cowling, B.S., A. Toussaint, J. Muller, and J. Laporte. 2012. Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: insights from animal models. *PLoS Genet*. 8:e1002595.
- Cui-Wang, T., C. Hanus, T. Cui, T. Helton, J. Bourne, D. Watson, K.M. Harris, and M.D. Ehlers. 2012. Local zones of endoplasmic reticulum complexity confine cargo in neuronal dendrites. *Cell*. 148:309-21.
- Cui, Y., H.S. Tae, N.C. Norris, Y. Karunasekara, P. Pouliquin, P.G. Board, A.F. Dulhunty, and M.G. Casarotto. 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.
- Cusimano, V., F. Pampinella, E. Giacomello, and V. Sorrentino. 2009. Assembly and dynamics of proteins of the longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:4695-700.

## D

- Dailey, M.E., and P.C. Bridgman. 1991. Structure and organization of membrane organelles along distal microtubule segments in growth cones. *J Neurosci Res*. 30:242-58.
- Damiani, E., E. Picello, L. Saggin, and A. Margreth. 1995. Identification of triadin and of histidine-rich Ca(2+)-binding protein as substrates of 60 kDa calmodulin-dependent protein kinase in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of rabbit fast muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 209:457-65.
- Darbellay, B., S. Arnaudeau, S. Konig, H. Jousset, C. Bader, N. Demaurex, and L. Bernheim. 2009. STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *J Biol Chem*. 284:5370-80.
- Delphin, C., D. Bouvier, M. Seggio, E. Couriol, Y. Saoudi, E. Denarier, C. Bosc, O. Valiron, M. Bisbal, I. Arnal, and A. Andrieux. 2012. MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J Biol Chem*. 287:35127-38.
- Denarier, E., A. Fourest-Lieuvin, C. Bosc, F. Pirollet, A. Chapel, R.L. Margolis, and D. Job. 1998. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6055-60.
- Durr, A. 2008. Genetic testing for the spastic paraplegias: drowning by numbers. *Neurology*. 71:236-8.
- Dutcher, S.K. 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol*. 13:49-54.

## E

- Efremov, R.G., A. Leitner, R. Aebersold, and S. Raunser. 2015. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature*. 517:39-43.
- Endow, S.A., F.J. Kull, and H. Liu. 2010. Kinesins at a glance. *J Cell Sci*. 123:3420-4.

## F

- Falcone, S., W. Roman, K. Hnia, V. Gache, N. Didier, J. Laine, F. Aurade, I. Marty, I. Nishino, N. Charlet-Berguerand, N.B. Romero, G. Marazzi, D. Sassoon, J. Laporte, and E.R. Gomes. 2014. N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med.* 6:1455-75.
- Feriotto, G., A. Finotti, P. Volpe, S. Treves, S. Ferrari, C. Angelelli, F. Zorzato, and R. Gambari. 2005. Myocyte enhancer factor 2 activates promoter sequences of the human AbetaH-J-J locus, encoding aspartyl-beta-hydroxylase, junctin, and junctate. *Mol Cell Biol.* 25:3261-75.
- Fertuck, H.C., and M.M. Salpeter. 1974. Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:1376-8.
- Flucher, B.E. 1992. Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev Biol.* 154:245-60.
- Flucher, B.E., and S.B. Andrews. 1993. Characterization of spontaneous and action potential-induced calcium transients in developing myotubes in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton.* 25:143-57.
- Flucher, B.E., S.B. Andrews, S. Fleischer, A.R. Marks, A. Caswell, and J.A. Powell. 1993a. Triad formation: organization and function of the sarcoplasmic reticulum calcium release channel and triadin in normal and dysgenic muscle in vitro. *J Cell Biol.* 123:1161-74.
- Flucher, B.E., H. Takekura, and C. Franzini-Armstrong. 1993b. Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: association of sarcoplasmic reticulum and transverse tubules with myofibrils. *Dev Biol.* 160:135-47.
- Foster, L.J., C.L. de Hoog, Y. Zhang, X. Xie, V.K. Mootha, and M. Mann. 2006. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell.* 125:187-99.
- Fourest-Lieuvain, A., L. Peris, V. Gache, I. Garcia-Saez, C. Juillan-Binard, V. Lantez, and D. Job. 2006. Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell.* 17:1041-50.
- Fourest-Lieuvain, A., J. Rendu, A. Osseni, K. Pernet-Gallay, D. Rossi, S. Oddoux, J. Brocard, V. Sorrentino, I. Marty, and J. Faure. 2012. Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J Cell Sci.* 125:3443-53.
- Franzini-Armstrong, C. 1980. Structure of sarcoplasmic reticulum. *Fed Proc.* 39:2403-9.
- Froemming, G.R., B.E. Murray, and K. Ohlendieck. 1999. Self-aggregation of triadin in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1418:197-205.

## G

- Gao, L., D. Balshaw, L. Xu, A. Tripathy, C. Xin, and G. Meissner. 2000. Evidence for a role of the lumenal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor) activity and conductance. *Biophys J.* 79:828-40.
- Garcia, J., T. Tanabe, and K.G. Beam. 1994. Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptors. *J Gen Physiol.* 103:125-47.
- Gerace, L., and R. Foisner. 1994. Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* 4:127-31.
- Giannini, G., A. Conti, S. Mammarella, M. Scrobogna, and V. Sorrentino. 1995. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol.* 128:893-904.

- Giannini, G., and V. Sorrentino. 1995. Molecular structure and tissue distribution of ryanodine receptors calcium channels. *Med Res Rev.* 15:313-23.
- Glover, L., K. Culligan, S. Cala, C. Mulvey, and K. Ohlendieck. 2001. Calsequestrin binds to monomeric and complexed forms of key calcium-handling proteins in native sarcoplasmic reticulum membranes from rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1515:120-32.
- Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 23:175-82.
- Goldberg, M.W., and T.D. Allen. 1995. Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol.* 7:301-9.
- Gomez, A.M., B.G. Kerfant, and G. Vassort. 2000. Microtubule disruption modulates Ca(2+) signaling in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 86:30-6.
- Goonasekera, S.A., N.A. Beard, L. Groom, T. Kimura, A.D. Lyfenko, A. Rosenfeld, I. Marty, A.F. Dulhunty, and R.T. Dirksen. 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.
- Goyal, U., and C. Blackstone. 2013. Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim Biophys Acta.* 1833:2492-8.
- Granger, B.L., and E. Lazarides. 1978. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell.* 15:1253-68.
- Gregg, R.G., A. Messing, C. Strube, M. Beurg, R. Moss, M. Behan, M. Sukhareva, S. Haynes, J.A. Powell, R. Coronado, and P.A. Powers. 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.
- Griffiths, G., G. Warren, P. Quinn, O. Mathieu-Costello, and H. Hoppeler. 1984. Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes. I. Stereological studies. *J Cell Biol.* 98:2133-41.
- Grigoriev, I., S.M. Gouveia, B. van der Vaart, J. Demmers, J.T. Smyth, S. Honnappa, D. Splinter, M.O. Steinmetz, J.W. Putney, Jr., C.C. Hoogenraad, and A. Akhmanova. 2008. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol.* 18:177-82.
- Groh, S., I. Marty, M. Ottolia, G. Prestipino, A. Chapel, M. Villaz, and M. Ronjat. 1999. Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 274:12278-83.
- Gundersen, G.G., S. Khawaja, and J.C. Bulinski. 1989. Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol.* 109:2275-88.
- Guo, W., and K.P. Campbell. 1995. Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 270:9027-30.
- Gyorke, S., and D. Terentyev. 2008. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 77:245-55.

## H

- Hakamata, Y., J. Nakai, H. Takeshima, and K. Imoto. 1992. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 312:229-35.
- Hinshaw, J.E., and S.L. Schmid. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* 374:190-2.
- Hong, C.S., J.H. Ji, J.P. Kim, D.H. Jung, and D.H. Kim. 2001. Molecular cloning and characterization of mouse cardiac triadin isoforms. *Gene.* 278:193-9.

- Hu, J., Y. Shibata, P.P. Zhu, C. Voss, N. Rismanchi, W.A. Prinz, T.A. Rapoport, and C. Blackstone. 2009. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell*. 138:549-61.
- Hyman, A.A., S. Salser, D.N. Drechsel, N. Unwin, and T.J. Mitchison. 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell*. 3:1155-67.

## I

- Ito, K., S. Komazaki, K. Sasamoto, M. Yoshida, M. Nishi, K. Kitamura, and H. Takeshima. 2001. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol*. 154:1059-67.

## J

- Janke, C. 2014. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol*. 206:461-72.
- Johnson, K.A., and G.G. Borisy. 1977. Kinetic analysis of microtubule self-assembly in vitro. *J Mol Biol*. 117:1-31.
- Jones, L.R., L. Zhang, K. Sanborn, A.O. Jorgensen, and J. Kelley. 1995. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 270:30787-96.

## K

- Kaakinen, M., H. Papponen, and K. Metsikko. 2008. Microdomains of endoplasmic reticulum within the sarcoplasmic reticulum of skeletal myofibers. *Exp Cell Res*. 314:237-45.
- Kaisto, T., V. Luukela, E. Birr, and K. Metsikko. 2002. Retargeting of viral glycoproteins into a non-exporting compartment during the myogenic differentiation of rat L6 cells. *Cell Tissue Res*. 308:381-90.
- Kaisto, T., and K. Metsikko. 2003. Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Exp Cell Res*. 289:47-57.
- Kano, Y., N. Fujimaki, and H. Ishikawa. 1991. The distribution and arrangement of microtubules in mammalian skeletal muscle fibers. *Cell Struct Funct*. 16:251-61.
- Kardon, J.R., and R.D. Vale. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:854-65.
- Kazi, A.S., J.Q. Tao, S.I. Feinstein, L. Zhang, A.B. Fisher, and S.R. Bates. 2010. Role of the PI3-kinase signaling pathway in trafficking of the surfactant protein A receptor P63 (CKAP4) on type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 299:L794-807.
- Khairallah, R.J., G. Shi, F. Sbrana, B.L. Prosser, C. Borroto, M.J. Mazaitis, E.P. Hoffman, A. Mahurkar, F. Sachs, Y. Sun, Y.W. Chen, R. Raiteri, W.J. Lederer, S.G. Dorsey, and C.W. Ward. 2012. Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *Sci Signal*. 5:ra56.



- Kim, K.C., A.H. Caswell, J.A. Talvenheimo, and N.R. Brandt. 1990. Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry*. 29:9281-9.
- Kiseleva, E., K.N. Morozova, G.K. Voeltz, T.D. Allen, and M.W. Goldberg. 2007. Reticulon 4a/NogoA locates to regions of high membrane curvature and may have a role in nuclear envelope growth. *J Struct Biol*. 160:224-35.
- Klopfenstein, D.R., F. Kappeler, and H.P. Hauri. 1998. A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J*. 17:6168-77.
- Klopfenstein, D.R., J. Klumperman, A. Lustig, R.A. Kammerer, V. Oorschot, and H.P. Hauri. 2001. Subdomain-specific localization of CLIMP-63 (p63) in the endoplasmic reticulum is mediated by its luminal alpha-helical segment. *J Cell Biol*. 153:1287-300.
- Knollmann, B.C. 2009. New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle. *J Physiol*. 587:3081-7.
- Knollmann, B.C., N. Chopra, T. Hlaing, B. Akin, T. Yang, K. Ettensohn, B.E. Knollmann, K.D. Horton, N.J. Weissman, I. Holinstat, W. Zhang, D.M. Roden, L.R. Jones, C. Franzini-Armstrong, and K. Pfeifer. 2006. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca<sup>2+</sup> release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest*. 116:2510-20.
- Knudson, C.M., N. Chaudhari, A.H. Sharp, J.A. Powell, K.G. Beam, and K.P. Campbell. 1989. Specific absence of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine receptor in mice with muscular dysgenesis. *J Biol Chem*. 264:1345-8.
- Knudson, C.M., K.K. Stang, A.O. Jorgensen, and K.P. Campbell. 1993a. Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem*. 268:12637-45.
- Knudson, C.M., K.K. Stang, C.R. Moomaw, C.A. Slaughter, and K.P. Campbell. 1993b. Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem*. 268:12646-54.
- Kobayashi, Y.M., B.A. Alseikhan, and L.R. Jones. 2000. Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem*. 275:17639-46.
- Kobayashi, Y.M., and L.R. Jones. 1999. Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem*. 274:28660-8.
- Kuehn, M.J., and R. Schekman. 1997. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr Opin Cell Biol*. 9:477-83.
- Kumar, J., H. Yu, and M.P. Sheetz. 1995. Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. *Science*. 267:1834-7.
- Kumar, P., and T. Wittmann. 2012. +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol*. 22:418-28.
- Kuwajima, G., A. Futatsugi, M. Niinobe, S. Nakanishi, and K. Mikoshiba. 1992. Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron*. 9:1133-42.

## L

- Lacampagne, A., J. Fauconnier, and S. Richard. 2008. [Ryanodine receptor and heart disease]. *Med Sci (Paris)*. 24:399-405.
- Lamb, G.D. 2000. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 27:216-24.
- Lee, C., M. Ferguson, and L.B. Chen. 1989. Construction of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 109:2045-55.

- Lee, E., M. Marcucci, L. Daniell, M. Pypaert, O.A. Weisz, G.C. Ochoa, K. Farsad, M.R. Wenk, and P. De Camilli. 2002. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*. 297:1193-6.
- Lee, E.H., D.W. Song, J.M. Lee, G. Meissner, P.D. Allen, and H. Kim do. 2006. Occurrence of atypical Ca<sup>2+</sup> transients in triadin-binding deficient-RYR1 mutants. *Biochem Biophys Res Commun*. 351:909-14.
- Lee, J.M., S.H. Rho, D.W. Shin, C. Cho, W.J. Park, S.H. Eom, J. Ma, and D.H. Kim. 2004. Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor are involved in the interaction with triadin. *J Biol Chem*. 279:6994-7000.
- Li, M.H., L.W. Dong, S.X. Li, G.S. Tang, Y.F. Pan, J. Zhang, H. Wang, H.B. Zhou, Y.X. Tan, H.P. Hu, and H.Y. Wang. 2013. Expression of cytoskeleton-associated protein 4 is related to lymphatic metastasis and indicates prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma patients after surgery resection. *Cancer Lett*. 337:248-53.
- Lindsey, J.D., and M.H. Ellisman. 1985. The neuronal endomembrane system. I. Direct links between rough endoplasmic reticulum and the cis element of the Golgi apparatus. *J Neurosci*. 5:3111-23.
- Liu, N., Y. Ruan, and S.G. Priori. 2008. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis*. 51:23-30.
- Lobo, S., W.K. Greentree, M.E. Linder, and R.J. Deschenes. 2002. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 277:41268-73.
- Lu, Z., D. Joseph, E. Bugnard, K.J. Zaal, and E. Ralston. 2001. Golgi complex reorganization during muscle differentiation: visualization in living cells and mechanism. *Mol Biol Cell*. 12:795-808.
- Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. 252:1162-4.

## M

- Mamchaoui, K., C. Trollet, A. Bigot, E. Negroni, S. Chaouch, A. Wolff, P.K. Kandalla, S. Marie, J. Di Santo, J.L. St Guily, F. Muntoni, J. Kim, S. Philippi, S. Spuler, N. Levy, S.C. Blumen, T. Voit, W.E. Wright, A. Aamiri, G. Butler-Browne, and V. Mouly. 2011. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle*. 1:34.
- Mandelkow, E., R. Schultheiss, and E.M. Mandelkow. 1984. Reconstructions of tubulin protofilaments: different appearances of the same structure. *Ultramicroscopy*. 13:125-36.
- Mandelkow, E.M., G. Lange, A. Jagla, U. Spann, and E. Mandelkow. 1988. Dynamics of the microtubule oscillator: role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. *EMBO J*. 7:357-65.
- Margolis, R.L., and L. Wilson. 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell*. 13:1-8.
- Marks, A.R., M.B. Taubman, A. Saito, Y. Dai, and S. Fleischer. 1991. The ryanodine receptor/junctional channel complex is regulated by growth factors in a myogenic cell line. *J Cell Biol*. 114:303-12.
- Marks, A.R., P. Tempst, K.S. Hwang, M.B. Taubman, M. Inui, C. Chadwick, S. Fleischer, and B. Nadal-Ginard. 1989. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:8683-7.
- Martonosi, A. 1982. The development of sarcoplasmic reticulum membranes. *Annu Rev Physiol*. 44:337-55.
- Martonosi, A.N., L. Dux, R.L. Terjung, and D. Roufa. 1982. Regulation of membrane assembly during development of sarcoplasmic reticulum: the possible role of calcium. *Ann N Y Acad Sci*. 402:485-514.

- Marty, I., J. Faure, A. Fourest-Lieuvain, S. Vassilopoulos, S. Oddoux, and J. Brocard. 2009. Triadin: what possible function 20 years later? *J Physiol.* 587:3117-21.
- Marty, I., M. Robert, M. Ronjat, I. Bally, G. Arlaud, and M. Villaz. 1995. Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem J.* 307 ( Pt 3):769-74.
- Marty, I., M. Robert, M. Villaz, K. De Jongh, Y. Lai, W.A. Catterall, and M. Ronjat. 1994a. 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.
- Marty, I., D. Thevenon, C. Scotto, S. Groh, S. Sainnier, M. Robert, D. Grunwald, and M. Villaz. 2000. Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem.* 275:8206-12.
- Marty, I., M. Villaz, G. Arlaud, I. Bally, and M. Ronjat. 1994b. Transmembrane orientation of the N-terminal and C-terminal ends of the ryanodine receptor in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochem J.* 298 Pt 3:743-9.
- McElhinny, A.S., C.N. Perry, C.C. Witt, S. Labeit, and C.C. Gregorio. 2004. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci.* 117:3175-88.
- McEntagart, M., G. Parsons, A. Buj-Bello, V. Biancalana, I. Fenton, M. Little, M. Krawczak, N. Thomas, G. Herman, A. Clarke, and C. Wallgren-Pettersson. 2002. Genotype-phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord.* 12:939-46.
- McPherson, P.S., and K.P. Campbell. 1993a. Characterization of the major brain form of the ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Biol Chem.* 268:19785-90.
- McPherson, P.S., and K.P. Campbell. 1993b. The ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Biol Chem.* 268:13765-8.
- 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., E. Rios, A. Tripathy, and D.A. Pasek. 1997. Regulation of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) by Ca<sup>2+</sup> and monovalent cations and anions. *J Biol Chem.* 272:1628-38.
- Merisko, E.M., M. Fletcher, and G.E. Palade. 1986. The reorganization of the Golgi complex in anoxic pancreatic acinar cells. *Pancreas.* 1:95-109.
- Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K. Baylies. 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature.* 484:120-4.
- Meur, G., A.K. Parker, F.V. Gergely, and C.W. Taylor. 2007. Targeting and retention of type 1 ryanodine receptors to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 282:23096-103.
- Mikami, A., K. Imoto, T. Tanabe, T. Niidome, Y. Mori, H. Takeshima, S. Narumiya, and S. Numa. 1989. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.* 340:230-3.
- Mitchell, R.D., H.K. Simmerman, and L.R. Jones. 1988. Ca<sup>2+</sup> binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem.* 263:1376-81.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312:237-42.
- Mitchison, T.J. 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.* 261:1044-7.
- Mogessie, B., D. Roth, Z. Rahil, and A. Straube. 2015. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife.* 4:e05697.
- Monnier, N., G. Kozak-Ribbens, R. Krivosic-Horber, Y. Nivoche, D. Qi, N. Kraev, J. Loke, P. Sharma, V. Tegazzin, D. Figarella-Branger, N. Romero, P. Mezin, D. Bendahan, J.F. Payen, T. Depret, D.H. Maclennan, and J. Lunardi. 2005. Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional, and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mutat.* 26:413-25.

- Monnier, N., N.B. Romero, J. Lerule, P. Landrieu, Y. Nivoche, M. Fardeau, and J. Lunardi. 2001. Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum Mol Genet.* 10:2581-92.
- Mundy, D.I., and G. Warren. 1992. Mitosis and inhibition of intracellular transport stimulate palmitoylation of a 62-kD protein. *J Cell Biol.* 116:135-46.

## N

- Nakai, J., R.T. Dirksen, H.T. Nguyen, I.N. Pessah, K.G. Beam, and P.D. Allen. 1996. Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature.* 380:72-5.
- Nakai, J., T. Imagawa, Y. Hakamat, M. Shigekawa, H. Takeshima, and S. Numa. 1990. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett.* 271:169-77.
- Nakai, J., N. Sekiguchi, T.A. Rando, P.D. Allen, and K.G. Beam. 1998. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem.* 273:13403-6.
- Nakanishi, S., G. Kuwajima, and K. Mikoshiba. 1992. Immunohistochemical localization of ryanodine receptors in mouse central nervous system. *Neurosci Res.* 15:130-42.
- Neylon, C.B., S.M. Richards, M.A. Larsen, A. Agrotis, and A. Bobik. 1995. Multiple types of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 215:814-21.
- Nguyen, T.H., M. Bellodi-Privato, D. Aubert, V. Pichard, A. Myara, D. Trono, and N. Ferry. 2005. Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther.* 12:852-9.
- Nicot, A.S., A. Toussaint, V. Tosch, C. Kretz, C. Wallgren-Pettersson, E. Iwarsson, H. Kingston, J.M. Garnier, V. Biancalana, A. Oldfors, J.L. Mandel, and J. Laporte. 2007. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 39:1134-9.
- Nigg, E.A. 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature.* 386:779-87.
- Nikonov, A.V., H.P. Hauri, B. Luring, and G. Kreibich. 2007. Climp-63-mediated binding of microtubules to the ER affects the lateral mobility of translocon complexes. *J Cell Sci.* 120:2248-58.
- Nishi, M., S. Komazaki, N. Kurebayashi, Y. Ogawa, T. Noda, M. Iino, and H. Takeshima. 1999. Abnormal features in skeletal muscle from mice lacking mitsugumin29. *J Cell Biol.* 147:1473-80.
- Nissinen, M., T. Kaisto, P. Salmela, J. Peltonen, and K. Metsikko. 2005. Restricted distribution of mRNAs encoding a sarcoplasmic reticulum or transverse tubule protein in skeletal myofibers. *J Histochem Cytochem.* 53:217-27.

## O

- Oddoux, S., J. Brocard, A. Schweitzer, P. Szentesi, B. Giannesini, J. Faure, K. Pernet-Gallay, D. Bendahan, J. Lunardi, L. Csernoch, and I. Marty. 2009. Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem.* 284:34918-29.

- Oddoux, S., K.J. Zaal, V. Tate, A. Kenea, S.A. Nandkeolyar, E. Reid, W. Liu, and E. Ralston. 2013. Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J Cell Biol.* 203:205-13.
- Ogata, T., and Y. Yamasaki. 1997. Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat Rec.* 248:214-23.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, T. Ueno, T. Kurata, T. Sata, and S. Irie. 2007. p180 is involved in the interaction between the endoplasmic reticulum and microtubules through a novel microtubule-binding and bundling domain. *Mol Biol Cell.* 18:3741-51.
- Ohlendieck, K., and K.P. Campbell. 1991. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell Biol.* 115:1685-94.
- Otsu, K., H.F. Willard, V.K. Khanna, F. Zorzato, N.M. Green, and D.H. MacLennan. 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.

## P

- Paolini, C., M. Quarta, A. Nori, S. Boncompagni, M. Canato, P. Volpe, P.D. Allen, C. Reggiani, and F. Protasi. 2007. Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol.* 583:767-84.
- Park, H., S. Wu, A.K. Dunker, and C. Kang. 2003. Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca<sup>2+</sup> regulation. *J Biol Chem.* 278:16176-82.
- Park, S.H., P.P. Zhu, R.L. Parker, and C. Blackstone. 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest.* 120:1097-110.
- Peng, M., H. Fan, T.L. Kirley, A.H. Caswell, and A. Schwartz. 1994. Structural diversity of triadin in skeletal muscle and evidence of its existence in heart. *FEBS Lett.* 348:17-20.
- Pepin, G., M.P. Perron, and P. Provost. 2012. Regulation of human Dicer by the resident ER membrane protein CLIMP-63. *Nucleic Acids Res.* 40:11603-17.
- Percival, J.M., and S.C. Froehner. 2007. Golgi complex organization in skeletal muscle: a role for Golgi-mediated glycosylation in muscular dystrophies? *Traffic.* 8:184-94.
- Percival, J.M., P. Gregorevic, G.L. Odom, G.B. Banks, J.S. Chamberlain, and S.C. Froehner. 2007. rAAV6-microdystrophin rescues aberrant Golgi complex organization in mdx skeletal muscles. *Traffic.* 8:1424-39.
- Perez, C.F. 2011. On the footsteps of Triadin and its role in skeletal muscle. *World J Biol Chem.* 2:177-83.
- Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell.* 96:517-27.
- Pierre, P., J. Scheel, J.E. Rickard, and T.E. Kreis. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell.* 70:887-900.
- Pizon, V., F. Gerbal, C.C. Diaz, and E. Karsenti. 2005. Microtubule-dependent transport and organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J.* 24:3781-92.
- Porter, K.R., and G.E. Palade. 1957. Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol.* 3:269-300.
- Pouvreau, S., C. Collet, B. Allard, and V. Jacquemond. 2007. Whole-cell voltage clamp on skeletal muscle fibers with the silicone-clamp technique. *Methods Mol Biol.* 403:185-94.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Meldolesi. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.* 74:595-636.

- Prins, K.W., J.L. Humston, A. Mehta, V. Tate, E. Ralston, and J.M. Ervasti. 2009. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol.* 186:363-9.
- Priori, S.G., C. Napolitano, M. Memmi, B. Colombi, F. Drago, M. Gasparini, L. DeSimone, F. Coltorti, R. Bloise, R. Keegan, F.E. Cruz Filho, G. Vignati, A. Benatar, and A. DeLogu. 2002. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 106:69-74.
- Protasi, F., C. Franzini-Armstrong, and P.D. Allen. 1998. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 140:831-42.
- Protasi, F., C. Franzini-Armstrong, and B.E. Flucher. 1997. Coordinated incorporation of skeletal muscle dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in peripheral couplings of BC3H1 cells. *J Cell Biol.* 137:859-70.
- Puhka, M., H. Vihinen, M. Joensuu, and E. Jokitalo. 2007. Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *J Cell Biol.* 179:895-909.
- Puszkin, S., E. Puszkin, J. Maimon, C. Rouault, W. Schook, C. Ores, S. Kochwa, and R. Rosenfield. 1977. alpha-Actinin and tropomyosin interactions with a hybrid complex of erythrocyte-actin and muscle-myosin. *J Biol Chem.* 252:5529-37.

## R

- Rahkila, P., V. Luukela, K. Vaananen, and K. Metsikko. 1998. Differential targeting of vesicular stomatitis virus G protein and influenza virus hemagglutinin appears during myogenesis of L6 muscle cells. *J Cell Biol.* 140:1101-11.
- Ralston, E., Z. Lu, and T. Ploug. 1999. The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J Neurosci.* 19:10694-705.
- Rapoport, T.A., M.M. Rolls, and B. Jungnickel. 1996. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol.* 8:499-504.
- Razzaq, T.M., R. Bass, D.J. Vines, F. Werner, S.A. Whawell, and V. Ellis. 2003. Functional regulation of tissue plasminogen activator on the surface of vascular smooth muscle cells by the type-II transmembrane protein p63 (CKAP4). *J Biol Chem.* 278:42679-85.
- Realini, C., S.W. Rogers, and M. Rechsteiner. 1994. KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett.* 348:109-13.
- Rebeck, R.T., Y. Karunasekara, E.M. Gallant, P.G. Board, N.A. Beard, M.G. Casarotto, and A.F. Dulhunty. 2011. The beta(1a) subunit of the skeletal DHPR binds to skeletal RyR1 and activates the channel via its 35-residue C-terminal tail. *Biophys J.* 100:922-30.
- Reiken, S., A. Lacampagne, H. Zhou, A. Kherani, S.E. Lehnart, C. Ward, F. Huang, M. Gaburjakova, J. Gaburjakova, N. Rosemblyt, M.S. Warren, K.L. He, G.H. Yi, J. Wang, D. Burkhoff, G. Vassort, and A.R. Marks. 2003. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol.* 160:919-28.
- Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1996. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* 6:178-83.
- Rios, E., and G. Brum. 1987. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* 325:717-20.
- Rodionov, V.I., and G.G. Borisy. 1997. Microtubule treadmilling in vivo. *Science.* 275:215-8.
- Rogers, E.F., F.R. Koniuszy, and et al. 1948. Plant insecticides; ryanodine, a new alkaloid from *Ryania speciosa* Vahl. *J Am Chem Soc.* 70:3086-8.
- Rossi, D., V. Barone, E. Giacomello, V. Cusimano, and V. Sorrentino. 2008. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic.* 9:1044-9.

- Rossi, D., B. Vezzani, L. Galli, C. Paolini, L. Toniolo, E. Pierantozzi, S. Spinozzi, V. Barone, E. Pegoraro, L. Bello, G. Cenacchi, G. Vattermi, G. Tomelleri, G. Ricci, G. Siciliano, F. Protasi, C. Reggiani, and V. Sorrentino. 2014. A mutation in the CASQ1 gene causes a vacuolar myopathy with accumulation of sarcoplasmic reticulum protein aggregates. *Hum Mutat.* 35:1163-70.
- Rousseau, E., J. Ladine, Q.Y. Liu, and G. Meissner. 1988. Activation of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch Biochem Biophys.* 267:75-86.
- Rout, M.P., and S.R. Wenthe. 1994. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4:357-65.
- Roux-Buisson, N., M. Cacheux, A. Fourest-Lieuvain, J. Fauconnier, J. Brocard, I. Denjoy, P. Durand, P. Guicheney, F. Kyndt, A. Leenhardt, H. Le Marec, V. Lucet, P. Mabo, V. Probst, N. Monnier, P.F. Ray, E. Santoni, P. Tremeaux, A. Lacampagne, J. Faure, J. Lunardi, and I. Marty. 2012. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet.* 21:2759-67.

## S

- Sanger, J.M., J.S. Dome, B. Mittal, A.V. Somlyo, and J.W. Sanger. 1989. Dynamics of the endoplasmic reticulum in living non-muscle and muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 13:301-19.
- Santama, N., C.P. Er, L.L. Ong, and H. Yu. 2004. Distribution and functions of kinectin isoforms. *J Cell Sci.* 117:4537-49.
- Schmidt, N., S. Basu, S. Sladeczek, S. Gatti, J. van Haren, S. Treves, J. Pielage, N. Galjart, and H.R. Brenner. 2012. Agrin regulates CLASP2-mediated capture of microtubules at the neuromuscular junction synaptic membrane. *J Cell Biol.* 198:421-37.
- Schneider, M.F. 1994. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol.* 56:463-84.
- Schweizer, A., M. Ericsson, T. Bachi, G. Griffiths, and H.P. Hauri. 1993. Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J Cell Sci.* 104 ( Pt 3):671-83.
- Schweizer, A., J.A. Fransen, K. Matter, T.E. Kreis, L. Ginsel, and H.P. Hauri. 1990. Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol.* 53:185-96.
- Schweizer, A., J. Rohrer, H.P. Hauri, and S. Kornfeld. 1994. Retention of p63 in an ER-Golgi intermediate compartment depends on the presence of all three of its domains and on its ability to form oligomers. *J Cell Biol.* 126:25-39.
- Schweizer, A., J. Rohrer, J.W. Slot, H.J. Geuze, and S. Kornfeld. 1995. Reassessment of the subcellular localization of p63. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 6):2477-85.
- Senda, T., and T. Yoshinaga-Hirabayashi. 1998. Intermembrane bridges within membrane organelles revealed by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Anat Rec.* 251:339-45.
- Sheetz, M.P. 2001. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:392-6.
- Shen, X., C. Franzini-Armstrong, J.R. Lopez, L.R. Jones, Y.M. Kobayashi, Y. Wang, W.G. Kerrick, A.H. Caswell, J.D. Potter, T. Miller, P.D. Allen, and C.F. Perez. 2007. Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 282:37864-74.
- Sherrington, C.S. 1906. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J Physiol.* 34:1-50.
- Shibata, Y., J. Hu, M.M. Kozlov, and T.A. Rapoport. 2009. Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:329-54.
- Shibata, Y., T. Shemesh, W.A. Prinz, A.F. Palazzo, M.M. Kozlov, and T.A. Rapoport. 2010. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell.* 143:774-88.

- Shibata, Y., G.K. Voeltz, and T.A. Rapoport. 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell*. 126:435-9.
- Shin, D.W., J. Ma, and D.H. Kim. 2000. The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca(2+) and interacts with triadin. *FEBS Lett*. 486:178-82.
- Simon, A.M., P. Hoppe, and S.J. Burden. 1992. Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development*. 114:545-53.
- Song, K.S., P.E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D.S. Kohtz, and M.P. Lisanti. 1996. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem*. 271:15160-5.
- Spencer, J.A., S. Eliazar, R.L. Ilaria, Jr., J.A. Richardson, and E.N. Olson. 2000. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol*. 150:771-84.
- Straube, A., and A. Merdes. 2007. EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Curr Biol*. 17:1318-25.
- Su, X., R. Ohi, and D. Pellman. 2012. Move in for the kill: motile microtubule regulators. *Trends Cell Biol*. 22:567-75.

## T

- Takei, K., V.I. Slepnev, V. Haucke, and P. De Camilli. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*. 1:33-9.
- Takekura, H., L. Bennett, T. Tanabe, K.G. Beam, and C. Franzini-Armstrong. 1994. Restoration of junctional tetrads in dysgenic myotubes by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys J*. 67:793-803.
- Takekura, H., B.E. Flucher, and C. Franzini-Armstrong. 2001. Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol*. 239:204-14.
- Takeshima, H., M. Iino, H. Takekura, M. Nishi, J. Kuno, O. Minowa, H. Takano, and T. Noda. 1994. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature*. 369:556-9.
- Takeshima, H., T. Ikemoto, M. Nishi, N. Nishiyama, M. Shimuta, Y. Sugitani, J. Kuno, I. Saito, H. Saito, M. Endo, M. Iino, and T. Noda. 1996. Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J Biol Chem*. 271:19649-52.
- Takeshima, H., S. Komazaki, K. Hirose, M. Nishi, T. Noda, and M. Iino. 1998a. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J*. 17:3309-16.
- Takeshima, H., S. Komazaki, M. Nishi, M. Iino, and K. Kangawa. 2000. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell*. 6:11-22.
- Takeshima, H., S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, T. Hirose, and et al. 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*. 339:439-45.
- Takeshima, H., M. Shimuta, S. Komazaki, K. Ohmi, M. Nishi, M. Iino, A. Miyata, and K. Kangawa. 1998b. Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem J*. 331 ( Pt 1):317-22.
- Tanabe, T., K.G. Beam, B.A. Adams, T. Niidome, and S. Numa. 1990. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature*. 346:567-9.
- Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose, and S. Numa. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*. 328:313-8.



- Tassin, A.M., B. Maro, and M. Bornens. 1985a. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 100:35-46.
- Tassin, A.M., M. Paintrand, E.G. Berger, and M. Bornens. 1985b. The Golgi apparatus remains associated with microtubule organizing centers during myogenesis. *J Cell Biol.* 101:630-8.
- Terasaki, M., L.B. Chen, and K. Fujiwara. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol.* 103:1557-68.
- Terasaki, M., J. Song, J.R. Wong, M.J. Weiss, and L.B. Chen. 1984. Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell.* 38:101-8.
- Thevenon, D., S. Smida-Rezgui, F. Chevessier, S. Groh, J. Henry-Berger, N. Beatriz Romero, M. Villaz, M. DeWaard, and I. Marty. 2003. Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:669-75.
- Tolley, N., I.A. Sparkes, P.R. Hunter, C.P. Craddock, J. Nuttall, L.M. Roberts, C. Hawes, E. Pedrazzini, and L. Frigerio. 2008. Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. *Traffic.* 9:94-102.
- Toussaint, A., B.S. Cowling, K. Hnia, M. Mohr, A. Oldfors, Y. Schwab, U. Yis, T. Maisonobe, T. Stojkovic, C. Wallgren-Pettersson, V. Laugel, A. Echaniz-Laguna, J.L. Mandel, I. Nishino, and J. Laporte. 2011. Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol.* 121:253-66.
- Toyama, Y., S. Forry-Schaudies, B. Hoffman, and H. Holtzer. 1982. Effects of taxol and Colcemid on myofibrillogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:6556-60.
- Toyoshima, I., H. Yu, E.R. Steuer, and M.P. Sheetz. 1992. Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J Cell Biol.* 118:1121-31.
- Treves, S., G. Feriotto, L. Moccagatta, R. Gambari, and F. Zorzato. 2000. Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 275:39555-68.
- Tsutsui, H., K. Ishihara, and G.t. Cooper. 1993. Cytoskeletal role in the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Science.* 260:682-7.
- Tsutsui, H., H. Tagawa, R.L. Kent, P.L. McCollam, K. Ishihara, M. Nagatsu, and G.t. Cooper. 1994. Role of microtubules in contractile dysfunction of hypertrophied cardiocytes. *Circulation.* 90:533-55.

## U

- Unwin, N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J Mol Biol.* 346:967-89.
- Ursu, D., S. Sebille, B. Dietze, D. Freise, V. Flockerzi, and W. Melzer. 2001. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. *J Physiol.* 533:367-77.

## V

- Valdivia, H.H. 2012. Ryanodine receptor phosphorylation and heart failure: phasing out S2808 and "criminalizing" S2814. *Circ Res.* 110:1398-402.
- Vale, R.D. 1991. Severing of stable microtubules by a mitotically activated protein in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 64:827-39.

- Valiron, O., N. Caudron, and D. Job. 2001. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 58:2069-84.
- Vandecandelaere, A., S.R. Martin, M.J. Schilstra, and P.M. Bayley. 1994. Effects of the tubulin-colchicine complex on microtubule dynamic instability. *Biochemistry.* 33:2792-801.
- Varnai, P., L. Hunyady, and T. Balla. 2009. STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci.* 30:118-28.
- Vassilopoulos, S., J. Brocard, L. Garcia, I. Marty, and A. Bouron. 2007. Retrograde regulation of store-operated calcium channels by the ryanodine receptor-associated protein triadin 95 in rat skeletal myotubes. *Cell Calcium.* 41:179-85.
- Vassilopoulos, S., S. Oddoux, S. Groh, M. Cacheux, J. Faure, J. Brocard, K.P. Campbell, and I. Marty. 2010. Caveolin 3 is associated with the calcium release complex and is modified via in vivo triadin modification. *Biochemistry.* 49:6130-5.
- Vassilopoulos, S., D. Thevenon, S.S. Rezgui, J. Brocard, A. Chapel, A. Lacampagne, J. Lunardi, M. Dewaard, and I. Marty. 2005. Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 280:28601-9.
- Vedrenne, C., and H.P. Hauri. 2006. Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic.* 7:639-46.
- Vedrenne, C., D.R. Klopfenstein, and H.P. Hauri. 2005. Phosphorylation controls CLIMP-63-mediated anchoring of the endoplasmic reticulum to microtubules. *Mol Biol Cell.* 16:1928-37.
- Vega, A.L., C. Yuan, V.S. Votaw, and L.F. Santana. 2011. Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum structure in ventricular myocytes. *J Biomed Biotechnol.* 2011:382586.
- Veratti, E. 1961. Investigations on the fine structure of striated muscle fiber read before the Reale Istituto Lombardo, 13 March 1902. *J Biophys Biochem Cytol.* 10(4)Suppl:1-59.
- Verdijk, L.B., R. Koopman, G. Schaart, K. Meijer, H.H. Savelberg, and L.J. van Loon. 2007. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:E151-7.
- Verhey, K.J., and J. Gaertig. 2007. The tubulin code. *Cell Cycle.* 6:2152-60.
- Villa, A., P. Podini, A. Nori, M.C. Panzeri, A. Martini, J. Meldolesi, and P. Volpe. 1993. The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection. II. Postnatal differentiation of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res.* 209:140-8.
- Voeltz, G.K., W.A. Prinz, Y. Shibata, J.M. Rist, and T.A. Rapoport. 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell.* 124:573-86.
- Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3:944-50.
- Volpe, P., A. Villa, P. Podini, A. Martini, A. Nori, M.C. Panzeri, and J. Meldolesi. 1992. The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection: distribution of endoplasmic reticulum markers in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6142-6.

## W

- Walker, R.A., E.T. O'Brien, N.K. Pryer, M.F. Soboeiro, W.A. Voter, H.P. Erickson, and E.D. Salmon. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol.* 107:1437-48.
- Wang, Y., X. Li, H. Duan, T.R. Fulton, J.P. Eu, and G. Meissner. 2009. Altered stored calcium release in skeletal myotubes deficient of triadin and junctin. *Cell Calcium.* 45:29-37.
- Washington, R.L., J.T. Bricker, B.S. Alpert, S.R. Daniels, R.J. Deckelbaum, E.A. Fisher, S.S. Gidding, J. Isabel-Jones, R.E. Kavey, G.R. Marx, and et al. 1994. Guidelines for exercise testing in the pediatric age group. From the Committee on Atherosclerosis and Hypertension in Children, Council on Cardiovascular Disease in the Young, the American Heart Association. *Circulation.* 90:2166-79.

- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1998. Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol.* 8:798-806.
- Williams, R.T., S.S. Manji, N.J. Parker, M.S. Hancock, L. Van Stekelenburg, J.P. Eid, P.V. Senior, J.S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P.J. Smith, and M.A. Dziadek. 2001. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J.* 357:673-85.
- Wilson, M.H., and E.L. Holzbaur. 2012. Opposing microtubule motors drive robust nuclear dynamics in developing muscle cells. *J Cell Sci.* 125:4158-69.

## Y

- Yan, Z., X.C. Bai, C. Yan, J. Wu, Z. Li, T. Xie, W. Peng, C.C. Yin, X. Li, S.H. Scheres, Y. Shi, and N. Yan. 2015. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature.* 517:50-5.
- Yanagisawa, T., S. Hasegawa, and H. Mohri. 1968. The bound nucleotides of the isolated microtubules of sea-urchin sperm flagella and their possible role in flagellar movement. *Exp Cell Res.* 52:86-100.
- Yano, M., T. Yamamoto, Y. Ikeda, and M. Matsuzaki. 2006. Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 3:43-52.
- Yuan, Q., G.C. Fan, M. Dong, B. Altschafel, A. Diwan, X. Ren, H.H. Hahn, W. Zhao, J.R. Waggoner, L.R. Jones, W.K. Jones, D.M. Bers, G.W. Dorn, 2nd, H.S. Wang, H.H. Valdivia, G. Chu, and E.G. Kranias. 2007. Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation.* 115:300-9.

## Z

- Zaal, K.J., C.L. Smith, R.S. Polishchuk, N. Altan, N.B. Cole, J. Ellenberg, K. Hirschberg, J.F. Presley, T.H. Roberts, E. Siggia, R.D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 1999. Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis. *Cell.* 99:589-601.
- Zacharias, D.A., M. Mullen, and S.L. Planey. 2012. Antiproliferative factor-induced changes in phosphorylation and palmitoylation of cytoskeleton-associated protein-4 regulate its nuclear translocation and DNA binding. *Int J Cell Biol.* 2012:150918.
- Zalk, R., O.B. Clarke, A. des Georges, R.A. Grassucci, S. Reiken, F. Mancina, W.A. Hendrickson, J. Frank, and A.R. Marks. 2015. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature.* 517:44-9.
- Zeligs, J.D., and S.H. Wollman. 1979. Mitosis in thyroid follicular epithelial cells in vivo. III. Cytokinesis. *J Ultrastruct Res.* 66:288-303.
- Zhang, J., S.L. Planey, C. Ceballos, S.M. Stevens, Jr., S.K. Keay, and D.A. Zacharias. 2008. Identification of CKAP4/p63 as a major substrate of the palmitoyl acyltransferase DHHC2, a putative tumor suppressor, using a novel proteomics method. *Mol Cell Proteomics.* 7:1378-88.
- Zhang, L., J. Kelley, G. Schmeisser, Y.M. Kobayashi, and L.R. Jones. 1997. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 272:23389-97.

- Zhang, T., K.J. Zaal, J. Sheridan, A. Mehta, G.G. Gundersen, and E. Ralston. 2009. Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. *J Cell Sci.* 122:1401-9.
- Zhang, X., Y.H. Tee, J.K. Heng, Y. Zhu, X. Hu, F. Margadant, C. Ballestrem, A. Bershadsky, G. Griffiths, and H. Yu. 2010. Kinectin-mediated endoplasmic reticulum dynamics supports focal adhesion growth in the cellular lamella. *J Cell Sci.* 123:3901-12.
- Zhuang, X., H. Wang, S.K. Lam, C. Gao, X. Wang, Y. Cai, and L. Jiang. 2013. A BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25:4596-615.
- Zorzato, F., J. Fujii, K. Otsu, M. Phillips, N.M. Green, F.A. Lai, G. Meissner, and D.H. MacLennan. 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., E. Scutari, V. Tegazzin, E. Clementi, and S. Treves. 1993. Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release. *Mol Pharmacol.* 44:1192-201.
- Zubrzycka, E., and D.H. MacLennan. 1976. Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of calsequestrin in rat skeletal muscle cell cultures. *J Biol Chem.* 251:7733-8.
- Zufferey, R., D. Nagy, R.J. Mandel, L. Naldini, and D. Trono. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* 15:871-5.

# Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad

Anne Fourest-Lieuvin<sup>1,3,4</sup>, John Rendu<sup>1,3,6</sup>, Alexis Osseni<sup>1,3</sup>, Karine Pernet-Gallay<sup>2,3</sup>, Daniella Rossi<sup>5</sup>, Sarah Oddoux<sup>1,3</sup>, Julie Brocard<sup>1,3</sup>, Vincenzo Sorrentino<sup>5</sup>, Isabelle Marty<sup>1,3</sup> and Julien Fauré<sup>1,3,6,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Muscle et Pathologies, Grenoble 38042, France

<sup>2</sup>INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Plateforme de Microscopie Electronique, Grenoble 38042, France

<sup>3</sup>Université Joseph Fourier, 38400 Saint-Martin-d'Hères, Grenoble, France

<sup>4</sup>Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Direction des Sciences du Vivant, CEA, 92265 Fontenay-aux-Roses cedex, France

<sup>5</sup>Molecular Medicine Section, Department of Neuroscience, and Interuniversity Institute of Myology, University of Siena, Siena 53100, Italy

<sup>6</sup>Centre Hospitalier Régional Universitaire de Grenoble, Hôpital Michallon, Biochimie et Génétique Moléculaire, La Tronche, Grenoble 38700, France

\*Author for correspondence ([julien.fauré@ujf-grenoble.fr](mailto:julien.fauré@ujf-grenoble.fr))

Accepted 27 March 2012

Journal of Cell Science 125, 3443–3453

© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.100958

## Summary

The terminal cisternae represent one of the functional domains of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (SR). They are closely apposed to plasma membrane invaginations, the T-tubules, with which they form structures called triads. In triads, the physical interaction between the T-tubule-anchored voltage-sensing channel DHPR and the SR calcium channel RyR1 is essential because it allows the depolarization-induced calcium release that triggers muscle contraction. This interaction between DHPR and RyR1 is based on the peculiar membrane structures of both T-tubules and SR terminal cisternae. However, little is known about the molecular mechanisms governing the formation of SR terminal cisternae. We have previously shown that ablation of triadins, a family of SR transmembrane proteins that interact with RyR1, induced skeletal muscle weakness in knockout mice as well as a modification of the shape of triads. Here we explore the intrinsic molecular properties of the longest triadin isoform Trisk 95. We show that when ectopically expressed, Trisk 95 can modulate reticulum membrane morphology. The membrane deformations induced by Trisk 95 are accompanied by modifications of the microtubule network organization. We show that multimerization of Trisk 95 by disulfide bridges, together with interaction with microtubules, are responsible for the ability of Trisk 95 to structure reticulum membrane. When domains responsible for these molecular properties are deleted, anchoring of Trisk 95 to the triads in muscle cells is strongly decreased, suggesting that oligomers of Trisk 95 and microtubules contribute to the organization of the SR terminal cisternae in a triad.

**Key words:** Triadin, Muscle, Reticulum, Calcium release, Triad, Microtubule

## Introduction

Skeletal muscle contraction is achieved when an efficient depolarization of the sarcolemma triggers massive calcium efflux out of the sarcoplasmic reticulum (SR). This process called excitation-contraction (E–C) coupling relies on the physical interaction between two calcium channels that are anchored in different membrane compartments of the muscle cell (Block et al., 1994; Marty et al., 1994). The dihydropyridine receptor (DHPR) is present in invaginations of the plasma membrane, called transverse tubules (T-tubules), and the ryanodine receptor (RyR1) is located in cisternae of SR closely apposed to T-tubules. This unique membrane system, composed of two SR cisternae apposed to one T-Tubule, is called a triad and forms the basal structural unit responsible for E–C coupling (Flucher, 1992). Triads are evenly distributed along skeletal muscle cell longitudinal axis, and precisely localized in regard of each A–I transitions in sarcomeres. Numerous studies have highlighted the very high degree of organization of triad membranes that allows the physical interaction between the DHPR and RyR1 (Flucher and Franzini-Armstrong, 1996). It is therefore not surprising that deletion of several proteins of the SR cisternae induces modifications of the morphology of the triad

that are associated to muscle cell dysfunction. For instance, mice knocked-out for junctophilin-1, a protein bridging SR to the plasma membrane, die at birth from feeding default and show reduced and disorganized triads in skeletal muscle (Ito et al., 2001). Ablation of the calsequestrin-1 protein, which binds calcium inside SR cisternae lumen, also impairs muscle function and induces modifications of the structure and composition of triads (Paolini et al., 2007). Although the specific structure of the triad membranes seems essential to sustain E–C coupling, the molecular determinants of SR cisternae morphology inside a triad are still largely unknown. A number of proteins associated with RyR1 in a macromolecular complex, the calcium release complex (CRC), have been shown to participate in the E–C coupling process, and could be candidates as molecular determinants of the shape of SR cisternae. The transmembrane Trisk 95 protein is one of these candidates.

Trisk 95 is one of the isoforms arising from alternative splicing of the *TRDN* gene (Thevenon et al., 2003). It is specifically expressed in striated muscle and exclusively localized at the triad (Brandt et al., 1990; Kim et al., 1990). The four triadin isoforms so far described are type II transmembrane proteins of different molecular mass (from 95 to 32 kDa) that share a common

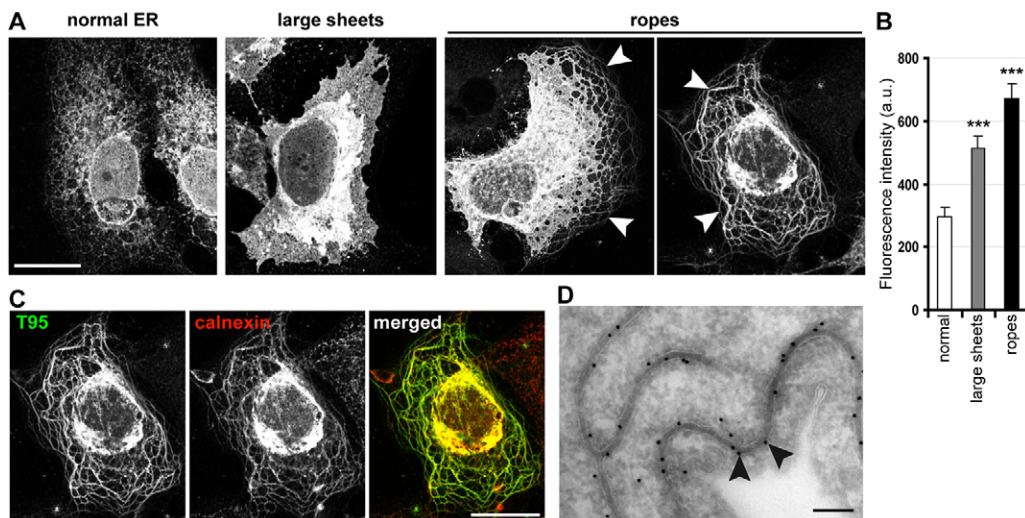
cytosolic N-terminus and a single transmembrane domain. Their respective intra-luminal parts diverge by their lengths and by their last C-terminal amino acids. All the experiments based on modifications of the expression level of triadins have not allowed a clear view of their role in the calcium release process. When Trisk 95 was overexpressed in primary cultures of rat skeletal myotubes using adenovirus gene transfer, it resulted in a blocking of the depolarization-induced calcium release (Rezgui et al., 2005). A reduction of triadin expression by siRNAs in C2C12 myotubes resulted also in a partial inhibition of the depolarization-induced calcium release (Wang et al., 2009). Mice knocked-out for the triadin gene exhibited a reduced amount of stored calcium in muscle SR as well as a reduction in the depolarization-induced calcium release (Shen et al., 2007), associated with a marked reduction in muscle strength (Oddoux et al., 2009). Hence, in all these experiments, both an increased and a decreased expression of Trisk 95 resulted in similar observations, limiting interpretations on the real role of triadin in the E-C coupling.

We have observed by electron microscopy significant structural deformations of the triads in skeletal muscles of triadin KO mice (Oddoux et al., 2009). Therefore, we raised the hypothesis that Trisk 95 could play a role on the membrane structure of SR terminal cisternae in triads. To study the intrinsic properties of the Trisk 95 molecule regarding reticulum membranes, we have investigated its behavior after expression in a cell model devoid of muscle proteins. Our work shows that Trisk 95 expression in COS-7 cells induces a striking deformation of the endoplasmic reticulum (ER), together with modifications of the microtubule network morphology and dynamics. We have characterized the functional domains of Trisk 95 responsible for these phenotypes, and altogether our data suggest that triadin is involved in regulating the morphology of the SR membrane at the triad.

## Results

### Expression of Trisk 95 in COS-7 cells leads to ER membrane deformation

To investigate the properties of triadin regarding reticulum membranes, Trisk 95 was expressed in cultured COS-7 cells. In transfected cells, Trisk 95 staining showed three types of phenotype: (1) limited perinuclear sheets together with peripheral reticulated tubes, typical for ER (Fig. 1A, 'normal ER'); (2) sheets of membranes expanding to the cell periphery (Fig. 1A, 'large sheets'), and (3) rope-like structures emerging from perinuclear sheets that can be large or extremely compacted (Fig. 1A, 'ropes', arrowheads). Trisk 95 labeling colocalized with the endogenous ER marker calnexin, even when cells show the most dramatic phenotype (Fig. 1C), demonstrating that Trisk 95 expressed in COS-7 localizes in the ER and can induce ER membrane deformations. The apparition of ER rope-like structures correlated with an increase in the relative expression levels of Trisk 95 in cells (Fig. 1B), indicating that accumulation of Trisk 95 can modify reticulum membrane morphology. Such a phenotype has already been described for proteins known to regulate ER morphology (Klopfenstein et al., 1998; Park et al., 2010). To better characterize the reorganization of ER membranes observed after Trisk 95 expression, immunoelectron microscopy was performed on COS-7 cells expressing Trisk 95 fused to GFP (T95-GFP). The addition of GFP did not modify the ability of Trisk 95 to deform ER as detected by confocal microscopy (supplementary material Figs S2, S3, control). In immuno-electron microscopy, gold particles labeling T95-GFP were concentrated on narrow tubules delimited by a lipid bilayer (Fig. 1D, arrowheads). These tubules show a striking reduction in diameter ( $39.4 \pm 0.27$  nm) when compared to rough ER normal tubule diameter ( $63.52 \pm 2.19$  nm) measured on untransfected cells.



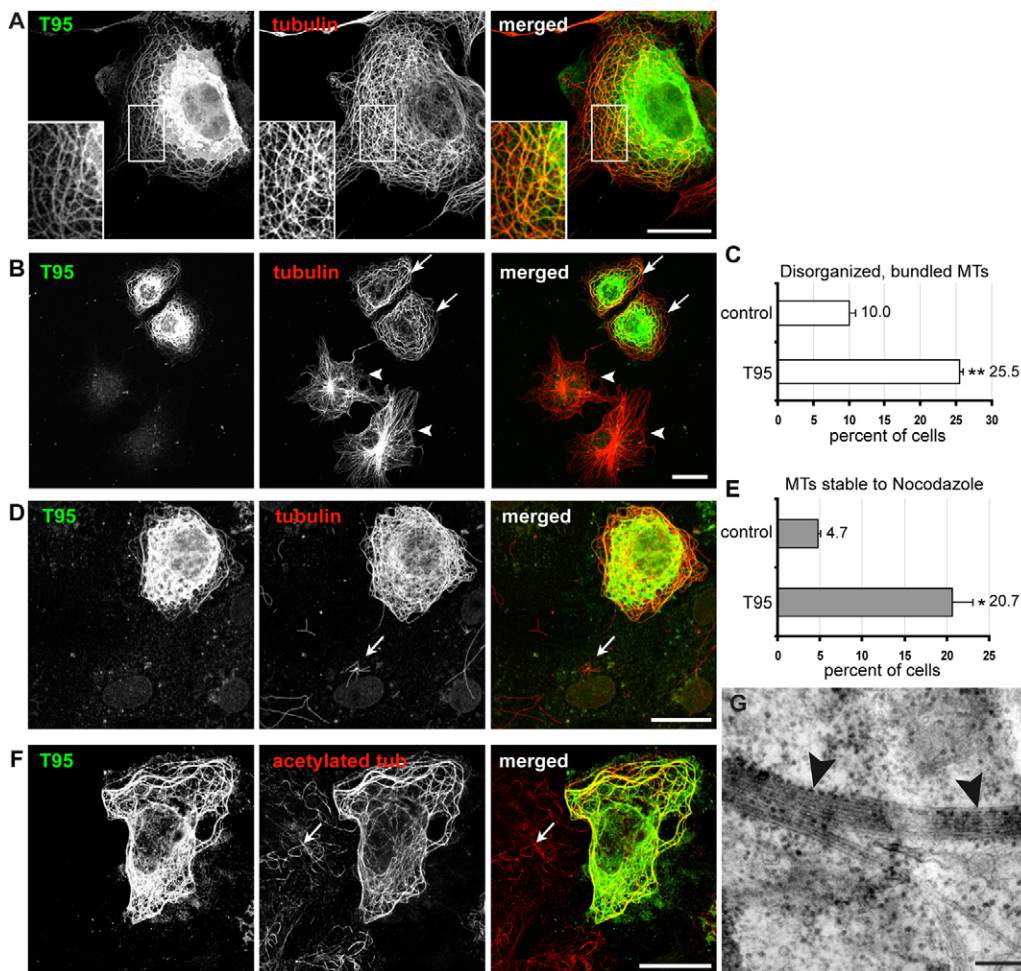
**Fig. 1. Trisk 95 localizes in the ER and induces ER malformation.** Trisk 95 was expressed in COS-7 cells for 28 hours before cell fixation and permeabilization. (A) Cells were stained with an antibody against the C-terminus of Trisk 95. Three patterns of Trisk 95 staining could be observed: a reticular pattern resembling normal ER, large sheets, and ropes (arrowheads). Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) Quantification of the mean fluorescence intensity for cells exhibiting each pattern. \*\*\* $P < 0.001$ ,  $t$ -test comparisons of 'large sheets' ( $n = 20$  cells) or 'ropes' ( $n = 13$  cells) phenotype vs 'normal ER' ( $n = 12$  cells) phenotype. Error bars are s.e.m. (C) Cells expressing Trisk 95 were co-stained with antibodies against Trisk 95 (T95, green) and calnexin (red). Calnexin colocalized with Trisk 95, showing that ropes and sheets were ER compartments. Scale bar: 20  $\mu$ m. (D) Electron microscopy image of a COS-7 cell expressing Trisk-95-GFP and labeled with immunogold. Membrane tubules with a narrow and regular diameter are labeled with the gold particles (arrowheads). Scale bar: 200 nm.

These data indicate that accumulation of Trisk 95 in the ER of non-muscle cells leads to drastic modifications of the ER membrane structure, especially tubular deformations referred to as 'rope-like structures'. Such ER rope-like structures have already been observed in association with a reorganization of the microtubule network (Vedrenne and Hauri, 2006). We have therefore investigated microtubules in Trisk-95-expressing cells.

### Trisk-95-induced ER deformation is associated with a disorganization of the microtubule network

Trisk 95 transfected cells were co-labeled with anti-tubulin antibodies, and confocal images showed that rope-like structures positive for Trisk 95 co-aligned with microtubules (Fig. 2A). In transfected cells, microtubules appeared disorganized and bundled, with a loss of their normal radial pattern (Fig. 2B,

arrowheads; quantification in Fig. 2C). To demonstrate microtubule bundling, we used correlative microscopy: cells transfected with T95-GFP were selected under a confocal microscope thanks to a carbon grid coated coverslip, and next analyzed by electron microscopy after appropriate fixation. Fig. 2G shows that microtubules observed in electron microscopy are clearly associated in bundles (arrowheads) in cells expressing T95-GFP. Bundling of microtubules is generally associated with a modification of the overall microtubule dynamics. This was tested by measuring the susceptibility of microtubules to the depolymerizing drug nocodazole in Trisk-95-expressing cells (Fig. 2D). In untransfected cells, only a few microtubules resisted a 30 minute nocodazole treatment (arrow). In contrast, bundled microtubules associated with Trisk-95-induced rope-like structures were not affected by the drug,

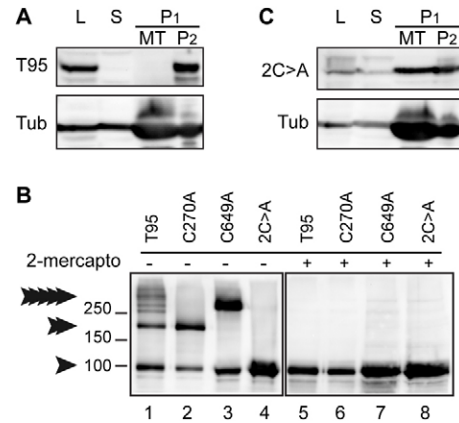


**Fig. 2. ER ropes induced by Trisk 95 disorganize and stabilize microtubules.** Trisk 95 was expressed in COS-7 cells. (A,B,D) Cells were co-stained with antibodies against Trisk 95 (T95, green) and  $\beta$ -tubulin (red). Scale bars: 20  $\mu$ m. (A) ER ropes induced by Trisk 95 expression colocalize with microtubules (see zooms in insets). (B) Cells expressing Trisk 95 show disorganization and bundling of microtubules (arrows), which is not the case in non-expressing cells (arrowheads). (C) Quantification of cells with disorganized microtubules, in non-transfected (control) cells and in T95-expressing cells.  $**P < 0.01$ ,  $t$ -test comparisons of T95-transfected cells vs control. Error bars are s.e.m.;  $n = 3$  experiments. (D) After 28 hours of Trisk 95 expression, cells were treated with nocodazole and then lysed. In T95-expressing cells, most microtubules resisted nocodazole treatment, whereas in non-transfected cells, only a few microtubules remained (arrow). (E) Quantification of cells exhibiting a large array of stable microtubules, in non-transfected (control) cells and in T95-expressing cells.  $*P < 0.05$ ,  $t$ -test and error bars as in C. (F) Cells were co-stained with antibodies against Trisk 95 (green) and acetylated tubulin (red). In non-transfected cells, only a few microtubules were acetylated (arrow), whereas T95-transfected cells exhibited massive acetylation of microtubules. Scale bar: 20  $\mu$ m. (G) COS-7 cells expressing T95-GFP were processed for correlative electron microscopy to visualize microtubules. Microtubules were often found as bundles (arrowheads) in the cytosol of these cells. Scale bar: 200 nm.

indicating they have a slower turnover (quantification in Fig. 2E). To confirm this alteration in the microtubule dynamics, we used an antibody specific for acetylated-tubulin, a post-translationally modified form of tubulin that is present preferentially in stabilized microtubules. Fig. 2F shows that bundles of microtubules generated by Trisk 95 expression are extensively labeled by the anti-acetylated tubulin antibody. In untransfected cells, only a subset of the microtubule network is labeled (arrow). These results demonstrate that expression of Trisk 95 in COS-7 cells modifies microtubule network organization as well as microtubule dynamics.

### Trisk 95 interacts with microtubules

Deformations of ER membranes into rope-like structures that are aligned along bundled microtubules are the hallmarks of proteins that can bridge both organelles. Two proteins described as directly regulating ER membrane morphology, Climp-63 and REEP1, also interact with microtubules (Klopfenstein et al., 1998; Park et al., 2010). Both proteins, when overexpressed in COS cells, lead to the same phenotype as that observed for Trisk 95. We therefore tested whether Trisk 95 could also interact with microtubules using a co-sedimentation assay (Fig. 3A). HEK293 cells showed rope-like structures when transfected with Trisk 95 (supplementary material Fig. S1) and were used to obtain large amounts of Trisk-95-enriched lysates (Fig. 3A, lane L). Trisk-95-enriched lysates were incubated with purified tubulin in conditions allowing the polymerization of microtubules, which were then sedimented by centrifugation through a glycerol cushion. In the resulting pellet (P1), microtubule-associated proteins were discriminated from aggregates by a depolymerization step of the microtubules: proteins interacting with microtubules were released together with free tubulin (lane MT) whereas aggregates were pelleted by a second centrifugation (lane P2). Fig. 3A shows that Trisk 95 was present in the P2 fraction after this co-sedimentation assay, suggesting that it aggregated. This aggregation of the protein hindered the detection of any potential interaction with microtubules. Previous work in skeletal muscles had underlined that Trisk 95 was able to form large multimeric complexes, probably mediated by disulfide bridges (Froemming et al., 1999). To disrupt these complexes that could account for Trisk 95 sedimentation in the P2 pellet, we generated a mutant form of Trisk 95 where both cysteines of the molecule were replaced by alanines (Trisk 95 2C>A). Fig. 3B shows that indeed mutation of both cysteines of Trisk 95 to alanines is sufficient to abolish multimerization of the protein, as observed by non-denaturing electrophoresis (compare lanes 1 and 4). The Trisk 95 2C>A mutant was therefore used in a microtubule co-sedimentation assay (Fig. 3C), and a significant proportion of the Trisk 95 2C>A protein was found co-sedimenting with the microtubules (MT fraction). This indicated that Trisk 95, which is a transmembrane ER protein, could interact with the microtubules, suggesting that the formation of rope-like structures might rely on the microtubule network. We next investigated the effect of microtubule-stabilizing and -depolymerizing agents on the formation of ER rope-like structures. When COS-7 cells transfected with Trisk 95 were treated with Taxol, rope-like structures appeared rigidified, following exactly the microtubule pattern induced by the stabilizing agent (supplementary material Fig. S2). Moreover, we also showed that rope-like structures disappeared after a 2 h incubation time with nocodazole (supplementary material



**Fig. 3. Trisk 95 can bind microtubules when devoid from its two cysteine residues that mediate oligomerization.** Wild-type Trisk 95 (T95) or Trisk 95 mutated on one (C270A or C649A mutant) or both luminal cysteines (mutant 2C>A), were expressed in HEK293 cells before cell lysis. (A,C) Lysates (L) were processed for microtubule co-sedimentation assay: they were incubated at 37°C with tubulin, GTP and Taxol to induce microtubule polymerization, and centrifuged on a glycerol cushion to separate the supernatant not associated with microtubules (S) from the microtubule pellet (P1). Microtubules in this pellet were depolymerized and centrifuged again to separate true microtubule fraction (MT) from a pellet of protein complexes or aggregates (P2). Fractions were processed for SDS-PAGE and western blotting with antibodies against Trisk 95 (top panels) and  $\beta$ -tubulin (bottom panels). Trisk 95 is in the P2 fraction, showing that it either aggregates or forms protein complexes, whereas the 2C>A mutant is mostly present in the MT fraction, associated with microtubules. (B) Cysteines 270 and 649 mediate oligomerization of Trisk 95. Cell lysates were processed for SDS-PAGE either with non denaturing or denaturing sample buffers (with or without mercaptoethanol), followed by western blotting with an antibody against Trisk 95. In non-denaturing conditions, a monomeric form of 95 kDa (>), a dimeric form of about 200 kDa (>>) and multimeric forms (>>>>>) of Trisk 95 were visible (lane 1). For the 2C>A double mutant, only the monomeric form is present (lane 4). The monomeric form was present in both C270A and C649A simple mutants, but the dimeric form was visible only for the C270A mutant (lane 2) whereas the C649A mutant might form a hetero-oligomer with an unknown partner (band above 250 kDa, lane 3).

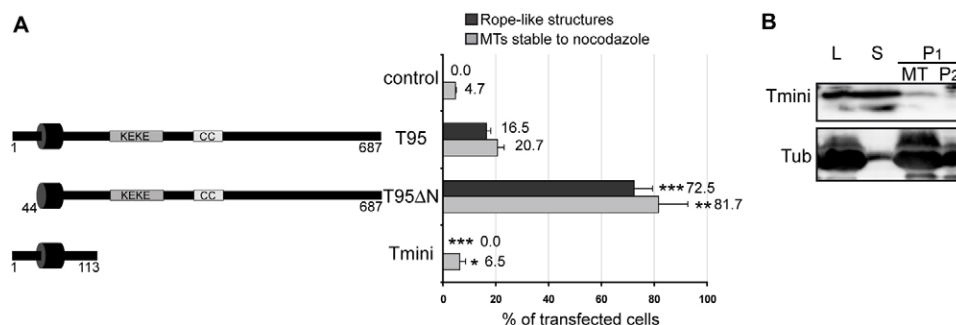
Fig. S3). Thus, reticulum membranes deformed by Trisk 95 expression follow microtubule tracks, and require an intact microtubule network to be maintained.

Altogether, our data show that Trisk 95 is able to (1) intensively modify ER membrane shape; (2) align these membranes onto microtubules; and (3) interact with microtubules. These features are characteristic of proteins recently described as regulators of reticulum membrane structure (Park and Blackstone, 2010) and to further investigate the molecular properties of Trisk 95, we searched for domains of the molecule responsible for ER and microtubule array deformation.

### The luminal domain of Trisk 95 is responsible for ER and microtubule deformations

Trisk 95 has been described as a single pass transmembrane protein, with a long C-terminal luminal domain and a short N-terminal part facing the cytosol (Marty et al., 1995). Truncated versions of Trisk 95 were generated by deleting either the cytosolic part of the molecule (Fig. 4A, T95 $\Delta$ N), or the luminal part starting from residue 114 (Fig. 4A, Tmini). Each of these constructs was expressed in COS-7 cells, and transfected cells





**Fig. 4. The luminal part of Trisk 95 is responsible of ER deformation and microtubule stabilization.** (A) COS-7 cells were transfected with Trisk 95 (T95) or with constructs of Trisk 95 deleted either for its 43 N-terminal residues (T95ΔN) or for most of its luminal part (Tmini). Sequences of Trisk 95 corresponding to the transmembrane domain (black box, aa 46–66), to the KEKE domain (aa 210–224) and to a coiled-coil domain (CC, aa 306–341) are depicted. After transfection, cells were either directly stained with an antibody against Trisk 95 to quantify the number of transfected cells exhibiting ER rope-like structures, or treated with nocodazole as in Fig. 2D to quantify the number of transfected cells showing microtubules stable to nocodazole. Quantifications were also performed on non-transfected cells (control). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , *t*-test comparisons of T95ΔN or Tmini-transfected cells vs T95-transfected cells. Error bars are s.e.m.,  $n = 3$  experiments. (B) Tmini mutant was processed for microtubule co-sedimentation assay as in Fig. 3. Tmini remains in the supernatant (S) fraction, showing that it does not bind microtubules.

exhibiting ER rope-like structures or microtubule stability after nocodazole treatment were quantified (Fig. 4A). Compared to wild-type Trisk 95, expression of the T95ΔN mutant increased drastically the number of cells with rope-like structures (from 16.5 to 72.5% of transfected cells), and with stable microtubules (from 20.7 to 81.7%). On the contrary, the Tmini construct did not induce any rope-like structure and had no impact on microtubule stability when compared to control cells (Fig. 4A). These results suggest that the luminal domain of Trisk 95 is required to generate ER and microtubule deformations. Moreover, deletion of the N-terminal part of Trisk 95 does not abolish the microtubule stabilization phenotype, suggesting that the N-terminus of Trisk 95, although facing the cytosol, is not directly interacting with the microtubule network. To confirm this, we used lysates of HEK293 cells expressing Tmini in the microtubule co-sedimentation assay. Fig. 4B shows that Tmini is not present in the microtubule fraction, and remains in the supernatant (S) after the first centrifugation, confirming that Trisk 95 does not interact with microtubules via its N-terminal domain, but rather through its C-terminal domain. Because Trisk 95 C-terminal domain is inside the luminal space of the ER, its interaction with microtubules must be indirect.

These experiments show that the luminal domain of Trisk 95 contains the motives responsible for its molecular properties. They also show that the deletion of the cytosolic part of Trisk 95 strongly enhances the occurrence of rope-like structures, as well as the stabilization of microtubules, suggesting that the cytosolic N-terminal part of Trisk 95 plays a regulatory role in the phenotypes we observe. We next dissected the luminal part of Trisk 95 to define regions responsible for the properties of the molecule.

#### Two cysteines and a coiled-coil motif are responsible for molecular properties of Trisk 95

We have demonstrated that cysteine disulfide bridging is responsible for the formation of large multimeric complexes of Trisk 95 (Fig. 3B). Such platforms of molecules could modify the morphology of ER membranes in COS-7 cells. To investigate this hypothesis, we monitored ER morphology after expression of

single cysteine mutants of Trisk 95, that could only make dimers (as shown in Fig. 3B, lanes 2 and 3), or double cysteine mutant, that is monomeric (Fig. 3B, lane 4). Fig. 5A shows that single cysteine mutant (C270A or C649A) expression induced a diminution of 50% of rope-like structure occurrence compared to wild-type Trisk 95, indicating that dimers of Trisk 95 are less prone to induce membrane deformations. Accordingly, the expression of the double cysteine mutant (2C>A) induced a supplemental 50% drop in the number of cells showing ER deformation. However, the localization of the 2C>A mutant was modified: instead of a unique intracellular reticulum staining, as observed for Trisk 95 C270A and C649A, we noticed that the 2C>A mutant also exhibited a plasma membrane labeling. By immunofluorescence studies, we showed that the 2C>A mutant can be detected on cells fixed without permeabilization with an antibody directed against the C-terminal part of the protein (Fig. 5B), which is not the case for wild-type Trisk 95. After permeabilization of the cells, both proteins are recognized with an antibody against the N-terminus of the molecule. To further demonstrate the plasma membrane localization of the 2C>A mutant, we realized a purification of cell surface proteins after biotinylation. The panel C of Fig. 5 shows that a significant proportion of the 2C>A mutant is recovered in the plasma membrane fraction (Mb, lane 5), in contrast to the WT form of Trisk 95 (Mb, lane 3).

Single cysteine mutants showed a marked reduction in the formation of rope-like structures, thus suggesting that multimerization of Trisk 95 could be responsible for ER membrane deformation. Mutation of the 2 cysteines residues of Trisk 95 induces its exit of the ER and may explain partially why the 2C>A mutant shows much less rope-like structure than wild-type Trisk 95. However, the 2C>A mutant still present in the ER was able to induce a few rope-like structures, suggesting that other sequences of the molecule are also responsible for ER membrane deformations. We focused on two motives of interest: (1) a highly charged stretch of lysines and glutamate, called the KEKE motif (aa 210 to 224) (Realini et al., 1994), that allows interaction of triadins with RyR1 and calsequestrin (Kobayashi et al., 2000; Lee et al., 2004) and (2) a putative coiled-coil motif

(aa 306 to 341) which was detected with COILS and PCOILS software (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoil>). We generated in-frame deletions of these motifs, individually (mutants  $\Delta 114-264$  and  $\Delta 306-341$ ) or together (mutant  $\Delta 114-341$ ), and expressed them in COS-7 cells. We showed that the deletion of the small coiled-coil motif ( $\Delta 306-341$ ) was sufficient to induce a 53% reduction (from 16.5% to 7.8% of transfected cells) in the generation of rope-like structures (Fig. 5D).

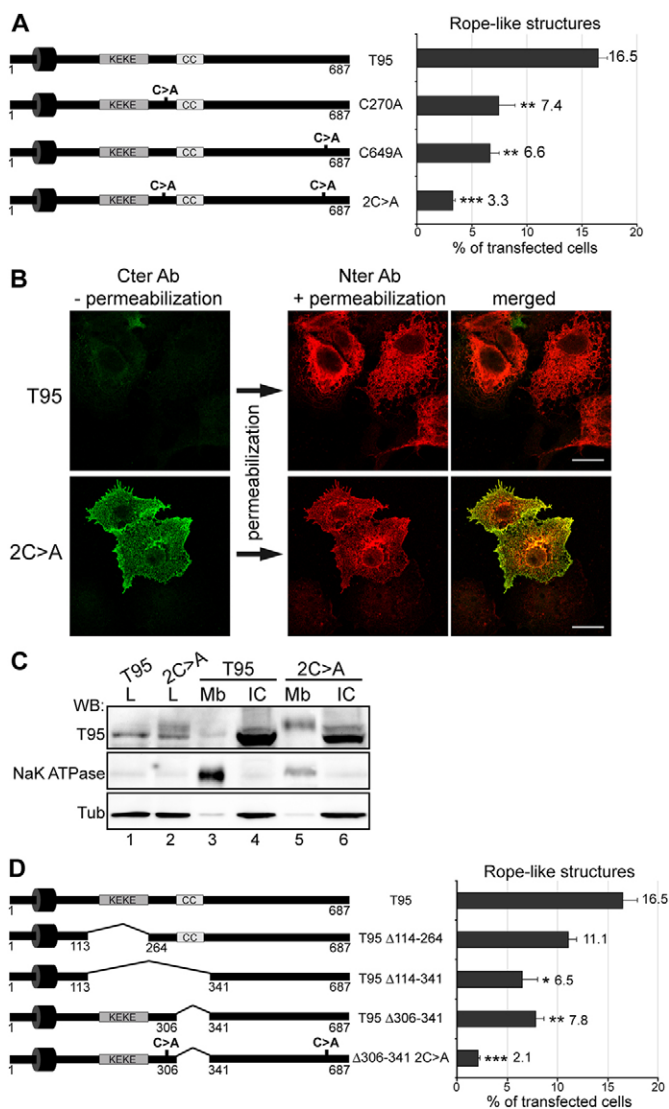
Therefore, a putative coiled-coil domain and cysteine residues are responsible for the ER membrane deformations generated by Trisk 95. In order to confirm this, we generated a version of Trisk 95 with 2C>A and  $\Delta 306-341$  mutations (T95  $\Delta 306-341$  2C>A). As shown in Fig. 5D, this mutant form of Trisk 95 induced ER deformation in as few as 2.1% of transfected COS-7 cells. The effect of each mutation seems therefore additive to the other, suggesting that ER membrane deformation we observe may depend on two different mechanisms requiring both coiled-coil domain and disulfide bridging in Trisk 95.

We thus revealed, using COS-7 cells, domains that could account for the Trisk 95 molecular properties: indirect interaction

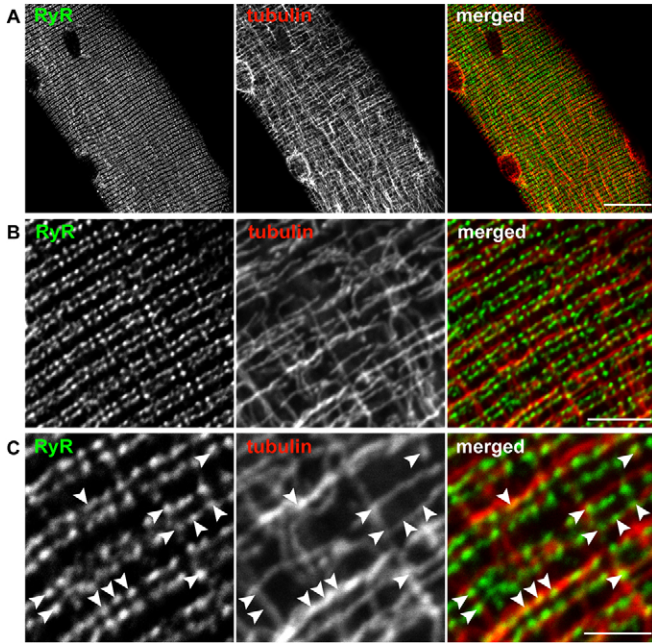
with the microtubule network and modulation of reticulum membrane morphology. In the skeletal muscle, these properties could play a role in the structure and function of SR membrane in triads. We therefore tested whether triads in muscle cells could contact the microtubule network, and if Trisk 95 domains could be involved in the organization of sarcoplasmic reticulum membranes.

### Muscle triads contact some microtubule tracks

In undifferentiated cells, reticulum membranes have been shown to make local contact points with the microtubule network (reviewed in Vedrenne and Hauri, 2006). However, in skeletal muscle, contacts between membranes of the terminal cisternae of SR and microtubules are poorly characterized. We performed double immunofluorescent labeling of triads and microtubules in isolated *flexor digitorum brevis* muscle of adult mouse (Fig. 6). Triads labeled by an anti-RyR1 antibody showed characteristic double rows of dots (Fig. 6, left images). The microtubules appear both in longitudinal and transversal orientation (Fig. 6, central images) as already reported (Ralston et al., 1999; Prins et al., 2009). Overlapping labeling of RyR1 and microtubules can be detected on the merged image of panel B as yellow dots. At higher magnification (panel C), triads labeling appear close to microtubule tracks, with a proportion of dots co-localizing with microtubules (Fig. 6C, arrowheads). This partial overlap between the labeling of triads and microtubules thus suggests the existence of some contact points between SR terminal cisternae and microtubules in muscles.



**Fig. 5. Trisk 95 properties depend on its luminal cysteines and coiled-coil domain.** (A) Wild-type Trisk 95 (T95) or Trisk 95 mutated on one (mutant C270A or C649A) or both luminal cysteines (mutant 2C>A), were transfected in COS-7 cells. After immunolabeling with an antibody against Trisk 95, transfected cells exhibiting ER rope-like deformations were counted. Sequences of Trisk 95 corresponding to the transmembrane domain (black box, aa 46–66), to the KEKE domain (aa 210–224) and to a coiled-coil domain (CC, aa 306–341) are depicted.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , *t*-test comparisons of mutants vs T95. Error bars are s.e.m.;  $n = 3$  experiments. (B,C) Mutation of both cysteines partly delocalizes Trisk 95 to the plasma membrane. (B) COS-7 cells were transfected either with Trisk 95 or with the double cysteine mutant 2C>A. Cells were fixed without permeabilization and stained with an antibody against the C-terminus of Trisk 95 (green), showing that only the 2C>A mutant localized at the plasma membrane. Afterwards, cells were permeabilized and stained with an antibody against the N-terminus of Trisk 95 (red) to reveal whole cell staining of wild-type or mutant Trisk 95. Scale bars: 20  $\mu$ m. (C) COS-7 cells were transfected either with Trisk 95 or with the mutant 2C>A, and processed for biotinylation of cell surface proteins. Cells were then lysed (L fraction) and incubated with Streptavidin-coupled beads to trap biotinylated cell surface proteins (Mb fraction) and separate them from intracellular proteins (IC fraction). Each fraction was processed for SDS-PAGE and western blotting, the latter revealed either with an antibody against Trisk 95 (T95), or with an antibody against plasma membrane protein Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, or with an antibody against cytosolic protein  $\beta$ -tubulin (Tub). Mutant 2C>A is present in the plasma membrane fraction (Mb, lane 5), and the observed increase in molecular mass is due to the coupling with the crosslinker. (D) Trisk 95 or the indicated deletion mutants of Trisk 95 were transfected in COS-7 cells and, after immunolabeling with an antibody against Trisk 95, transfected cells exhibiting ER rope-like structures were counted. The  $\Delta 306-341$  2C>A mutant is deleted for the coiled-coil domain and mutated on both luminal cysteines.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ , *t*-test comparisons of mutants vs T95. Error bars are s.e.m.,  $n = 3$  experiments.



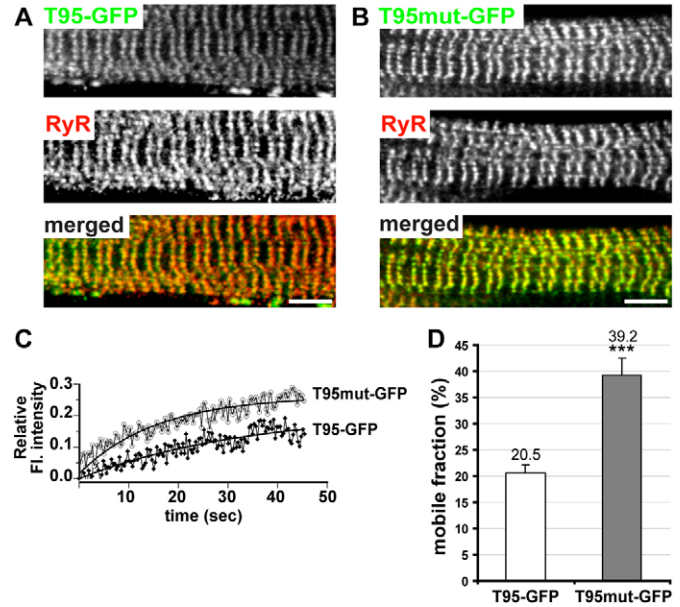
**Fig. 6.** In muscle cells, triads are often on microtubule tracks. (A) Isolated FDB muscle fibers were double-stained with an antibody against RyR1 to label triads (green) and with an antibody against  $\beta$ -tubulin to label microtubules (red). Each image represented one single confocal plane. (B,C) Zooms of the images in A. In C, arrowheads point to some of the triads that co-align with microtubules. Scale bars: 20  $\mu$ m (A), 5  $\mu$ m (B) and 2.5  $\mu$ m (C).

### Cysteines and coiled-coil motif are responsible for Trisk 95 anchoring in muscle cell triads

In skeletal muscle, the mechanisms responsible for the exclusive localization of the proteins of the calcium release complex (CRC) in the terminal cisternae of the SR are not known. However, we have previously shown that the assembly of these proteins in clusters, before triad formation, is accompanied by a strong decrease in their mobility as measured by FRAP analysis (Cusimano et al., 2009). Among proteins of the CRC, Trisk 95 shows the most drastic reduction in mobility when reaching the triadic cluster, suggesting it plays a central role in the formation of a functional triad. The data presented above show that cysteine residues and a coiled-coil domain are responsible for Trisk 95 properties in COS-7 cells. Therefore, we tested if mutations of these domains affected Trisk 95 properties in triads of muscle cells. We expressed T95-GFP and the mutant  $\Delta 306$ –341 2C>A form of Trisk-95-GFP (T95mut-GFP) in cultured rat myotubes. Both constructs were detected in triads, where they colocalized with endogenous RyR1 (Fig. 7A,B). Their mobility in the SR membrane was compared by FRAP analysis performed on the triad clusters (Fig. 7C,D; supplementary material Fig. S4). The  $\Delta 306$ –341 2C>A mutant of T95-GFP exhibited a 90% increase in mobility compared to the wild-type T95-GFP ( $39.2 \pm 3.3$  vs.  $20.5 \pm 1.6$ ). This result suggests that in muscle cells, cysteine residues and the coiled-coil domain of Trisk 95 favor the anchoring of Trisk 95 at the triad.

### Discussion

In skeletal muscle, E–C coupling relies on the specific morphology of the triad membranes, which allows physical interaction between the DHPR and RyR1. However, mechanisms



**Fig. 7.** In muscle cells, anchoring of Trisk 95 in triadic clusters depends on luminal cysteines and coiled-coil domain. (A,B) Primary rat myoblasts were transfected with expression vector for Trisk-95-GFP (T95-GFP in A) or Trisk 95  $\Delta 306$ –341 2C>A (T95mut-GFP in B), and induced to differentiate for 12 days. Cells were counterstained with an antibody against RyR1. T95-GFP and T95mut-GFP (green) both colocalize with RyR1 (red) in triadic clusters. Scale bars: 5  $\mu$ m. (C) Primary rat myoblasts were transfected with T95-GFP or T95mut-GFP and induced to differentiation as in A and B. FRAP analysis was performed on single triadic clusters. The relative fluorescence intensity was calculated after correction of background and loss of fluorescence with time. On the fluorescence recovery curves, time 0 is the time of photobleaching. (D) The mobile fraction for each protein was calculated from fluorescence recovery data. \*\*\* $P < 0.001$ ,  $t$ -test comparisons of T95mut-GFP vs T95-GFP mobile fractions. Error bars are s.e.m.;  $n = 21$  clusters analyzed for each of the two proteins.

regulating the shape of SR cisternae closely apposed to plasma membrane T-tubules in a triad are largely unknown. Deletion of the DHPR and RyR1, which provide a physical link between SR cisternae and T-tubule, does not modify the correct organization of the triad (Flucher et al., 1992; Felder et al., 2002), thus suggesting that morphology of SR cisternae and T-tubule membranes are regulated by other factors. At the plasma membrane, the protein BIN1 regulates the formation of T-tubules by directly shaping lipid bilayers (Lee et al., 2002), and when expressed in COS-1 cells, BIN1 induces important plasma membrane deformations (Nicot et al., 2007). Regarding the regulation of SR cisternae morphology, mechanisms are less understood. Junctophilin has been described as a potential link between SR cisternae and T-tubules (Takeshima et al., 2000), and as such could be responsible for junctional SR membrane overall structure (Ito et al., 2001). Nevertheless, other proteins are also probably involved in the structure of SR membrane. Our results shed new light on the intrinsic properties of Trisk 95 and on its potential role in the organization of SR terminal cisternae.

We show that, when ectopically expressed, Trisk 95 modifies ER morphology, inducing rope-like structures and large ER sheets. These deformations are a hallmark of the overexpression of proteins responsible for ER morphology (Vedrenne and Hauri, 2006; Shibata et al., 2009; Park and Blackstone, 2010). Indeed,

rope-like structures have been first reported after overexpression of the ER protein Climp-63 (Klopfenstein et al., 1998). Large reticulum sheets have also been observed in cells with imbalanced proportions of Climp-63 and proteins of the reticulon family, which directly regulate the curvature of ER membranes (Shibata et al., 2010). Interestingly, it was shown that Climp-63 also interacts with microtubules (Klopfenstein et al., 1998). More recently, another protein proposed to contribute to ER shape, REEP1, was also shown to directly interact with microtubules (Park et al., 2010). Overexpression of these proteins generates ER membrane deformations, but also increases contact points between ER and microtubules, inducing a co-alignment between rope-like structures and microtubules. We demonstrate here that Trisk 95 expression induces the same phenotype as these proteins regarding ER and microtubule network deformations. Furthermore, Trisk 95 can interact with microtubules, but unlike REEP1 and Climp-63, this interaction is most probably indirect and mediated by its C-terminal luminal part. Our data on Trisk 95 seem to recapitulate phenotypes of proteins involved in the regulation of reticulum membrane morphology and argue in favor of a structural role for Trisk 95 on SR membranes at the triad of muscle cells.

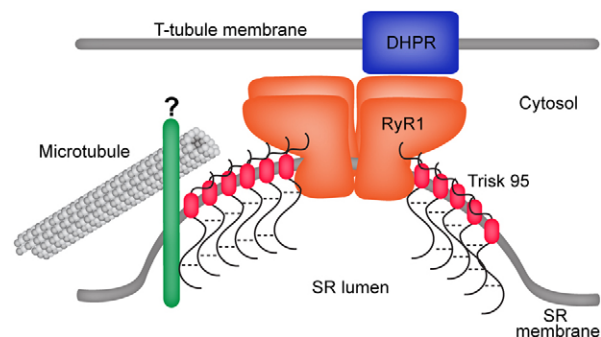
Insights on the molecular mechanisms by which Trisk 95 could play such a role are provided by our exploration of functional domains of the molecule. We first abolished Trisk 95 oligomerization by mutation of its two cysteines, and this drastically reduced ER rope-like structure formation. This reduction could be explained, at least in part, by the modification of the subcellular localization of the mutated protein, a portion of which exiting the ER and reaching the plasma membrane. Interestingly, the morphology of the plasma membrane appeared normal in these cells after expression of this monomeric form of Trisk 95. This could mean that Trisk-95-induced deformations are specific of ER and not of plasma membrane. We have shown that mutations of single cysteines in Trisk 95 reduced by 50% its ability to generate rope-like structure, suggesting that oligomers containing more than two Trisk 95 are required to efficiently modulate ER membrane shape. Of note, proteins that directly modulate ER membrane morphology, like Climp-63, REEP1 and members of the reticulon family, are able to form large oligomers (Klopfenstein et al., 2001; Shibata et al., 2008; Park et al., 2010). Therefore, we hypothesize that oligomeric platforms of Trisk 95 could modify the reticulum membrane shape. Secondly, we showed that deletion of the coiled-coil domain of Trisk 95 reduced the formation of ER rope-like structures. This domain might therefore also be responsible for Trisk 95 molecular properties regarding membrane morphology, by mediating interactions with an ER resident protein, and favoring either membrane deformation or indirect interaction with microtubules. This putative partner of Trisk 95 is currently under investigation.

A role for Trisk 95 in the structure of the triad of skeletal muscle has been recently proposed (Marty et al., 2009). We showed previously that in muscles of mice knocked-out for the triadin gene, the orientation and the shape of the triad are modified (Oddoux et al., 2009). In addition, we showed that Trisk 95 integration into triads was accompanied by a drastic drop in its mobility as measured by FRAP analysis, and suggested that anchoring of Trisk 95 to the triad mediated by its C-terminal luminal part was a prerequisite to the building of the calcium release complex (Cusimano et al., 2009). Our present work

suggests two roles for Trisk 95 at the triad: a bridging of the CRC to external structural cues, like the microtubule network, and a regulation of the SR triad membrane morphology.

First, we show here that Trisk 95 is able to interact with microtubules. Moreover, by confocal microscopy, we observe that some triads are aligned onto muscle cell microtubules, although not all the triads overlap with microtubules. This might reflect that (1) the SR membranes have a limited number of contact points with microtubules, as it is the case for ER membranes in undifferentiated cells (Vedrenne and Hauri, 2006) and (2) microtubule to SR membrane contacts are dynamic and hardly pinpointed in fixed cells. Nevertheless, these experiments argue in favor of a role for the microtubule network in the skeletal muscle E–C coupling, which is so far not studied. Of note, in cardiac muscle, microtubules disruption has already been reported to modulate calcium release (Gomez et al., 2000), and one of the possible roles of microtubules in cardiac E–C coupling could be to deliver proteins of the CRC at the dyads (Hong et al., 2010).

Second, we show in this work that deletion of the coiled-coil domain and the cysteine residues from the luminal part of Trisk 95 increases the mobility of Trisk 95 in muscle triads. This result confirms that these sequences are indeed functional domains of Trisk 95 in muscle cells and might contribute to its anchoring in SR membrane triad. Along these lines, we have previously shown that the shortest triadin isoform Trisk 32, which does not have these domains, is also expressed in skeletal muscle but is mainly localized in longitudinal SR membranes (Vassilopoulos et al., 2005). The coiled-coil domain and the cysteine residues could also contribute to modulate SR membrane shape. A recent study by cryo-electron tomography has shown that the lipid bilayers of the SR immediately surrounding the ryanodine receptor in isolated triads are highly curved (Renken et al., 2009), and this study argues in favor of an interplay between local membrane curvature and RyR1 function. Our immuno-electron microscopy data show that expression of Trisk 95 in the reticulum reduces the diameter of ER luminal space, and this could directly result from an enhanced ER membrane curvature.



**Fig. 8. Working model on the roles of Trisk 95 at the triad in muscle cells.** Trisk 95, depicted with its transmembrane domain in red, is localized in the SR membrane and can bind RyR1 (depicted in orange) both via its N-terminal part and via the KEKE domain in its C-terminal luminal part. It can oligomerize via disulfide bridges (dotted lines), and can also bind an unknown partner (in green), which associates with microtubules (in grey). Oligomerization and indirect association with microtubules might mediate the anchoring of Trisk 95 at the SR junctional cisternae in the triad, and regulate the overall structure of the SR membrane in this region, favoring the coupling of RyR1 with the DHPR (in blue) localized in the T-tubule membrane.

Overall, we propose a working model for the role of Trisk 95 in skeletal muscle E–C coupling (Fig. 8). The oligomerization via disulfide bridging could generate platforms of Trisk 95 at the terminal cisternae of the SR. These oligomers may contribute to the local shaping of the SR membrane, which could regulate RyR1 function. Besides, triadin could mediate, via the coiled-coil domain, an interaction with an unknown SR protein linked to the microtubule network. This indirect link with the microtubules may favor the anchoring of the CRC proteins at the triad.

## Materials and Methods

### DNA constructs, expression vectors and antibodies

Full-length cDNA of rat triadin Trisk 95 inserted into the expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen) has already been described (Marty et al., 2000). To construct Trisk-95-GFP, the stop codon of Trisk 95 in pcDNA3.1 was removed by a PCR-based method, and the amplified sequence was inserted into pEGFP-N1 (Clontech). The various Trisk 95 mutants were generated by site-directed mutagenesis using the Quikchange kit (Stratagene) or by PCR procedures that introduce either premature stop codons or restriction sites used to cut and ligate the modified sequence. DsRed2-ER plasmid was from Clontech. Primary antibodies used in this study are: guinea pig or rabbit polyclonal antibodies (pAbs) against the C-terminus of rat Trisk 95 (Vassilopoulos et al., 2005), rabbit pAb against the N-terminus of Trisk 95 (Vassilopoulos et al., 2005), rabbit pAb against RyR1 (Marty et al., 1994), rabbit pAb against calnexin (Stressgen), mAb TUB 2.1 against  $\beta$ -tubulin (Sigma) and mAb 6.11.B.1 against acetylated tubulin (Sigma). Secondary antibodies used for immunofluorescence studies were coupled to Alexa 488 (Molecular Probes) or to Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Secondary antibodies used for western blotting were HRP-coupled pAbs from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

### Cell culture, transfection, treatment and immunofluorescence microscopy

COS-7 and HEK293 cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen). Transient transfections were carried out with 3  $\mu$ g of DNA using Exgen 500 reagent (Euromedex), according to the manufacturer's protocol. After 28 hours of transfection, cells were fixed for either 6 minutes in cold methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  or for 10 minutes in 4% paraformaldehyde. After paraformaldehyde fixation, cells were permeabilized with 0.05% saponin in PBS. For nocodazole treatment, transfected cells were incubated with 10  $\mu\text{M}$  nocodazole (Sigma) for 30 minutes or 2 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ , and either fixed directly with cold methanol (supplementary material Fig. S3), or lysed for 1 minute at  $30^{\circ}\text{C}$  with OPT buffer (80 mM PIPES, pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5% Triton X-100, 10% glycerol) before fixation for Fig. 2D (Lieuvain et al., 1994). For Taxol treatment, transfected cells were treated with 40  $\mu\text{M}$  Taxol (paclitaxel, Sigma) either immediately after transfection for 24 hours, or the day after transfection for 2 hours, and treated cells were fixed directly with cold methanol. For detection of Trisk 95 or 2C>A mutant of Trisk 95 at the cell surface, cells were fixed with paraformaldehyde and incubated with the guinea pig pAb against the C-terminus of Trisk 95, before being lysed with saponin and incubated with the rabbit pAb to the N-terminus of Trisk 95, and with secondary antibodies. Immunofluorescence preparations were observed under a Leica SPE confocal microscope.

Myoblasts were obtained from hind limb muscles of 2-day-old rats (Sprague-Dawley, Harlan; see below for procedures using animals). The cell-suspension was plated on 0.025% laminin-coated LabTek chambers (Nalge Nunc International). Cells were grown at  $37^{\circ}\text{C}$  at 5%  $\text{CO}_2$ . After 2 days, cells were transfected with lipofectamine-Plus method and induced to differentiate with  $\alpha$ MEM containing 2 mM L-glutamine, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 100 U/ml penicillin, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM dexamethasone, 50 mM hydrocortisone, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (all reagents from Bio-Whittaker) and 5% heat-inactivated horse serum (Biochrom).

### Preparation of mouse muscle fibers for immunofluorescence microscopy

All procedures using animals were approved by the Institutional ethics committee and followed the guidelines of the National Research Council Guide for the care and use of laboratory animals. Flexor Digitorum Brevis (FDB) fibers were dissociated according to a procedure described (Pouvreau et al., 2007). Intact FDB muscles from the hind paw of a 3-month-old wild-type mouse were dissected in a Ringer-glucose solution (136 mM NaCl, 10 mM glucose, 5 mM KCl, 2.6 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, pH 7.2) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Dissected FDB were digested for 30–45 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  in a solution of collagenase (2 mg/ml in Ringer-glucose, Sigma-Aldrich). Muscles were then rinsed for 10 minutes in Ringer-glucose at  $37^{\circ}\text{C}$  and were dissociated by several flushing steps. Dissociated fibers were seeded on laminin-coated slides for 30 minutes at room temperature and were fixed for 6 minutes in cold methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Fibers were permeabilized for 5 minutes with 1% Triton X-100 in PBS at room temperature,

and saturated for 30 minutes with PBS supplemented with 0.1% Triton X-100, 0.5% bovine serum albumin and 2% goat serum. Fibers were then processed for immunofluorescence with antibodies described in the above section. Images of single confocal plane were captured on a Leica SPE confocal microscope.

### Microtubule co-sedimentation assays

HEK293 cells were collected 28 hours after transfection and rinsed once in PBS and once in PEM buffer (PIPES 100 mM pH 6.8, EGTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM) at  $4^{\circ}\text{C}$ . Cells were then lysed for 15 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  in OPT buffer plus protease inhibitors. After three passages through a 29-gauge needle, samples were centrifuged at 20,000  $g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. The supernatant of each sample was collected (Lysate sample, L) and incubated for 45 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  with 40  $\mu\text{M}$  paclitaxel (Sigma), 1 mM GTP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 10  $\mu\text{M}$  pure bovine tubulin (Caudron et al., 2000), to induce microtubule polymerization. Samples were layered onto a glycerol cushion (60% glycerol in PEM buffer) and then centrifuged at 100,000  $g$  for 40 minutes at  $20^{\circ}\text{C}$ . Supernatant (S) over the glycerol cushion was collected before discarding the cushion. Pellet P1 was incubated for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  in PEM buffer supplemented with 5 mM  $\text{CaCl}_2$  and 50 mM KCl, to induce microtubule disassembly before a second ultracentrifugation at 100,000  $g$ , for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  (Fourest-Lieuvain et al., 2006). After this second ultracentrifugation, the supernatant contained free tubulin and microtubule-associated proteins (MT fraction), whilst the pellet P2 corresponded mostly to protein aggregates. Samples were then processed for SDS-PAGE and western blotting.

### Biotinylation of cell surface proteins

To biotinylate cell surface proteins, we used Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Scientific) according to manufacturer's protocol. Briefly, cells transfected with Trisk 95 or 2C>A mutant were washed twice with PBS at pH 8.0 and incubated with 800  $\mu\text{M}$  Sulfo-NHS-SS-Biotin for 30 minutes at room temperature. Cells were then washed with 50 mM Tris at pH 8.0 to quench any non-reacted biotinylation reagent, and with ice-cold PBS at pH 7.4. Cells were lysed with RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) and lysates were incubated with streptavidin-agarose beads (Pierce) to bind biotinylated cell surface proteins. Cell surface protein (Mb) fraction was then separated from intracellular (IC) fraction, which was precipitated with chloroform and methanol. Whole lysates (L), Mb and IC fractions were loaded onto a gradient 5–15% gel for SDS-PAGE and western blotting.

### Electron microscopy

COS-7 cells were transfected either with Trisk 95 or Trisk-95-GFP for 28 hours. For immunogold labeling, cells were fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.3 for 2 hours. Cells were then gently detached using a cell scraper, centrifuged at 1200 r.p.m. for 5 minutes and embedded in 10% gelatine. The cell pellet was then cut in 1  $\text{mm}^3$  pieces. These samples of cells were cryoprotected for 4 hours in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin cryosections of 40 nm were made at  $-120^{\circ}\text{C}$  using an ultra-cryo-microtome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methylcellulose according to the Tokuyasu protocol (Liou et al., 1996). Cryosections were first incubated with a rabbit pAb against GFP (Abcam) or the C-terminus of Trisk 95, and revealed with protein-A-gold particles (CMC, Utrecht). Labeled cryosections were viewed at 80 kV with a 1200EX JEOL TEM microscope and images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus).

For correlative electron microscopy, cells were cultured on a coverslip with a cell locate pattern made of carbon. The transfected cell of interest was localized by confocal microscopy and its position on the pattern was determined. Cells were then fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, for 2 hours at room temperature, washed with cacodylate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hour at  $4^{\circ}\text{C}$ . After extensive washing with water, cells were stained with 1% uranyl acetate, pH 4, for 1 hour at  $4^{\circ}\text{C}$ . Cells were then dehydrated through graded alcohol (30%, 60%, 90%, 100%, 100%, 100%) and infiltrated with a 1:1 mix of Epon to 100% ethanol for 1 hour and incubated in fresh EPON (Flukka) for 3 hours. Finally, a capsule full of Epon was deposited on the surface of the cells and the resin was allowed to polymerize for 72 hours at  $60^{\circ}\text{C}$ . The polymerized block was then detached from the culture plate and ultrathin sections of the cell were cut with an ultramicrotome (Leica). Sections were post-stained with 4% uranyl acetate and 0.4% lead citrate before being observed under a transmission electron microscope at 80 kV as above.

### FRAP on differentiated rat myotubes

FRAP experiments were performed by using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope. Cells were imaged in LabTek chambers in medium containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM HEPES, and 0.4 mM EGTA. A  $63\times 1.4$  NA Plan-Apochromat oil immersion objective (Zeiss) was used with a pinhole aperture of 4.96 Airy units. GFP was excited at 488 nm with an argon laser with low laser power (0.5%) and

emitted fluorescence collected with a long-pass 505 emission filter. After acquisition of ten prebleach images, photobleaching of GFP in a circular area 1.08  $\mu\text{m}$  in diameter was performed by using the argon laser lines 458, 477 and 488 nm at 50% laser power and 50% transmission. Recovery of fluorescence in the bleached region was recorded every 50 mseconds over a period of 1–10 minutes until fluorescence level reached a plateau. Fluorescence intensities were acquired for the bleached region ( $I_{\text{frap}}$ ), the whole cell ( $I_{\text{whole}}$ ), and a background region ( $I_{\text{base}}$ ). The data were low-pass  $3 \times 3$  filtered with the Zeiss LSM 510 software for image noise reduction, and data analysis was performed by using macros designed in IgorPro software (WaveMetrics). The average fluorescence intensity within the bleached region was normalized to prebleach intensity for each time point and corrected for loss of fluorescence during acquisition. Fluorescence loss during acquisition was no more than 10%. The normalized data were fitted by the exponential equation:  $I_{\text{frap-est}}(t) = A(1 - e^{-t/\tau})$ , where  $A$  represents the mobile fraction. Fitting quality was evaluated by the probability  $Q$  value and accepted when  $Q > 0.01$ . Statistical analyses were performed by using Instat Software (GraphPad).

#### Quantifications and statistics

Relative expression levels of Trisk 95 in cells were quantified on single focal plane images taken with a Leica SPE confocal microscope, by tracing the entire outline of the Trisk-95-labeled ER and measuring the average fluorescence intensities for each outline using ImageJ software (version 1.44i, NIH). A total of 45 cells from two separate experiments were quantified (Fig. 1B). Thickness of the Trisk-95-associated tubules and of the control ER was measured on electron microscopy images by using the morphometric tool of the iTEM software. At least 40 transfected and non-transfected cells were quantified on four non-consecutive ultrathin cryosections. For quantifications in Figs 2,4,5, non-transfected cells (control) or transfected cells presenting one peculiar phenotype, e.g. disorganized microtubules or ER rope-like structures, were directly counted under a fluorescence Leica microscope. At least three separate experiments were performed, and at least 200 cells were counted in each experiment. For quantifications in Fig. 7, see above section on FRAP studies. Statistics were performed using Student's  $t$ -test on Prism 4.0 software (GraphPad), with  $n$  = number of cells in Fig. 1B, number of experiments in Figs 2,4,5 and number of clusters in Fig. 7.

#### Acknowledgements

We thank Melina Petrel for technical help.

#### Funding

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

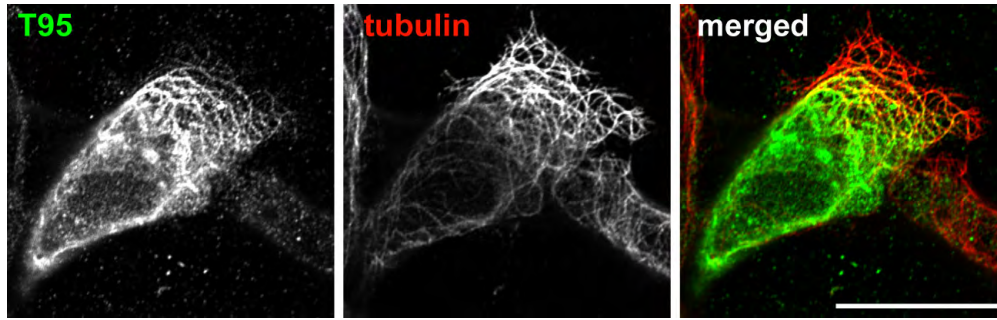
Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.100958/-/DC1>

#### References

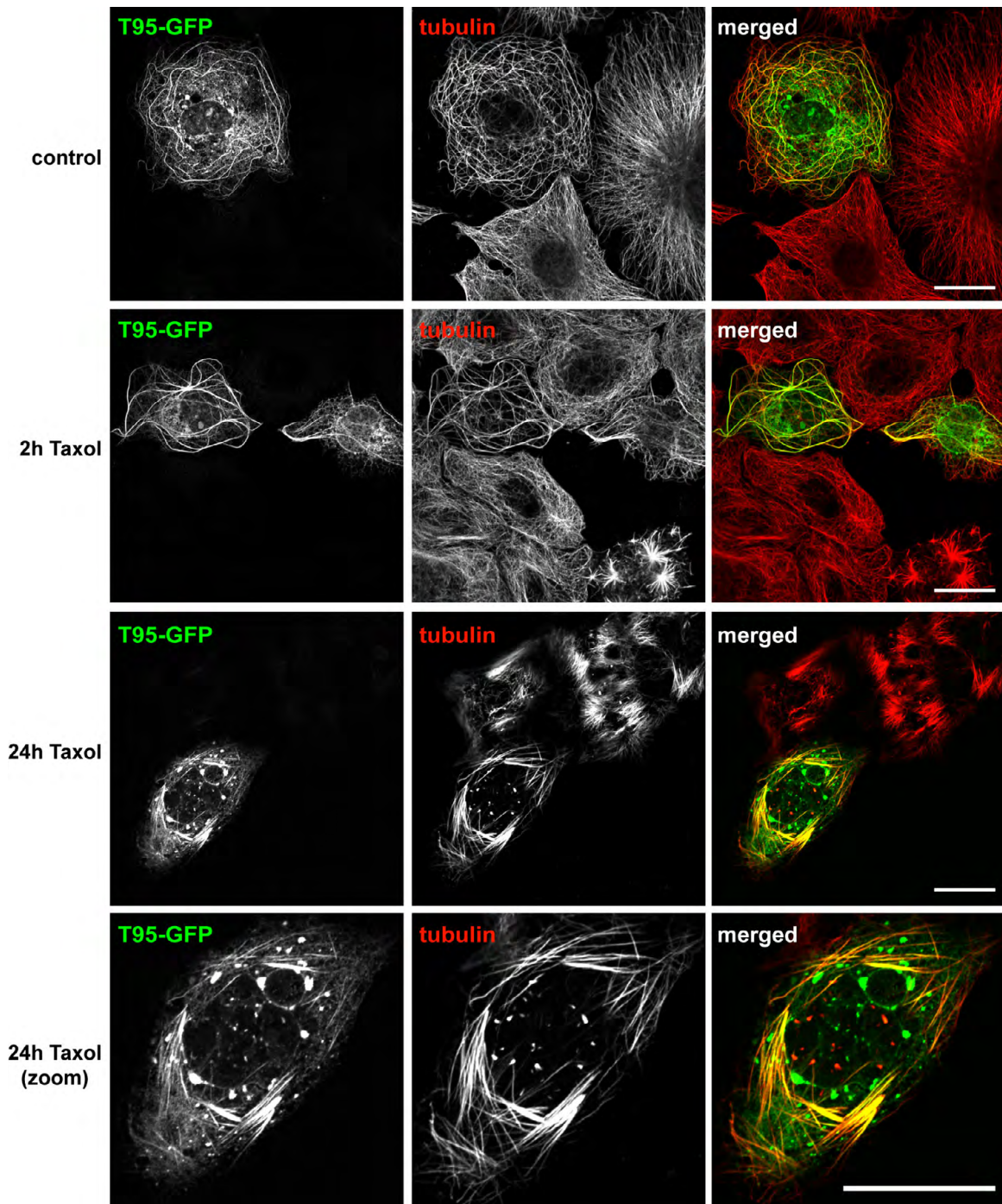
- Block, B. A., O'Brien, J. and Meissner, G. (1994). Characterization of the sarcoplasmic reticulum proteins in the thermogenic muscles of fish. *J. Cell Biol.* **127**, 1275–1287.
- Brandt, N. R., Caswell, A. H., Wen, S. R. and Talvenheimo, J. A. (1990). Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J. Membr. Biol.* **113**, 237–251.
- Caudron, N., Valiron, O., Usson, Y., Valiron, P. and Job, D. (2000). A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro. *J. Mol. Biol.* **297**, 211–220.
- Cusimano, V., Pampinella, F., Giacomello, E. and Sorrentino, V. (2009). Assembly and dynamics of proteins of the longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4695–4700.
- Felder, E., Protasi, F., Hirsch, R., Franzini-Armstrong, C. and Allen, P. D. (2002). Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys. J.* **82**, 3144–3149.
- Flucher, B. E. (1992). Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev. Biol.* **154**, 245–260.
- Flucher, B. E. and Franzini-Armstrong, C. (1996). Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8101–8106.
- Flucher, B. E., Phillips, J. L., Powell, J. A., Andrews, S. B. and Daniels, M. P. (1992). Coordinated development of myofibrils, sarcoplasmic reticulum and transverse tubules in normal and dysgenic mouse skeletal muscle, in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* **150**, 266–280.
- Fourrest-Lieuvain, A., Peris, L., Gache, V., Garcia-Saez, I., Juillan-Binard, C., Lantze, V. and Job, D. (2006). Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1041–1050.
- Froemming, G. R., Murray, B. E. and Ohlendieck, K. (1999). Self-aggregation of triadin in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1418**, 197–205.
- Gómez, A. M., Kerfant, B. G. and Vassort, G. (2000). Microtubule disruption modulates Ca(2+) signaling in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* **86**, 30–36.
- Hong, T. T., Smyth, J. W., Gao, D., Chu, K. Y., Vogan, J. M., Fong, T. S., Jensen, B. C., Colecraft, H. M. and Shaw, R. M. (2010). BIN1 localizes the L-type calcium channel to cardiac T-tubules. *PLoS Biol.* **8**, e1000312.
- Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura, K. and Takeshima, H. (2001). Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* **154**, 1059–1068.
- Kim, K. C., Caswell, A. H., Talvenheimo, J. A. and Brandt, N. R. (1990). Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* **29**, 9281–9289.
- Klopfenstein, D. R., Kappeler, F. and Hauri, H. P. (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J.* **17**, 6168–6177.
- Klopfenstein, D. R., Klumperman, J., Lustig, A., Kammerer, R. A., Oorschot, V. and Hauri, H. P. (2001). Subdomain-specific localization of CLIMP-63 (p63) in the endoplasmic reticulum is mediated by its luminal alpha-helical segment. *J. Cell Biol.* **153**, 1287–1300.
- Kobayashi, Y. M., Alseikhan, B. A. and Jones, L. R. (2000). Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.* **275**, 17639–17646.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G. C., Farsad, K., Wenk, M. R. and De Camilli, P. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193–1196.
- Lee, J. M., Rho, S. H., Shin, D. W., Cho, C., Park, W. J., Eom, S. H., Ma, J. and Kim, D. H. (2004). Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor are involved in the interaction with triadin. *J. Biol. Chem.* **279**, 6994–7000.
- Lieuvain, A., Labbé, J. C., Dorée, M. and Job, D. (1994). Intrinsic microtubule stability in interphase cells. *J. Cell Biol.* **124**, 985–996.
- Liou, W., Geuze, H. J. and Slot, J. W. (1996). Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem. Cell Biol.* **106**, 41–58.
- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., De Jongh, K., Lai, Y., Catterall, W. A. and Ronjat, M. (1994). Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2270–2274.
- Marty, I., Robert, M., Ronjat, M., Bally, I., Arlaud, G. and Villaz, M. (1995). Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* **307**, 769–774.
- Marty, I., Thevenon, D., Scotto, C., Groh, S., Sainnier, S., Robert, M., Grunwald, D. and Villaz, M. (2000). Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J. Biol. Chem.* **275**, 8206–8212.
- Marty, I., Fauré, J., Fourrest-Lieuvain, A., Vassilopoulos, S., Oddoux, S. and Brocard, J. (2009). Triadin: what possible function 20 years later? *J. Physiol.* **587**, 3117–3121.
- Nicot, A. S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Pettersson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J. M., Biancalana, V., Oldfors, A. et al. (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **39**, 1134–1139.
- Oddoux, S., Brocard, J., Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, J., Fauré, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J. et al. (2009). Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J. Biol. Chem.* **284**, 34918–34929.
- Paolini, C., Quarta, M., Nori, A., Boncompagni, S., Canato, M., Volpe, P., Allen, P. D., Reggiani, C. and Protasi, F. (2007). Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J. Physiol.* **583**, 767–784.
- Park, S. H. and Blackstone, C. (2010). Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. *EMBO Rep.* **11**, 515–521.
- Park, S. H., Zhu, P. P., Parker, R. L. and Blackstone, C. (2010). Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J. Clin. Invest.* **120**, 1097–1110.
- Pouvreau, S., Royer, L., Yi, J., Brum, G., Meissner, G., Ríos, E. and Zhou, J. (2007). Ca(2+) sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5235–5240.
- Prins, K. W., Humston, J. L., Mehta, A., Tate, V., Ralston, E. and Ervasti, J. M. (2009). Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J. Cell Biol.* **186**, 363–369.
- Ralston, E., Lu, Z. and Ploug, T. (1999). The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J. Neurosci.* **19**, 10694–10705.
- Realini, C., Rogers, S. W. and Rechsteiner, M. (1994). KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett.* **348**, 109–113.
- Renken, C., Hsieh, C. E., Marko, M., Rath, B., Leith, A., Wagenknecht, T., Frank, J. and Mannella, C. A. (2009). Structure of frozen-hydrated triad junctions: a case study in motif searching inside tomograms. *J. Struct. Biol.* **165**, 53–63.
- Rezgui, S. S., Vassilopoulos, S., Brocard, J., Platel, J. C., Bouron, A., Arnoult, C., Oddoux, S., Garcia, L., De Waard, M. and Marty, I. (2005). Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* **280**, 39302–39308.
- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J. R., Jones, L. R., Kobayashi, Y. M., Wang, Y., Kerrick, W. G., Caswell, A. H., Potter, J. D., Miller, T. et al. (2007).

- Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **282**, 37864-37874.
- Shibata, Y., Voss, C., Rist, J. M., Hu, J., Rapoport, T. A., Prinz, W. A. and Voeltz, G. K.** (2008). The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **283**, 18892-18904.
- Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M. M. and Rapoport, T. A.** (2009). Mechanisms shaping the membranes of cellular organelles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 329-354.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W. A., Palazzo, A. F., Kozlov, M. M. and Rapoport, T. A.** (2010). Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* **143**, 774-788.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M. and Kangawa, K.** (2000). Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol. Cell* **6**, 11-22.
- Thevenon, D., Smida-Rezgui, S., Chevessier, F., Groh, S., Henry-Berger, J., Beatriz Romero, N., Villaz, M., DeWaard, M. and Marty, I.** (2003). Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 669-675.
- Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Rezgui, S. S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., Dewaard, M. and Marty, I.** (2005). Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **280**, 28601-28609.
- Vedrenne, C. and Hauri, H. P.** (2006). Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic* **7**, 639-646.
- Wang, Y., Li, X., Duan, H., Fulton, T. R., Eu, J. P. and Meissner, G.** (2009). Altered stored calcium release in skeletal myotubes deficient of triadin and junctin. *Cell Calcium* **45**, 29-37.

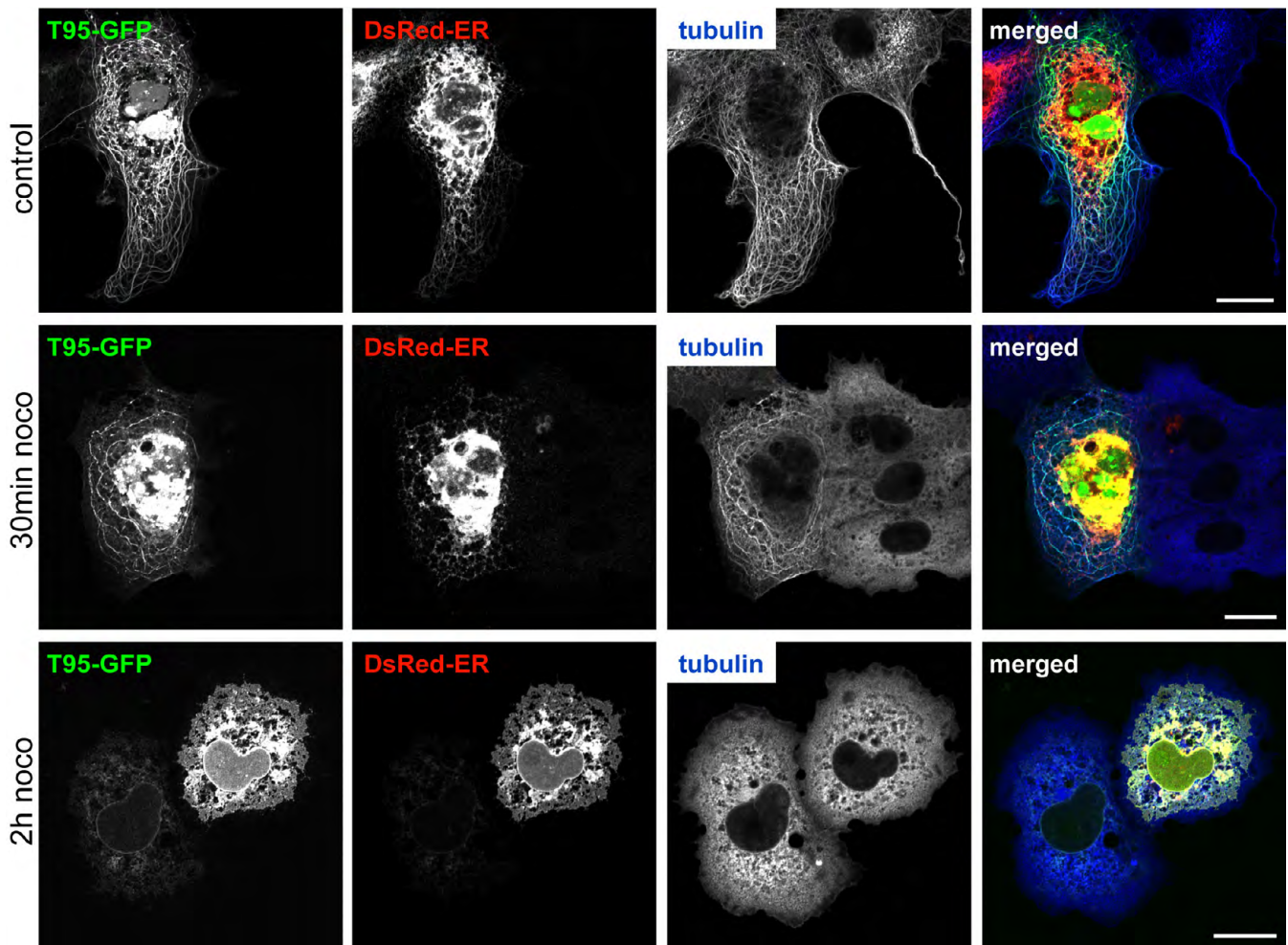


**Fig. S1.** As COS-7 cells, HEK293 cells exhibit ER rope-like structures when transfected with Trisk 95, and these rope-like structures co-align with microtubules. Trisk 95 was expressed in HEK293 cells and cells were co-stained with Abs to Trisk 95 (green) and beta tubulin (red). Bar, 20  $\mu$ m.

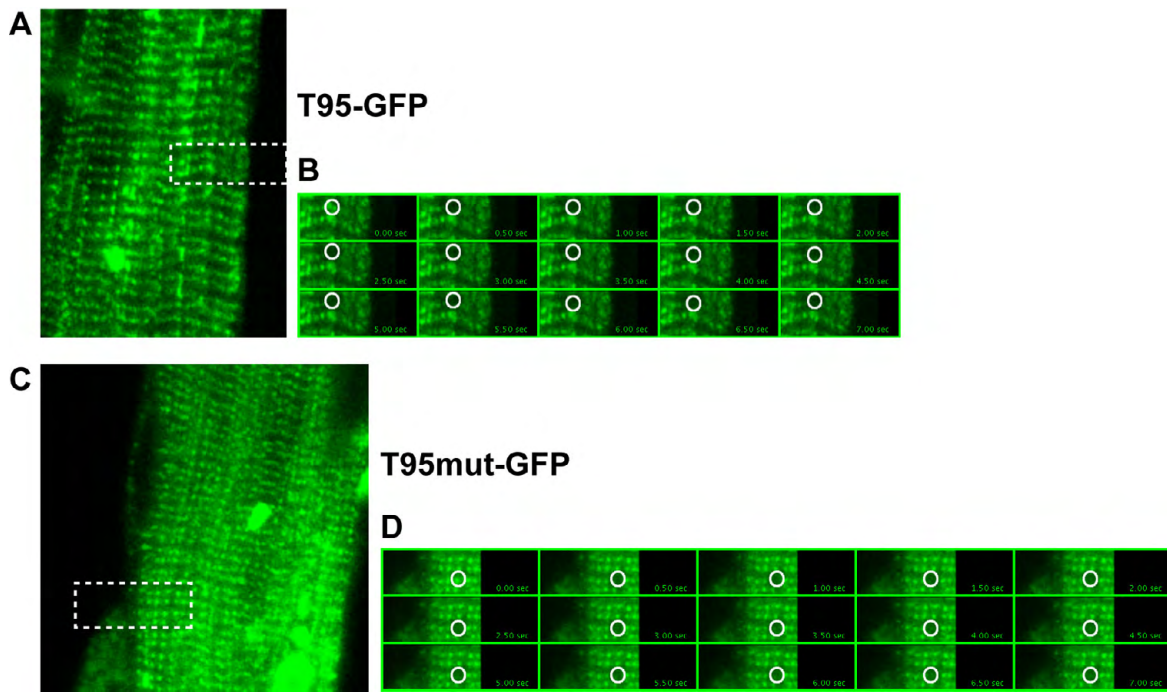




**Fig. S2.** The shape of ER rope-like structures is affected by Taxol, a microtubule stabilizer. COS-7 cells were transfected with Trisk 95-GFP (green) and were either not treated (control, first row), or were treated immediately after transfection for 24h (24h Taxol, third and fourth row), or were treated the day after transfection for only 2h (2h Taxol, second row). After fixation, cells were stained with an Ab to  $\beta$  tubulin (red). Bars, 20  $\mu$ m.



**Fig. S3.** ER rope-like structures only partly colocalize with ER compartments labeled with DsRed-ER. Further, these rope-like structures resist ER collapsing for at least 30\_min of nocodazole treatment. COS-7 cells were co-transfected with Trisk 95-GFP (green) and DsRed-ER (red) and were either not treated (control, first row), or were treated the day after transfection for 30\_min (30min noco, second row) or 2h (2h noco, third row). After fixation, cells were stained with an Ab to  $\beta$  tubulin (blue). Bars, 20\_  $\mu$ m.



**Fig. S4.** FRAP experiments on T95-GFP and T95mut-GFP. (A) A 12-days differentiated myotube transfected with T95-GFP (Trisk 95-GFP). Dashed box indicates the region of interest (ROI) selected for FRAP analysis. (B) A typical FRAP experiment is shown. Fluorescence is recovered at 0.05 sec intervals. The white circle indicates the bleached ROI. Images are shown before and after bleaching. (C) and (D) as in (A) and (B), except that myotube was transfected with T95mut-GFP (Trisk 95  $\Delta$ 306–341 2C>A-GFP).

*Le manuscrit joint dans cette thèse correspond à la version de l'article en cours de préparation au 1<sup>er</sup> septembre 2015. Des modifications sont encore à réaliser.*

# **A link between microtubules and triads in muscle cells: role of triadin and CLIMP-63**

**Alexis Osseni, Muriel Sebastien, Yohann Couté, Julien Fauré, Anne Fourest-Lieuvin & Isabelle Marty.**

## Introduction

Skeletal muscle contraction is initiated by a burst of calcium out of its major store, the sarcoplasmic reticulum. This rise in intracellular calcium concentration is triggered by an action potential which propagates along the plasma membrane and reaches invaginations called transverse tubules. Transverse tubules (T-tubules) make close and periodic contacts with the sarcoplasmic reticulum (SR) to form peculiar membrane structures called triads. Triads, formed by the tight apposition of 2 terminal cisternae of SR on both sides of a T-tubule, are specifically localized at the A-I bands transition in mammalian skeletal muscle, on both side of the Z-line. Triads are therefore highly organized membrane structures, precisely distributed in muscle fiber. The transformation of an action potential into a massive calcium release, a process called the Excitation-Contraction (EC) coupling, is performed by a macromolecular complex, the Calcium Release Complex (CRC). The main players of CRC are the dihydropyridine receptor (DHPR), a L-type calcium channel of the T-tubules membrane and the ryanodine receptor (RyR1), the sarcoplasmic reticulum calcium channel, both in physical interaction (Block BA et al, J Cell Biol 1988 (**107**, 2587-2560); Marty et al, PNAS 1994) With its two main members anchored in two different membranes, the correct function of the CRC complex relies on the precise alignment of these two membranes, and therefore on the formation and maintenance of triads. A number of proteins associate with either the DHPR or the RyR1 receptors and regulate their activity. Among them is the triadin. Triadin is a multi-protein family, with four isoforms, Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 and Trisk 32, which arise of the alternative splicing of a unique gene, the *TRDN* gene. Triadins are specifically expressed in striated muscles, Trisk 95 and Trisk 51 being the major skeletal muscle isoforms and Trisk 32 a minor skeletal muscle but the major (if not the only) cardiac isoform {Marty, 2014 #372}. Triadins are type II transmembrane proteins that are completely identical in their cytosolic and transmembrane domains. They diverge by the length of their luminal domain and their C-terminal end. They are localized in the SR membrane, and are associated to RyR1 at the skeletal muscle triad, or to RyR2 at the cardiac dyad {Marty, 2014 #372}. Mutations in the *TRDN* gene have been implicated in severe human cardiac arrhythmia with sudden death {Roux-Buisson, 2012 #61}.

We showed previously that triadins, or at least Trisk 95, can shape reticulum membranes and, therefore, could have a role in the overall structure of SR cisternae at the triad (Fourest-Lieuvain et al, 2012). In addition, the absence of all forms of triadins in triadin-KO mice led to deformations of part of the triads {Oddoux, 2009 #11}, as observed by electron microscopy. These mice exhibited also a reduction in the amount of calcium stored in SR cisternae, associated with a reduced efficiency in EC coupling and muscle strength {Oddoux, 2009 #11; Shen, 2007 #370}. We hypothesized that the reticulum membrane shaping properties of triadins may favor the coupling of RyR1 with the DHPR.

When expressed in cultured cells like COS-7 cells, Trisk 95 by itself induces a striking alteration of the endoplasmic reticulum (ER) morphology with the apparition of ER-rope like structures (RLS), together with modifications of the microtubule (MT) network morphology and dynamics {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. These observations point to the existence of a link between triadin and MTs. However, this link is indirect, as we observed that Trisk 95 domains implicated in its shaping properties are luminal {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. Therefore, there must be in ER or SR membrane another transmembrane protein able to bind Trisk 95 luminal domains on the one hand, and MTs on the other hand.

In the present study, using a proteomic approach, we identified CLIMP-63 as a Trisk 95 partner. CLIMP-63 (63 kDa cytoskeleton-linking membrane protein, also known as CKAP4 for cytoskeleton-

associated protein 4) is an ubiquitous ER transmembrane protein which binds microtubules and therefore creates a link between reticulum and the microtubules network {Klopfenstein, 1998 #368;Vedrenne, 2006 #332}. This protein was discovered in the early 1990s by two groups working on very different topics {Mundy, 1992 #377;Schweizer, 1993 #380}, foreshadowing that it is a protein with many functions. CLIMP-63 is a non-glycosylated type II transmembrane protein present only higher eukaryotes, where it is ubiquitously expressed in all the tissues. It has been described both in the plasma membrane, where it could play a role as a surface receptor {Sandoz, 2015 #381}, and in the ER membrane, more specifically concentrated in ER sheets where it would have the role of a luminal spacer {Klopfenstein, 2001 #366;Shibata, 2010 #382}.After having characterized the molecular association between Trisk 95 and CLIMP-63, we show that this protein pair anchors the triads onto the microtubule network in muscle cells.

## Results

### CLIMP-63 as a putative partner for triadin Trisk 95

To seek for a protein able to perform the link between Trisk 95 and MTs, we identified the proteins associated to Trisk 95 using co-immunoprecipitation coupled to MS-based proteomics. Trisk 95-GFP or GFP as a control were expressed in HEK293 cells. After immunoprecipitation (IP) performed with anti-GFP antibodies, the proteins present in IP eluates were digested with trypsin. The resulting peptides were then analyzed by nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). Differential screening allowed us to identify proteins enriched in the Trisk 95 IP (Table S1). From these potential binding partners, we selected those that could bind MTs and focused our attention on CLIMP-63 (Cytoskeleton-Linking Membrane Protein, 63 kDa, CKAP4\_HUMAN), a type II reticulum transmembrane protein whose function is to shape and anchor the reticulum onto the MT network. CLIMP-63 binds MTs via its N-terminal cytosolic domain, and exhibit a long intraluminal coiled-coil domain {Klopfenstein, 2001 #366; Vedrenne, 2006 #332}. It is an ubiquitous protein expressed both in cell line and in muscle cells. Furthermore, CLIMP-63 has been described to induce ER rope-like structures (RLS) when over-expressed in cultured cells {Vedrenne, 2006 #332; Klopfenstein, 1998 #368}, which is the same phenotype as the one observed for Trisk 95 over-expression {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. Therefore, we raised the hypothesis that CLIMP-63 could be the missing link between triadin and the MT network.

### Expressed Trisk 95 associates with endogenous CLIMP-63 in cell lines.

Because we showed that Trisk 95 could induce ER membrane deformation and MT network disorganization when expressed in COS-7 cells, we wondered whether CLIMP-63 would be associated with these Trisk 95-induced phenotypes. COS-7 cells were transfected with Trisk 95 and immunolabeled for triadin, CLIMP-63 and tubulin. In control non-transfected cells, endogenous CLIMP-63 was localized in the reticular domain of the ER and MTs exhibited a normal radial pattern (Fig. 1A, cell 1). In Trisk 95-transfected cells, the ER was altered with the formation of rope-like structures (RLS), and CLIMP-63 co-localized with Trisk 95 in these RLS (Fig. 1A, cell 2). In addition, MT arrays were disorganized and co-aligned with the ER-RLS (Fig. 1A, cell 2). Hence, Trisk 95 expression could induce CLIMP-63 and MT redistribution, suggesting a connection between the three.

In HEK293 cells, CLIMP-63 was co-immunoprecipitated with Trisk 95-GFP, as shown by the mass spectrometry analyses performed on Trisk 95-GFP IP. To ascertain that CLIMP-63 was able to co-immunoprecipitate with Trisk 95 without the GFP moiety, Trisk 95 was expressed in HEK293 cells and an IP was performed with an anti-CLIMP-63 antibody. Results showed that Trisk 95 was present in CLIMP-63 co-IP fraction (Fig. 1B, lane 4). These co-localization and co-IP experiments show that CLIMP-63 can bind Trisk 95 in cell lines. We next wondered which regions of both proteins were responsible for this interaction.

### The luminal domain of Trisk 95 is involved in the association with CLIMP-63.

In order to identify the interacting domain in Trisk 95, we generated different deletion mutants (Fig. 2A): i) a mutant without the cytosolic N-terminal domain ( $\Delta$ cyto-T95), ii) a mutant without the cytosolic and transmembrane domains but with ER targeting and retention sequences (T95-Lumen), iii) a mutant without most of the luminal domain (T95-mini), and finally iv) a mutant in which specific sequences responsible for RLS phenotype have been removed (T95- $\Delta$ RLS). In these experiments,



wild-type CLIMP-63 (CLIMP, Fig. 2A) was co-transfected with all the above deletion mutants. As previously described ({Klopfenstein, 1998 #368}), CLIMP-63 by itself induced ER deformation in 78% of the transfected cells (Fig. S1.). When CLIMP-63 was co-transfected with Trisk 95 (T95),  $\Delta$ cyto-T95 or T95-Lumen, the cells exhibiting RLS showed a perfect co-localization between CLIMP-63 and Trisk 95 proteins in these ER structures (Fig. 2B, panels a-c and quantifications in Fig. 2C). In contrast, cells co-transfected with CLIMP-63 and either T95-mini or T95- $\Delta$ RLS exhibited RLS but the Trisk 95 mutants were not localized in these RLS (Fig. 2B, panels d-e and quantifications in Fig. 2C). To assess these immunofluorescence results, a series of immunoprecipitations were performed showing that T95 and  $\Delta$ cyto-T95 could co-immunoprecipitate CLIMP-63 whereas T95- $\Delta$ RLS or T95-mini could not (Fig. 2D and E). These experiments demonstrate that the luminal domain of Trisk 95 is responsible for association with CLIMP-63.

Triadin is a family with different members, differing only by their luminal domains (Fig. 2G). To see whether other triadin isoforms associate with CLIMP-63, HEK293 cells were transduced with different adenoviral vectors encoding the different isoforms and IPs were performed with an antibody against the common N-terminal end of triadin. In each case, CLIMP-63 was co-immunoprecipitated, indicating that all the triadin isoforms are able to interact with CLIMP-63 (Fig. 2F).

### **As for Trisk 95, the luminal domain of CLIMP-63 is responsible for the association between the two proteins.**

To study domains of CLIMP-63 involved in the interaction, two mutant forms of CLIMP-63 were used (Fig. 3A): the first one with the luminal part replaced by the GFP protein (referred to as CLIMP- $\Delta$ lumen), the second one with the cytoplasmic part replaced by the GFP protein ( $\Delta$ cyto-CLIMP). When Trisk 95 was co-transfected with either of the mutant forms of CLIMP-63, none of the co-transfected cells exhibited RLS (Fig. S1). Nevertheless,  $\Delta$ cyto-CLIMP co-localized with Trisk 95 in the ER, while CLIMP- $\Delta$ lumen did not (Fig. 3B). Therefore, the luminal domain of CLIMP-63 seemed important for CLIMP-63 / Trisk 95 interaction. This was confirmed by IP performed on HEK293 cells transduced with an adenovirus encoding Trisk 95 and transfected with either CLIMP- $\Delta$ lumen or  $\Delta$ cyto-CLIMP. As expected, Trisk 95 was co-immunoprecipitated with  $\Delta$ cyto-CLIMP (Fig. 3C, lane 4) and was absent from the IP of CLIMP- $\Delta$ lumen (Fig. 3C, lane 3). Hence, the connection between CLIMP-63 and Trisk 95 involves their respective luminal domains.

### **The RLS-phenotype induced by Trisk 95 depends on the capacity of CLIMP-63 to bind MTs.**

When expressed in cell lines, Trisk 95 induces ER deformations, the RLS, which are concomitant with MT array disorganization. Because it seems from the above results that Trisk 95 binds to MTs via CLIMP-63, we hypothesized that the capacity of Trisk 95 to form RLS was due to its ability to bind and recruit CLIMP-63. To test this hypothesis, endogenous CLIMP-63 was knocked down by RNA interference (RNAi) in COS-7 cells before transfection of the cells with Trisk 95, and the extent of Trisk 95-induced RLS was evaluated. The siRNA used (CLIMP-KD) was able to lower the amount of CLIMP-63 by 70 % as previously described {Nikonov, 2007 #367} (Fig. S2A, B and C), but this was not enough to abolish the presence of Trisk 95-induced ER deformation (Fig. S2D and E). As an alternative approach, a mutant form of CLIMP-63 was used, referred to as CLIMP-MT(-) because of its inability to bind to MTs () {Vedrenne, 2005 #62}. This mutant is phospho-mimetic, with four phospho-regulated sites mutated for glutamic acids in the cytosolic domain of the protein. As a

control, a phospho-deficient mutant of CLIMP-63 was used. This mutant, referred to as CLIMP-MT(+), is always bound to MTs and has three phospho-sites mutated for alanine residues {Vedrenne, 2005 #62}. Trisk 95 was co-expressed in COS-7 cells with either CLIMP-MT(-) or CLIMP-MT(+) and the formation of RLS was quantified. Hundred percent of the cells co-transfected by CLIMP-MT(+) and Trisk 95 exhibited RLS (Fig. 4B, upper panel, and 4C). At the opposite, cells co-expressing CLIMP-MT(-) and Trisk 95 never exhibited RLS (Fig. 4B, lower panel, and 4C). Rather, these cells presented a fenestrated reticulum that did not resemble RLS, and MT arrays in these cells appeared normal. This absence of RLS was not due to the incapacity of Trisk 95 to bind to the CLIMP-MT(-) mutant, as shown by co-IP experiments (Fig. 4D, lane 5): indeed, IP of CLIMP-MT(-) is still able to induce the co-IP of Trisk 95. Hence, CLIMP-MT(-), being unable to bind MTs, acted as a dominant negative mutant and abolished the capacity of Trisk 95 to induce RLS. This experiment shows that the ER remodeling induced by Trisk 95 was dependent on the ability of CLIMP-63 to bind MTs, but that the Trisk 95-CLIMP-63 interaction is not dependent on the CLIMP-63-MTs interaction.

### **In muscle fibers, CLIMP-63 partially co-localized with Trisk 95.**

After the detailed characterization of the interaction between Trisk 95 and CLIMP 63 in cell lines, we examined the situation in skeletal muscle. We performed immunofluorescence stainings of CLIMP-63 and Trisk 95 in isolated rat *flexor digitorum brevis* (FDB) muscles fibers (Fig. 5A). Triads labeled by the anti-Trisk 95 antibody showed characteristic double rows of dots (Fig. 5A, red). CLIMP-63 also appeared as dots with a striated pattern (Fig. 5A, green). A partial overlap between the stainings of Trisk 95 and CLIMP-63 could be detected on the merged image as yellow dots (Fig. 5A), and could be better seen at higher magnification (Fig. 5A, zoom) and on the line scan performed on this zoom (Fig. 5B). An object-based co-localization analysis was performed with ImageJ software. The binary mask image (Fig. 5A) shows the co-localized points between the green and the red stainings and is used for the quantification in Fig. 5C:  $41 \pm 1.7$  % of the dots of CLIMP-63 are co-localized with Trisk 95 in rat and  $39 \pm 1.4$  % in mouse. Thus, CLIMP-63 is only partially co-localized with Trisk 95, which reflects the fact that CLIMP-63 is a reticulum protein present in the whole SR whereas Trisk 95 is specifically located at the triads, a sub-domain of the SR. Finally, immunoprecipitation was performed on mouse muscle homogenates with an antibody against Trisk 95. As shown in Fig. 5D, lane 2, CLIMP-63 was co-immunoprecipitated with endogenous Trisk 95 from these muscle extracts. Altogether, these experiments show that, as observed in non-muscle cell lines, CLIMP-63 is also a partner of Trisk 95 in muscle fibers.

### **CLIMP-63 triad localization is altered in triadin KO muscles.**

As a partner of Trisk 95, CLIMP-63 may be specifically localized at the triad by Trisk 95. Therefore, the localization of CLIMP-63 was studied in FDB fibers of triadin KO mice, devoid of all isoforms of triadin. Triads were stained using an anti-RyR1 antibody. In triadin KO FDBs, RyR1 staining was unmodified compared to wild type (WT) mice, exhibiting a double row of dots, but CLIMP-63 staining was sparser and less well co-localized with triads (Fig. 6A and B, lower panels).

Quantification of the relative amount of CLIMP-63 co-localized with RyR1 in WT and triadin KO muscles showed a significant reduction from  $39 \pm 1.4$  % in WT to  $26 \pm 0.7$  % in KO muscles (Fig. 6C). Immunoprecipitations were performed using anti-RyR1 antibody on WT and triadin KO muscle homogenates, and the immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot. Whereas in WT muscle, immunoprecipitation of RyR1 resulted in the co-immunoprecipitation of both Trisk 95 and CLIMP-63, both proteins were absent in the IP made from triadin KO muscle (Fig 6D). Therefore, in

the absence of Trisk 95, CLIMP-63 triad localization was reduced, and CLIMP-63 was not associated to the calcium release complex, highlighting the link between these two proteins in muscles.

### **The co-alignment between microtubules and triads is reduced in triadin KO muscles.**

We have previously shown that in skeletal muscle some MT bundles come in close proximity to triads {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. Because the protein pair Trisk 95 / CLIMP-63 is most probably involved in the link between triads and MTs, we looked at MTs in triadin KO isolated muscle fibers. As shown in Fig. 7, MT bundles often co-aligned with double rows of RyR dots, i.e. triads, in WT FDBs. In triadin KO muscle fibers, MTs were less organized (Fig. 7A and B, lower panels) and quantification of the percentage of MTs co-localized with RyR1 is significantly reduced from  $38 \pm 0.6$  % in WT animals to  $23 \pm 1.1$  % in triadin KO mice (Fig. 7C). This 40% reduction in the co-alignment between triads and MTs confirmed that the absence of the pair Trisk 95 / CLIMP-63 could have morphological consequences and induces a disruption of the link between triads and MTs in muscle cells.

## Discussion

Sarcoplasmic reticulum is an organelle with a central role in skeletal muscle contraction. It is organized in subdomains, the longitudinal SR and the terminal cisternae, which have different functions and different organizations. The terminal cisternae in association with the T-Tubule form the triads which play a major role in excitation-contraction coupling, being the site of calcium release, whereas the longitudinal SR is dedicated to calcium re-uptake. The mechanisms leading to the formation and maintenance of these subdomains are unknown, as well as the mechanisms leading to the exclusive localization of proteins of the calcium release complex at the triads. In this study we identified CLIMP-63 as a partner for triadin in muscle cells, involved in the link between triads and the muscle MT network. In normal triads, SR cisternae which are subdomains of the SR, appear as small rounded bags on electron microscopy images. In triadin KO mouse muscles the SR cisternae are flattened, which has been attributed to calsequestrin deletion but could also reflect the involvement of triadin in SR cisternae morphology {Oddoux, 2009 #11}. This has been objectified in another of our previous studies: ectopic expression of Trisk 95 in COS-7 cells caused the rearrangement of both the ER and MTs, leading to the formation of ER rope-like structures, the RLS, co-aligned with bundles of MTs {Fourest-Lieuvin, 2012 #364}. These phenotypes demonstrated that Trisk 95 had shaping properties both on the reticulum membranes and on MTs. However, as the shaping properties were due to the luminal domain of Trisk 95, the link between this triadin and MTs was not clear and we hypothesized that there may necessarily be another protein between the ER/SR-anchored triadin and the MT network.

This protein is now identified as CLIMP-63, ER membrane, more specifically concentrated in ER sheets where it would have the role of a luminal spacer {Klopfenstein, 2001 #366; Shibata, 2010 #382}. Indeed, the luminal segments of CLIMP-63 molecules of opposing ER sheet membranes may bind to each other in an antiparallel manner {Klopfenstein, 2001 #366}. This arrangement would keep the luminal mean width of ER sheets at 50nm {Shibata, 2010 #382}.

CLIMP-63 has been abundantly studied in cultured mono-nucleated cells {Vedrenne, 2006 #332} as well as in neuronal cells {Cui-Wang, 2012 #383; Farah, 2005 #384}. Our study is the first description of CLIMP-63 in mature muscle fibers. In these muscle cells, CLIMP-63 staining appears as bright dots aligned in a cross-striated fashion over I bands. This pattern corresponds to the staining observed for rough ER markers like BiP or PDI which was shown to partially overlap with the calsequestrin staining, i.e. the junctional SR {Kaisto, 2003 #385}. Part of the dots of CLIMP-63 (around 40%) co-localize with Trisk 95 at the triads. Hence, although CLIMP-63 has been described in mono-nucleated cells as a rough ER protein partitioning into ER sheets, it seems that part of muscle CLIMP-63 is located at the junctional SR.

The luminal segments of CLIMP-63 are composed of coiled-coil domains with a high propensity to form homo- or hetero-oligomers {Klopfenstein, 2001 #366}. Triadin also exhibit in its luminal region a coiled-coil domain that we showed previously to be involved in its ER/SR shaping properties together with two cysteines. Cysteines with the coiled-coil domain were called the RLS domain, and the suppression of this domain from the Trisk 95 sequence (T95- $\Delta$ RLS mutant) nearly abolished the deformation of the ER into RLS {Fourest-Lieuvin, 2012 #364}. Here we show that CLIMP-63 and Trisk 95 interact via their respective luminal regions, and that this interaction requires the RLS domain of Trisk 95. In muscle cells, both proteins also interact directly via their luminal domains, as suggested by our co-immunoprecipitation data. These interactions involving luminal coiled-coil domains and cysteines most probably generate hetero-oligomers that would shape the SR membrane and induce this

characteristic SR membrane curvature observed for cisternae. If these hetero-oligomers are important for the SR cisternae shaping, they should dissociate in the absence of triadin and this may explain the flattened morphology of cisternae observed in triadin KO muscles. Parler de la mesure du diamètre du ER en présence de T95 ??

CLIMP-63 is also a MT-binding protein. Its MT-binding domain comprises the amino acids 62 to 101 in the cytosolic part of the protein {Vedrenne, 2005 #62}. The peptide corresponding to the sole cytosolic part has been shown to behave as a MAP in vitro, with the capacity to bind to purified MTs and to induce tubulin polymerization {Klopfenstein, 1998 #368}. The MT-binding properties of CLIMP-63 seem also to be essential for ER shaping. Indeed, in the ER membrane of cultured cells, CLIMP-63 may aggregate into patches and thereby form MT binding sites of high avidity {Klopfenstein, 2001 #366}. When overexpressed, CLIMP-63 has a strong effect on the MT network, inducing bundles of stabilized MTs {Klopfenstein, 1998 #368; Vedrenne, 2006 #332; Vedrenne, 2005 #62}. Owing to its MT-binding properties, CLIMP-63 is the missing link between triadin and the MTs. Indeed, the ability of Trisk 95 to cause a reorganization of the MT network passes through CLIMP-63. To show this, we used the pseudo-phosphorylated CLIMP-MT(-) mutant, which acts as a dominant-negative mutant and could not bind the MTs anymore {Vedrenne, 2005 #62}. This CLIMP-MT(-) mutant is still able to bind Trisk 95 via its luminal domain, but it abolishes the effects of the triadin on the MT network.

In adult muscle cells, MT bundles partially co-align with triads and with CLIMP-63, which is in good agreement with the fact that CLIMP-63 may link triads to MTs. Our work on triadin KO mice shows that the overlap between CLIMP-63, MTs and triads is diminished in the absence of triadin. Furthermore, MTs appear somewhat disorganized and the overall CLIMP-63 staining is dimmer. Hence, triadin appears to be the anchor of both CLIMP-63 and MTs at the triads. Why triads have to be linked to the MT network remains an open question, (peut-être ici rallonger la sauce sur le rôle de plus en plus prépondérant des MTs dans la cellule musculaire, papiers Gomes, Oddoux, Straube) but we can speculate that MTs might have a role in the tight spatial distribution of triads all along the mature fiber. Likewise, SR cisternae have to be positioned close to a T-tubule to form each triad and MTs might also have a role in this subcellular organelle shaping. These hypotheses will have to be tested.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All procedures using animals were approved by the Institutional ethics committee and followed the guidelines of the National Research Council Guide for the care and use of laboratory animals.

### DNA constructs and siRNAs

Full-length rat triadin Trisk 95 (accession number #AJ243304), Trisk 51 (#AJ243303), Trisk 32 (#AJ812276) and several Trisk 95 mutants inserted into the expression vectors pcDNA3.1 (Life Technologies) or pEGFP-N1 (Clontech) have already been described {Marty, 2000 #18; Vassilopoulos, 2005 #14; Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. To construct T95-mini-GFP, the stop codon of T95-mini in pcDNA3.1 was removed by a PCR-based method, and the amplified sequence was inserted into pEGFP-N1. For the construction of T95-lumen, the plasmid DsRed2-ER (Clontech) was digested by AgeI and BglII to remove DsRed2. The luminal domain of Trisk 95 (aa 113 to 687) was amplified by PCR with FLAG and KDEL sequences inserted at the end of the PCR fragment, which was then inserted in the AgeI/BglII digested plasmid. T95-lumen encoded by this construct is thus composed of calreticulin ER targeting peptide, luminal domain of Trisk 95, Flag and KDEL peptides, and is targeted into the lumen of the ER. CLIMP-63 plasmids were kindly provided by Hesso Farhan and Hans-Peter Hauri {Vedrenne, 2005 #62; Klopfenstein, 2001 #366}. For knockdown of CLIMP-63 in COS-7 cells, two siRNAs were designed according to {Nikonov, 2007 #367}, except that our siRNAs were based on human sequence of CLIMP-63: siRNA1 5' CCAGAAUGAGAUUCUCAAATT-3' and siRNA2 5' CCAAUCCAUCAACGACAATT-3' corresponding to nucleotide positions 621-639 and 734-752 in human CLIMP-63 coding sequence, respectively. Scramble RNA (scrRNA) was obtained from scrambled sequence of siRNA1 and synthesized by Invitrogen with the two siRNAs.

### Viruses

In this study, we used adenoviral-mediated gene transfer to express Trisk 95, Trisk 51 or Trisk 32 in HEK293 cells. These viruses were engineered and produced either by the Gene Vector Production Network at Genethon III (Evry, France) or by the Atlantic Gene Therapies (Nantes, France). We produced lentiviral vectors carrying either the rat Trisk 95 cDNA, the human CLIMP-63 cDNA or the cDNAs of the mutants CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-). These lentiviral vectors were produced into HEK293T cells as previously described {Zufferey, 1997 #373; Bovia, 2003 #374} with the following modifications. High-titer lentiviral vector stocks were generated by calcium phosphate-mediated transient transfection (Clontech) of the HEK293T cells by 3 plasmids (Addgene): the transfer vector plasmid in pWPXLD, the packaging plasmid psPAX2 and the vesicular stomatitis virus G protein (VSV G) envelope protein-coding plasmid. Titers of viruses in cell culture supernatants were determined as previously described {Nguyen, 2005 #375} and were in the range of  $10^6$  to  $10^7$  transducing units/ml. For all transduction experiments, cells were infected by overnight incubation with the chosen virus, at a multiplicity of infection 5. Control cells were infected with the control virus (lentivirus-GFP).

## Antibodies

Primary polyclonal antibodies (pAbs) used in this study are: guinea pig or rabbit pAbs against the C-terminus of rat Trisk 95 (Vassilopoulos et al., 2005); chicken pAB against GFP (Abcam); rabbit pAbs against the N-terminus of all triadin isoforms {Vassilopoulos, 2005 #14}, the C-terminus of rat RyR1 {Marty, 1994 #9}, CLIMP-63 (anti-CKAP4, Euromedex) and calnexin (Stressgen). Primary mouse monoclonal antibodies (mAbs) used are against RyR (RyR34C clone, DSHB), GFP (GFP12A6 clone, DSHB), myosin heavy chain (MF20 clone, DSHB), beta-tubulin (TUB2.1 clone, Sigma) and Flag® (M2 clone, Sigma). Secondary antibodies used for immunofluorescence studies were coupled to Alexa-Fluor 488 or Alexa-Fluor 546 (Molecular Probes); or to Cy3 or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Secondary antibodies used for western blotting were HRP-coupled rabbit pAbs (Jackson ImmunoResearch Laboratories). For western blotting after IP, TrueBlot® HRP-coupled rabbit pAbs (Rockland) were used.

## Proteomic analyses

Proteomic experiments were performed as previously described {Milbradt, 2014 #44}. Briefly, proteins were stacked in the top of a 4-12% NuPAGE gel (Invitrogen) before R-250 Coomassie blue (BioRad) staining and in-gel digestion using modified trypsin (Promega, sequencing grade). Resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS with Ultimate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos pro, Thermo Scientific) using a 120-min gradient. Peptides and proteins were identified through concomitant searches against the Uniprot databank (September 2014 version, Homo sapiens taxonomy, 138560 sequences) and a classical contaminants database (homemade, 260 sequences) and the corresponding reversed databases using Mascot (version 2.5). The IRMa software, version 1.31.1 {Dupieris, 2009 #45}, was used to filter the results: conservation of rank 1 peptides, peptide identification FDR < 1% (as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy), and minimum of 1 specific peptide per identified protein group. Filtered results were uploaded into a relational mass spectrometry identification database before performing a compilation, grouping and comparison of the protein groups from the different samples using a homemade tool (hEIDI). Differential analysis of GFP and Trisk 95-GFP co-immunoprecipitation eluates was performed using extracted spectral counts (SC) and specific spectral counts (SSC). A protein was considered as a potential binding partner if it was identified with a minimum of 10 SC and if its corresponding SC and SSC were enriched at least 4 times in Trisk 95-GFP sample compared to GFP one.

## Cell culture and transfection

COS-7 and HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies). Transient transfections were carried out with of DNA using Exgen 500 reagent (Euromedex), according to the manufacturer's protocol. After 28 hours of transfection, cells were treated for either IP or immunofluorescence. For IP, cells grown in 60 mm diameter plates were collected by trypsinization, rinsed once in PBS and stored at -20°C until used. For immunofluorescence, cells grown on coverslips were fixed for 6 min in methanol at -20°C. Human immortalized myoblasts were engineered and produced by the Institute of myology (Paris, France). Mouse satellite cells were obtained by trypsinization of skeletal muscle fragments of 1-day-old mice. These satellite cells were seeded on matrigel-coated Ibidi  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> (Biovalley). When human or mouse myoblasts were confluent (approximately 24 h after seeding), differentiation was induced by changing the culture medium for Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% horse serum and 1%

penicillin-streptomycin. The differentiation days are counted from this medium change. Myotubes were fixed after 5-10 days of differentiation with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) in PBS for 20 min and permeabilized with 1% TritonX-100 in PBS for 20 min.

### **Preparation of muscle fibers**

Flexor Digitorum Brevis (FDB) muscle fibers were dissociated as described previously {Fourest-Lieuvin, 2012 #364} with the following modifications. Dissected FDB muscles were digested for 60-90 minutes in collagenase, and dissociated fibers were seeded on matrigel-coated Ibidi  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> for 1 hour at 37°C and were fixed for 20 minutes in 4% paraformaldehyde in PBS. Fibers were then permeabilized for 45 minutes with 1% Triton X-100 in PBS at 30°C.

### **Immunofluorescence microscopy**

Cells and FDB fibers were saturated in PBS supplemented with 0.1% TritonX-100, 0.5% bovine serum albumin, and 2% goat serum for 30 minutes. Cells were incubated with primary antibodies in PBS-0.1% Tween20 either at room temperature for 1 hour (model cells) or at 4°C overnight (differentiated myotubes and FDBs). After incubation for 1-3 hour(s) at room temperature with fluorescent secondary antibodies, nuclei were stained with Hoechst33258 (Life Technologies). Coverslips were mounted on microscope slides with FluorSave<sup>TM</sup> reagent (Calbiochem). Images were captured on a Zeiss LSM710 confocal microscope or Leica SPE confocal microscope.

### **Preparation of microsomes**

Tibialis anterior skeletal muscle was collected from adult mouse hindlimb. Crude microsomes were prepared with slight modifications of the procedures previously described {Marty, 2000 #18}. Indeed, after muscle homogenization in a 30-ml solution made of 200 mM sucrose, 20 mM HEPES (pH 7.4), 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM leupeptin, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM diisopropyl fluorophosphate (DFP), the low-speed (10 min at 1,500 g) pellet was discarded, and microsomes were obtained after 50 min of centrifugation at 41,000 g. They were homogenized at 8610 mg/ml in 0.1 M NaCl, 30 mM imidazole (pH 6.8) and 8% sucrose and stored in liquid nitrogen.

### **Immuno-precipitation (IP), SDS-PAGE and western blotting**

Mouse skeletal muscle microsomes or transfected HEK293 cells were lysed by sonication (10 X 1 second) in lysis buffer (1mM EDTA, 15 mM NaCl pH7.1). Samples (3 mg/ml) were then solubilized for 30 min at 4°C in a buffer composed of 0.9 M NaCl, 1.6% CHAPS, 0.1% phospholipids (Avanti Polar Lipids), 20 mM Pipes (pH 7.1), 200  $\mu$ M PMSF, and 1 mM DFP, and the solubilized proteins were diluted with 1 volume of PBS and 1 volume of H<sub>2</sub>O. IPs were then performed with the chosen antibody and Dynabeads® Protein G (Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. All Triadin or CLIMP-63 constructs fused with GFP were immuno-precipitated from transfected HEK293 cell extracts using GFP-Trap® (Chromotek), according to the manufacturer's protocol. The immuno-precipitated proteins were then analyzed by SDS-PAGE (5-15% gradient gels, Bio-Rad Laboratories) and Western blotting performed with antibodies described above and with ECL substrate reagent (Thermo Scientific). Acquisitions were done using a ChemiDoc XRS apparatus (Bio-Rad) and quantification was performed using Quantity One software.



## Co-localization analysis on immunofluorescence images of FDB muscle cells

To quantify CLIMP-63 co-localization with Trisk 95 or RyR1, or MT co-localization with RyR1, a binary mask corresponding to the overlap between the green and the red stainings was generated with a homemade ImageJ macro. This mask corresponded to the surface of co-localization on one confocal plane. A ratio was calculated between the surface of co-localization and the total green surface. Results were given as percentages and averaged from at least three independent experiments.

## Statistics

All statistical analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Française contre les Myopathies (AFM), and the foundation Daniel Ducoin. Proteomic experiments were partly supported by the Agence Nationale pour la Recherche (Investissement d'Avenir Infrastructures, ProFi project ANR-10-INBS-08-01). We are grateful to Hesso Farhan and Hans-Peter Hauri for giving us CLIMP-63 plasmids. We thank Oriana Sarraut, Julie Brocard for technical help and Eric Denarier for adaptation of a Macro in Image J to quantify co-localizations. A.O. and M.S. were supported by a grant from the AFM.

## References

## Figure legends

### **Fig. 1. Endogenous CLIMP-63 associates with transfected Trisk 95 in COS-7 and HEK293 cells.**

(A) Trisk 95 (T95) was expressed in COS-7 cells before fixation and permeabilization. Cells were labeled with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green), T95 (red) and  $\alpha$ -tubulin to label MTs (gray). The CLIMP-63 and T95 stainings are merged in the right panel. Insets 1 and 2 are zoomed in lower panel for each image. Cells expressing T95 exhibit an ER deformation called rope-like structures (RLS) and a disorganization of MTs (insets 2), which is not the case in cells that do not express T95 (insets 1). Endogenous CLIMP-63 co-localizes with T95 in RLS in T95-expressing cells (right panel and insets 2). Scale bar, 20  $\mu$ m. (B) HEK293 cells were either not transfected (lanes 1, 2) or transfected with the plasmid coding for T95 (lanes 3, 4) before extraction (lanes 1, 3) and immunoprecipitation (IP) with an antibody to CLIMP-63 (lanes 2, 4). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left.

### **Fig. 2. The luminal part of Trisk 95 is important for its association with CLIMP-63.**

(A) Schematic representation of CLIMP-63 (CLIMP), Trisk 95 (T95) and constructs of T95 deleted either for the cytosolic domain ( $\hat{e}$  cyto-T95), the cytosolic and transmembrane domains (T95-lumen), the luminal domain (T95-mini) or the RLS-specific sequences (T95- $\hat{e}$  RLS, coiled-coil domain removed and cysteines mutated) The T95-lumen construct is fused to the Flag peptide in its C-terminus. Specific sequences in CLIMP-63 and T95 are highlighted: transmembrane domains (TM,

yellow boxes), coiled-coil domains (CC, gray boxes) and the KEKE domain in triadin (brown box). Numbers indicate amino acids. (B) COS-7 cells were co-transfected with CLIMP-63 and one of the Trisk 95 construct: wild type T95 (B1),  $\hat{e}$  cyto-T95 (B2), T95-lumen (B3), T95-mini (B4) or T95- $\hat{e}$  RLS (B5). After fixation, cells were stained with antibodies against CLIMP-63 and Trisk 95 or Flag. T95,  $\hat{e}$  cyto-T95 and T95-lumen co-localize with CLIMP-63 in RLS whereas T95-mini and T95- $\hat{e}$  RLS do not. Scale bar, 10  $\mu$ m. (C) Quantification of transfected cells exhibiting RLS with both CLIMP-63 and T95, or with both CLIMP-63 and one of the deletion mutants of T95.  $**P < 0.01$ , Mann-Whitney test, error bars are SEM, n=3 to 5 counts of 100 transfected cells in at least 2 experiments for each condition. (D, E and F) Co-IP experiments performed on extracts of HEK293 cells expressing the indicated proteins. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot. (D) T95,  $\hat{e}$  cyto-T95 or T95- $\hat{e}$  RLS were immuno-precipitated with an antibody to T95 (IP Triadin). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. (E) T95-GFP or T95-mini-GFP were immuno-precipitated with the kit anti-GFP trap (IP GFP). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with GFP (upper and middle) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. (F) Trisk isoforms T95, T51 or T32 (depicted in G) were immuno-precipitated with an antibody to the N-terminus of triadins (IP Triadin). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with the same antibody as for IP (upper) and with CLIMP-63 antibody (lower panel). (G) Schematic representation of triadin isoforms, Trisk 95 (T95), Trisk 51 (T51) and Trisk 32 (T32), with specific sequences as in (A).

**Fig. 3. The luminal domain of CLIMP-63 is responsible for the association with Trisk 95.**

(A) Schematic representation of constructs of CLIMP-63, with EGFP inserted in place of the luminal domain (CLIMP- $\hat{e}$  lumen) or in place of the cytosolic domain ( $\hat{e}$  cyto-CLIMP). Specific sequences are as in Fig. 2A. (B) COS-7 cells were co-transfected with T95 and either CLIMP- $\hat{e}$  lumen (B1) or  $\hat{e}$  cyto-CLIMP (B2). After fixation, cells were stained with antibodies against CLIMP-63 (green) and T95 (red). Merged images are shown. Scale bar, 10  $\mu$ m. (C) Co-IP experiments performed on extracts of HEK293 cells expressing the indicated proteins. CLIMP- $\hat{e}$  lumen or  $\hat{e}$  cyto-CLIMP were immuno-precipitated with the kit anti-GFP trap (IP GFP). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and GFP (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

**Fig. 4. Trisk 95 phenotype is abolished by a mutant of CLIMP-63 that does not bind to MTs.**

(A) Schematic representation of CLIMP-63 in which three serines at positions 3, 17 and 19 of the cytosolic N-terminal part were mutated either in alanines (mutant CLIMP-MT(+)) or in glutamic acids (mutant CLIMP-MT(-)). CLIMP-MT(+) can bind MTs while CLIMP-MT(-) cannot. (B) COS-7 cells were co-transfected with T95 and either CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-) and labeled with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green), T95 (red) and  $\alpha$ -tubulin to label MTs (gray). All cells co-expressing T95 and CLIMP-MT(+) present RLS in which both proteins are co-localized (zooms 1), and their MTs are disorganized. In cells co-expressing T95 and CLIMP-MT(-), both proteins are co-localized in the ER (zooms 2) but the ER never exhibit RLS and the MT network appears normal. Thus, CLIMP-MT(-) behaves as a dominant-negative mutant and abolishes the RLS phenotype induced by T95. Scale bar, 20  $\mu$ m. (C) Quantification of transfected cells exhibiting RLS. Cells were either transfected with T95, CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-) separately, or co-transfected as indicated. Quantifications were also performed on nonótransfected cells as a control (first column).

\*\*P<0.01, Mann-Whitney test, error bars are SEM, n=4 to 5 counts of 100 transfected cells in at least 2 experiments for each condition. (D) Co-IP experiments performed on extracts of HEK293 cells expressing the indicated proteins. CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-) were fused to EGFP in this experiment and were immuno-precipitated with the kit anti-GFP trap (IP GFP). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and GFP (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

### **Fig. 5. In muscle cells, CLIMP-63 and T95 stainings partly overlap.**

(A) Isolated FDB muscle fibers from rat were double stained with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green) and Trisk 95 (T95, red). Each image represents one single confocal plane. Scale bar, 5  $\mu$ m. The inset in the merged panel is zoomed (fourth panel). Scale bar in the zoom, 2.5  $\mu$ m. The binary image (mask, right panel) represents in black the CLIMP-63 staining area that co-localizes with the T95 staining on the zoomed image. (B) The fluorescence intensity as a function of distance was plotted for six successive triads in the fiber. The green curve corresponds to CLIMP-63, and the red curve to T95. (C) Percentages of CLIMP-63 staining area co-localizing with T95 labeling on confocal images of FDB muscle fibers of rats and mice, quantified by using masks as illustrated in (A). Quantifications were performed on 7 images from 2 experiments on rat FDB and 11 images from 3 experiments on mouse FDB. (D) Co-IP experiments performed on mouse TA muscle microsomes (lysate, lane 1) with an antibody to T95 (IP T95, lane 2). Control IP was performed with pre-immune IgGs (lane 3). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

### **Fig. 6. Absence of triadin results in delocalization of CLIMP-63.**

(A) Isolated FDB muscle fibers from WT or triadin-KO mice were double-stained with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green) and the ryanodine receptor (RyR) to label triads (red). Each image represents one single confocal plane. A zoom of the merged image is shown (fourth panel). Scale bars, 2  $\mu$ m. The binary image (mask, right panel) represents in black the CLIMP-63 staining area that co-localizes with the RyR staining in the zoomed image. (B) The fluorescence intensity as a function of distance was plotted for three successive triads in fibers of WT (upper) or triadin-KO (lower panel) mice. The green curve corresponds to CLIMP-63, and the red curve to RyR. (C) Percentage of CLIMP-63 staining area co-localizing with RyR labeling on confocal images of FDB muscle fibers of WT or triadin-KO mice. \*\*\*P<0.001, Mann-Whitney test, error bars are SEM, n=11 and 6 quantified images for WT and KO conditions, respectively. Images were from 3 different dissections. (D) Co-IP experiments performed on WT (lane 1) or triadin-KO (lane 2) mouse TA muscle microsomes with an antibody to RyR (IP anti-RyR). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with RyR (upper), T95 (middle) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

### **Fig. 7. Disorganization of microtubule network in muscles of triadin KO mice.**

(A) Isolated FDB muscle fibers from WT or triadin-KO mice were double-stained with antibodies against tubulin to label MTs (green) and the ryanodine receptor (RyR) to label triads (red). Each image represents one single confocal plane. A zoom of the merged image is shown (fourth panel). Scale bars, 2.5  $\mu$ m. The binary image (mask, right panel) represents in black the MT staining area that co-localizes with the RyR staining in the zoomed image. (B) The fluorescence intensity as a function of distance was plotted for three successive triads in the fiber. The green curve corresponds to MTs, and the red curve to RyR. (C) Percentage of MT surface co-localizing with RyR labeling on confocal

images of FDB muscle fibers of WT or triadin-KO mice. \*\*\* $P < 0.001$ , Mann-Whitney test, errors bars are SEM,  $n=9$  and 6 quantified images for WT and KO conditions, respectively. Images were from 3 different dissections.

**Fig. S1. Quantification of cells, either transfected or co-transfected, exhibiting RLS.**

COS-7 cells were mono-transfected with T95,  $\hat{e}$  cyto-T95, T95-lumen, T95-mini, T95- $\hat{e}$  RLS, CLIMP-63,  $\hat{e}$  cyto-CLIMP, or CLIMP- $\hat{e}$  lumen; or they were co-transfected with T95 and one of the CLIMP-63 construct. After fixation, cells were stained with antibodies against Trisk 95 or Flag and against CLIMP-63. Cells exhibiting RLS were counted among transfected cells. Error bars are SEM,  $n=3$  to 9 counts of 100 transfected cells in at least 2 experiments for each condition.

**Fig. S2. The knock-down of CLIMP-63 by siRNAs is not efficient enough to abolish the RLS phenotype.**

COS-7 cells were treated for 24h either with a siRNA targeting CLIMP-63 (siRNA KD) or with a scrambled siRNA (Sc) used as a control. They were then transfected with a plasmid expressing Trisk 95 (T95) for another 24h (i.e. 48h of treatment with siRNAs). Cells were either fixed for immunofluorescence (A, D, E) or scraped for cell extraction and western blotting (B, C). (A, D) Cells were labeled with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green), T95 (red) and tubulin (gray). Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ . (B) Immunoblots for endogenous CLIMP-63 and calnexin from siRNA-treated COS-7 cell extracts. (C) Quantification of CLIMP-63 expression performed on 4 immunoblots. The siRNA KD was able to lower the amount of CLIMP-63 by 70 %. \* $P < 0.05$ , Mann-Whitney test, errors bars are SEM. (D) Image showing that among KD treated cells, the vast majority of cells do not exhibit CLIMP-63 staining anymore (insets 1, see also image in A, right), but it is still possible to find cells exhibiting RLS with little amounts of CLIMP-63 and with T95 in these ER structures (insets 2). These RLS co-align with bundled MTs. (E) Cells exhibiting RLS were counted among T95 transfected cells. ns,  $P > 0.05$ , Mann-Whitney test, error bars are SEM,  $n=3$  to 5 counts of 100 transfected cells in at least 2 experiments for each condition.

# **A link between microtubules and triads in muscle cells: role of triadin and CLIMP-63**

**Alexis Osseni, Muriel Sebastien, Yohann Couté, Julien Fauré, Anne Fourest-Lieuvin & Isabelle Marty.**

## Introduction

Skeletal muscle contraction is initiated by a burst of calcium out of its major store, the sarcoplasmic reticulum. This rise in intracellular calcium concentration is triggered by an action potential which propagates along the plasma membrane and reaches invaginations called transverse tubules. Transverse tubules (T-tubules) make close and periodic contacts with the sarcoplasmic reticulum (SR) to form peculiar membrane structures called triads. Triads, formed by the tight apposition of 2 terminal cisternae of SR on both sides of a T-tubule, are specifically localized at the A-I bands transition in mammalian skeletal muscle, on both side of the Z-line. Triads are therefore highly organized membrane structures, precisely distributed in muscle fiber. The transformation of an action potential into a massive calcium release, a process called the Excitation-Contraction (EC) coupling, is performed by a macromolecular complex, the Calcium Release Complex (CRC). The main players of CRC are the dihydropyridine receptor (DHPR), a L-type calcium channel of the T-tubules membrane and the ryanodine receptor (RyR1), the sarcoplasmic reticulum calcium channel, both in physical interaction (Block BA et al, J Cell Biol 1988 (**107**, 2587-2560); Marty et al, PNAS 1994) With its two main members anchored in two different membranes, the correct function of the CRC complex relies on the precise alignment of these two membranes, and therefore on the formation and maintenance of triads. A number of proteins associate with either the DHPR or the RyR1 receptors and regulate their activity. Among them is the triadin. Triadin is a multi-protein family, with four isoforms, Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 and Trisk 32, which arise of the alternative splicing of a unique gene, the *TRDN* gene. Triadins are specifically expressed in striated muscles, Trisk 95 and Trisk 51 being the major skeletal muscle isoforms and Trisk 32 a minor skeletal muscle but the major (if not the only) cardiac isoform {Marty, 2014 #372}. Triadins are type II transmembrane proteins that are completely identical in their cytosolic and transmembrane domains. They diverge by the length of their luminal domain and their C-terminal end. They are localized in the SR membrane, and are associated to RyR1 at the skeletal muscle triad, or to RyR2 at the cardiac dyad {Marty, 2014 #372}. Mutations in the *TRDN* gene have been implicated in severe human cardiac arrhythmia with sudden death {Roux-Buisson, 2012 #61}.

We showed previously that triadins, or at least Trisk 95, can shape reticulum membranes and, therefore, could have a role in the overall structure of SR cisternae at the triad (Fourest-Lieuvain et al, 2012). In addition, the absence of all forms of triadins in triadin-KO mice led to deformations of part of the triads {Oddoux, 2009 #11}, as observed by

electron microscopy. These mice exhibited also a reduction in the amount of calcium stored in SR cisternae, associated with a reduced efficiency in EC coupling and muscle strength {Oddoux, 2009 #11;Shen, 2007 #370}. We hypothesized that the reticulum membrane shaping properties of triadins may favor the coupling of RyR1 with the DHPR.

When expressed in cultured cells like COS-7 cells, Trisk 95 by itself induces a striking alteration of the endoplasmic reticulum (ER) morphology with the apparition of ER-rope like structures (RLS), together with modifications of the microtubule (MT) network morphology and dynamics {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. These observations point to the existence of a link between triadin and MTs. However, this link is indirect, as we observed that Trisk 95 domains implicated in its shaping properties are luminal {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. Therefore, there must be in ER or SR membrane another transmembrane protein able to bind Trisk 95 luminal domains on the one hand, and MTs on the other hand.

In the present study, using a proteomic approach, we identified CLIMP-63 as a Trisk 95 partner. CLIMP-63 (63 kDa cytoskeleton-linking membrane protein, also known as CKAP4 for cytoskeleton-associated protein 4) is an ubiquitous ER transmembrane protein which binds microtubules and therefore creates a link between reticulum and the microtubules network {Klopfenstein, 1998 #368;Vedrenne, 2006 #332}. This protein was discovered in the early 1990s by two groups working on very different topics {Mundy, 1992 #377;Schweizer, 1993 #380}, foreshadowing that it is a protein with many functions. CLIMP-63 is a non-glycosylated type II transmembrane protein present only higher eukaryotes, where it is ubiquitously expressed in all the tissues. It has been described both in the plasma membrane, where it could play a role as a surface receptor {Sandoz, 2015 #381}, and in the ER membrane, more specifically concentrated in ER sheets where it would have the role of a luminal spacer {Klopfenstein, 2001 #366;Shibata, 2010 #382}. After having characterized the molecular association between Trisk 95 and CLIMP-63, we show that this protein pair anchors the triads onto the microtubule network in muscle cells.

## Results

### **CLIMP-63 as a putative partner for triadin Trisk 95**

To seek for a protein able to perform the link between Trisk 95 and MTs, we identified the proteins associated to Trisk 95 using co-immunoprecipitation coupled to MS-based proteomics. Trisk 95-GFP or GFP as a control were expressed in HEK293 cells. After immunoprecipitation (IP) performed with anti-GFP antibodies, the proteins present in IP eluates were digested with trypsin. The resulting peptides were then analyzed by nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). Differential screening allowed us to identify proteins enriched in the Trisk 95 IP (Table S1). From these potential binding partners, we selected those that could bind MTs and focused our attention on CLIMP-63 (Cytoskeleton-LInking Membrane Protein, 63 kDa, CKAP4\_HUMAN), a type II reticulum transmembrane protein whose function is to shape and anchor the reticulum onto the MT network. CLIMP-63 binds MTs via its N-terminal cytosolic domain, and exhibit a long intra-luminal coiled-coil domain {Klopfenstein, 2001 #366;Vedrenne, 2006 #332}. It is an ubiquitous protein expressed both in cell line and in muscle cells. Furthermore, CLIMP-63 has been described to induce ER rope-like structures (RLS) when over-expressed in cultured cells {Vedrenne, 2006 #332;Klopfenstein, 1998 #368}, which is the same phenotype as the one observed for Trisk 95 over-expression {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. Therefore, we raised the hypothesis that CLIMP-63 could be the missing link between triadin and the MT network.

### **Expressed Trisk 95 associates with endogenous CLIMP-63 in cell lines.**

Because we showed that Trisk 95 could induce ER membrane deformation and MT network disorganization when expressed in COS-7 cells, we wondered whether CLIMP-63 would be associated with these Trisk 95-induced phenotypes. COS-7 cells were transfected with Trisk 95 and immunolabeled for triadin, CLIMP-63 and tubulin. In control non-transfected cells, endogenous CLIMP-63 was localized in the reticular domain of the ER and MTs exhibited a normal radial pattern (Fig. 1A, cell 1). In Trisk 95-transfected cells, the ER was altered with the formation of rope-like structures (RLS), and CLIMP-63 co-localized with Trisk 95 in these RLS (Fig. 1A, cell 2). In addition, MT arrays were disorganized and co-aligned with the ER-RLS (Fig. 1A, cell 2). Hence, Trisk 95 expression could induce CLIMP-63 and MT redistribution, suggesting a connection between the three.



In HEK293 cells, CLIMP-63 was co-immunoprecipitated with Trisk 95-GFP, as shown by the mass spectrometry analyses performed on Trisk 95-GFP IP. To ascertain that CLIMP-63 was able to co-immunoprecipitate with Trisk 95 without the GFP moiety, Trisk 95 was expressed in HEK293 cells and an IP was performed with an anti-CLIMP-63 antibody. Results showed that Trisk 95 was present in CLIMP-63 co-IP fraction (Fig. 1B, lane 4). These co-localization and co-IP experiments show that CLIMP-63 can bind Trisk 95 in cell lines. We next wondered which regions of both proteins were responsible for this interaction.

### **The luminal domain of Trisk 95 is involved in the association with CLIMP-63.**

In order to identify the interacting domain in Trisk 95, we generated different deletion mutants (Fig. 2A): i) a mutant without the cytosolic N-terminal domain ( $\Delta$ cyto-T95), ii) a mutant without the cytosolic and transmembrane domains but with ER targeting and retention sequences (T95-Lumen), iii) a mutant without most of the luminal domain (T95-mini), and finally iv) a mutant in which specific sequences responsible for RLS phenotype have been removed (T95- $\Delta$ RLS). In these experiments, wild-type CLIMP-63 (CLIMP, Fig. 2A) was co-transfected with all the above deletion mutants. As previously described (Klopfenstein, 1998 #368), CLIMP-63 by itself induced ER deformation in 78% of the transfected cells (Fig. S1.). When CLIMP-63 was co-transfected with Trisk 95 (T95),  $\Delta$ cyto-T95 or T95-Lumen, the cells exhibiting RLS showed a perfect co-localization between CLIMP-63 and Trisk 95 proteins in these ER structures (Fig. 2B, panels a-c and quantifications in Fig. 2C). In contrast, cells co-transfected with CLIMP-63 and either T95-mini or T95- $\Delta$ RLS exhibited RLS but the Trisk 95 mutants were not localized in these RLS (Fig. 2B, panels d-e and quantifications in Fig. 2C). To assess these immunofluorescence results, a series of immunoprecipitations were performed showing that T95 and  $\Delta$ cyto-T95 could co-immunoprecipitate CLIMP-63 whereas T95- $\Delta$ RLS or T95-mini could not (Fig. 2D and E). These experiments demonstrate that the luminal domain of Trisk 95 is responsible for association with CLIMP-63.

Triadin is a family with different members, differing only by their luminal domains (Fig. 2G). To see whether other triadin isoforms associate with CLIMP-63, HEK293 cells were transduced with different adenoviral vectors encoding the different isoforms and IPs were performed with an antibody against the common N-terminal end of triadin. In each case, CLIMP-63 was co-immunoprecipitated, indicating that all the triadin isoforms are able to interact with CLIMP-63 (Fig. 2F).

**As for Trisk 95, the luminal domain of CLIMP-63 is responsible for the association between the two proteins.**

To study domains of CLIMP-63 involved in the interaction, two mutant forms of CLIMP-63 were used (Fig. 3A): the first one with the luminal part replaced by the GFP protein (referred to as CLIMP- $\Delta$ lumen), the second one with the cytoplasmic part replaced by the GFP protein ( $\Delta$ cyto-CLIMP). When Trisk 95 was co-transfected with either of the mutant forms of CLIMP-63, none of the co-transfected cells exhibited RLS (Fig. S1). Nevertheless,  $\Delta$ cyto-CLIMP co-localized with Trisk 95 in the ER, while CLIMP- $\Delta$ lumen did not (Fig. 3B). Therefore, the luminal domain of CLIMP-63 seemed important for CLIMP-63 / Trisk 95 interaction. This was confirmed by IP performed on HEK293 cells transduced with an adenovirus encoding Trisk 95 and transfected with either CLIMP- $\Delta$ lumen or  $\Delta$ cyto-CLIMP. As expected, Trisk 95 was co-immunoprecipitated with  $\Delta$ cyto-CLIMP (Fig. 3C, lane 4) and was absent from the IP of CLIMP- $\Delta$ lumen (Fig. 3C, lane 3). Hence, the connection between CLIMP-63 and Trisk 95 involves their respective luminal domains.

**The RLS-phenotype induced by Trisk 95 depends on the capacity of CLIMP-63 to bind MTs.**

When expressed in cell lines, Trisk 95 induces ER deformations, the RLS, which are concomitant with MT array disorganization. Because it seems from the above results that Trisk 95 binds to MTs via CLIMP-63, we hypothesized that the capacity of Trisk 95 to form RLS was due to its ability to bind and recruit CLIMP-63. To test this hypothesis, endogenous CLIMP-63 was knocked down by RNA interference (RNAi) in COS-7 cells before transfection of the cells with Trisk 95, and the extent of Trisk 95-induced RLS was evaluated. The siRNA used (CLIMP-KD) was able to lower the amount of CLIMP-63 by 70 % as previously described {Nikonov, 2007 #367} (Fig. S2A, B and C), but this was not enough to abolish the presence of Trisk 95-induced ER deformation (Fig. S2D and E). As an alternative approach, a mutant form of CLIMP-63 was used, referred to as CLIMP-MT(-) because of its inability to bind to MTs () {Vedrenne, 2005 #62}. This mutant is phospho-mimetic, with four phospho-regulated sites mutated for glutamic acids in the cytosolic domain of the protein. As a control, a phospho-deficient mutant of CLIMP-63 was used. This mutant, referred to as CLIMP-MT(+), is always bound to MTs and has three phospho-sites mutated for alanine residues {Vedrenne, 2005 #62}. Trisk 95 was co-expressed in COS-7 cells with either CLIMP-MT(-) or CLIMP-MT(+) and the formation of RLS was quantified. Hundred percent

of the cells co-transfected by CLIMP-MT(+) and Trisk 95 exhibited RLS (Fig. 4B, upper panel, and 4C). At the opposite, cells co-expressing CLIMP-MT(-) and Trisk 95 never exhibited RLS (Fig. 4B, lower panel, and 4C). Rather, these cells presented a fenestrated reticulum that did not resemble RLS, and MT arrays in these cells appeared normal. This absence of RLS was not due to the incapacity of Trisk 95 to bind to the CLIMP-MT(-) mutant, as shown by co-IP experiments (Fig. 4D, lane 5): indeed, IP of CLIMP-MT(-) is still able to induce the co-IP of Trisk 95. Hence, CLIMP-MT(-), being unable to bind MTs, acted as a dominant negative mutant and abolished the capacity of Trisk 95 to induce RLS. This experiment shows that the ER remodeling induced by Trisk 95 was dependent on the ability of CLIMP-63 to bind MTs, but that the Trisk 95-CLIMP-63 interaction is not dependent on the CLIMP-63.-MTs interaction.

### **In muscle fibers, CLIMP-63 partially co-localized with Trisk 95.**

After the detailed characterization of the interaction between Trisk 95 and CLIMP 63 in cell lines, we examined the situation in skeletal muscle. We performed immunofluorescence stainings of CLIMP-63 and Trisk 95 in isolated rat *flexor digitorum brevis* (FDB) muscles fibers (Fig. 5A). Triads labeled by the anti-Trisk 95 antibody showed characteristic double rows of dots (Fig. 5A, red). CLIMP-63 also appeared as dots with a striated pattern (Fig. 5A, green). A partial overlap between the stainings of Trisk 95 and CLIMP-63 could be detected on the merged image as yellow dots (Fig. 5A), and could be better seen at higher magnification (Fig. 5A, zoom) and on the line scan performed on this zoom (Fig. 5B). An object-based co-localization analysis was performed with ImageJ software. The binary mask image (Fig. 5A) shows the co-localized points between the green and the red stainings and is used for the quantification in Fig. 5C:  $41 \pm 1.7$  % of the dots of CLIMP-63 are co-localized with Trisk 95 in rat and  $39 \pm 1.4$  % in mouse. Thus, CLIMP-63 is only partially co-localized with Trisk 95, which reflects the fact that CLIMP-63 is a reticulum protein present in the whole SR whereas Trisk 95 is specifically located at the triads, a sub-domain of the SR. Finally, immunoprecipitation was performed on mouse muscle homogenates with an antibody against Trisk 95. As shown in Fig. 5D, lane 2, CLIMP-63 was co-immunoprecipitated with endogenous Trisk 95 from these muscle extracts. Altogether, these experiments show that, as observed in non-muscle cell lines, CLIMP-63 is also a partner of Trisk 95 in muscle fibers.

### **CLIMP-63 triad localization is altered in triadin KO muscles.**

As a partner of Trisk 95, CLIMP-63 may be specifically localized at the triad by Trisk 95. Therefore, the localization of CLIMP-63 was studied in FDB fibers of triadin KO mice, devoid of all isoforms of triadin. Triads were stained using an anti-RyR1 antibody. In triadin KO FDBs, RyR1 staining was unmodified compared to wild type (WT) mice, exhibiting a double row of dots, but CLIMP-63 staining was sparser and less well co-localized with triads (Fig. 6A and B, lower panels). Quantification of the relative amount of CLIMP-63 co-localized with RyR1 in WT and triadin KO muscles showed a significant reduction from  $39 \pm 1.4$  % in WT to  $26 \pm 0.7$  % in KO muscles (Fig. 6C). Immunoprecipitations were performed using anti-RyR1 antibody on WT and triadin KO muscle homogenates, and the immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot. Whereas in WT muscle, immunoprecipitation of RyR1 resulted in the co-immunoprecipitation of both Trisk 95 and CLIMP-63, both proteins were absent in the IP made from triadin KO muscle (Fig 6D). Therefore, in the absence of Trisk 95, CLIMP-63 triad localization was reduced, and CLIMP-63 was not associated to the calcium release complex, highlighting the link between these two proteins in muscles.

### **The co-alignment between microtubules and triads is reduced in triadin KO muscles.**

We have previously shown that in skeletal muscle some MT bundles come in close proximity to triads {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. Because the protein pair Trisk 95 / CLIMP-63 is most probably involved in the link between triads and MTs, we looked at MTs in triadin KO isolated muscle fibers. As shown in Fig. 7, MT bundles often co-aligned with double rows of RyR dots, i.e. triads, in WT FDBs. In triadin KO muscle fibers, MTs were less organized (Fig. 7A and B, lower panels) and quantification of the percentage of MTs co-localized with RyR1 is significantly reduced from  $38 \pm 0.6$  % in WT animals to  $23 \pm 1.1$  % in triadin KO mice (Fig. 7C). This 40% reduction in the co-alignment between triads and MTs confirmed that the absence of the pair Trisk 95 / CLIMP-63 could have morphological consequences and induces a disruption of the link between triads and MTs in muscle cells.

## Discussion

Sarcoplasmic reticulum is an organelle with a central role in skeletal muscle contraction. It is organized in subdomains, the longitudinal SR and the terminal cisternae, which have different functions and different organizations. The terminal cisternae in association with the T-Tubule form the triads which play a major role in excitation-contraction coupling, being the site of calcium release, whereas the longitudinal SR is dedicated to calcium re-uptake. The mechanisms leading to the formation and maintenance of these subdomains are unknown, as well as the mechanisms leading to the exclusive localization of proteins of the calcium release complex at the triads. In this study we identified CLIMP-63 as a partner for triadin in muscle cells, involved in the link between triads and the muscle MT network.. In normal triads, SR cisternae which are subdomains of the SR, appear as small rounded bags on electron microscopy images. In triadin KO mouse muscles the SR cisternae are flattened, which has been attributed to calsequestrin deletion but could also reflect the involvement of triadin in SR cisternae morphology {Oddoux, 2009 #11}. This has been objectified in another of our previous studies: ectopic expression of Trisk 95 in COS-7 cells caused the rearrangement of both the ER and MTs, leading to the formation of ER rope-like structures, the RLS, co-aligned with bundles of MTs {Fourest-Lieuvain, 2012 #364}. These phenotypes demonstrated that Trisk 95 had shaping properties both on the reticulum membranes and on MTs. However, as the shaping properties were due to the luminal domain of Trisk 95, the link between this triadin and MTs was not clear and we hypothesized that there may necessarily be another protein between the ER/SR-anchored triadin and the MT network.

This protein is now identified as CLIMP-63, ER membrane, more specifically concentrated in ER sheets where it would have the role of a luminal spacer {Klopfenstein, 2001 #366;Shibata, 2010 #382}. Indeed, the luminal segments of CLIMP-63 molecules of opposing ER sheet membranes may bind to each other in an antiparallel manner {Klopfenstein, 2001 #366}. This arrangement would keep the luminal mean width of ER sheets at 50nm {Shibata, 2010 #382}.

CLIMP-63 has been abundantly studied in cultured mono-nucleated cells {Vedrenne, 2006 #332} as well as in neuronal cells {Cui-Wang, 2012 #383;Farah, 2005 #384}. Our study is the first description of CLIMP-63 in mature muscle fibers. In these muscle cells, CLIMP-63 staining appears as bright dots aligned in a cross-striated fashion over I bands. This pattern corresponds to the staining observed for rough ER markers like BiP or PDI which was shown

to partially overlap with the calsequestrin staining, i.e. the junctional SR {Kaisto, 2003 #385}. Part of the dots of CLIMP-63 (around 40%) co-localize with Trisk 95 at the triads. Hence, although CLIMP-63 has been described in mono-nucleated cells as a rough ER protein partitioning into ER sheets, it seems that part of muscle CLIMP-63 is located at the junctional SR.

The luminal segments of CLIMP-63 are composed of coiled-coil domains with a high propensity to form homo- or hetero-oligomers {Klopfenstein, 2001 #366}. Triadin also exhibit in its luminal region a coiled-coil domain that we showed previously to be involved in its ER/SR shaping properties together with two cysteines. Cysteines with the coiled-coil domain were called the RLS domain, and the suppression of this domain from the Trisk 95 sequence (T95- $\Delta$ RLS mutant) nearly abolished the deformation of the ER into RLS {Fourest-Lieuvin, 2012 #364}. Here we show that CLIMP-63 and Trisk 95 interact via their respective luminal regions, and that this interaction requires the RLS domain of Trisk 95. In muscle cells, both proteins also interact directly via their luminal domains, as suggested by our co-immunoprecipitation data. These interactions involving luminal coiled-coil domains and cysteines most probably generate hetero-oligomers that would shape the SR membrane and induce this characteristic SR membrane curvature observed for cisternae. If these hetero-oligomers are important for the SR cisternae shaping, they should dissociate in the absence of triadin and this may explain the flattened morphology of cisternae observed in triadin KO muscles. Parler de la mesure du diamètre du ER en présence de T95 ??

CLIMP-63 is also a MT-binding protein. Its MT-binding domain comprises the amino acids 62 to 101 in the cytosolic part of the protein {Vedrenne, 2005 #62}. The peptide corresponding to the sole cytosolic part has been shown to behave as a MAP in vitro, with the capacity to bind to purified MTs and to induce tubulin polymerization {Klopfenstein, 1998 #368}. The MT-binding properties of CLIMP-63 seem also to be essential for ER shaping. Indeed, in the ER membrane of cultured cells, CLIMP-63 may aggregate into patches and thereby form MT binding sites of high avidity {Klopfenstein, 2001 #366}. When overexpressed, CLIMP-63 has a strong effect on the MT network, inducing bundles of stabilized MTs {Klopfenstein, 1998 #368; Vedrenne, 2006 #332; Vedrenne, 2005 #62}. Owing to its MT-binding properties, CLIMP-63 is the missing link between triadin and the MTs. Indeed, the ability of Trisk 95 to cause a reorganization of the MT network passes through CLIMP-63. To show this, we used the pseudo-phosphorylated CLIMP-MT(-) mutant, which acts as a dominant-negative mutant and could not bind the MTs anymore {Vedrenne, 2005

#62}. This CLIMP-MT(-) mutant is still able to bind Trisk 95 via its luminal domain, but it abolishes the effects of the triadin on the MT network.

In adult muscle cells, MT bundles partially co-align with triads and with CLIMP-63, which is in good agreement with the fact that CLIMP-63 may link triads to MTs. Our work on triadin KO mice shows that the overlap between CLIMP-63, MTs and triads is diminished in the absence of triadin. Furthermore, MTs appear somewhat disorganized and the overall CLIMP-63 staining is dimmer. Hence, triadin appears to be the anchor of both CLIMP-63 and MTs at the triads. Why triads have to be linked to the MT network remains an open question, (peut-être ici rallonger la sauce sur le rôle de plus en plus prépondérant des MTs dans la cellule musculaire, papiers Gomes, Oddoux, Straube) but we can speculate that MTs might have a role in the tight spatial distribution of triads all along the mature fiber. Likewise, SR cisternae have to be positioned close to a T-tubule to form each triad and MTs might also have a role in this subcellular organelle shaping. These hypotheses will have to be tested,.

## Materials and Methods

### Ethics statement

All procedures using animals were approved by the Institutional ethics committee and followed the guidelines of the National Research Council Guide for the care and use of laboratory animals.

### DNA constructs and siRNAs

Full-length rat triadin Trisk 95 (accession number #AJ243304), Trisk 51 (#AJ243303), Trisk 32 (#AJ812276) and several Trisk 95 mutants inserted into the expression vectors pcDNA3.1 (Life Technologies) or pEGFP-N1 (Clontech) have already been described {Marty, 2000 #18;Vassilopoulos, 2005 #14;Fourest-Lieuvin, 2012 #364}. To construct T95-mini-GFP, the stop codon of T95-mini in pcDNA3.1 was removed by a PCR-based method, and the amplified sequence was inserted into pEGFP-N1. For the construction of T95-lumen, the plasmid DsRed2-ER (Clontech) was digested by AgeI and BglII to remove DsRed2. The luminal domain of Trisk 95 (aa 113 to 687) was amplified by PCR with FLAG and KDEL sequences inserted at the end of the PCR fragment, which was then inserted in the AgeI/BglII digested plasmid. T95-lumen encoded by this construct is thus composed of calreticulin ER targeting peptide, luminal domain of Trisk 95, Flag and KDEL peptides, and is targeted into the lumen of the ER. CLIMP-63 plasmids were kindly provided by Hesso Farhan and Hans-Peter Hauri {Vedrenne, 2005 #62;Klopfenstein, 2001 #366}. For knockdown of CLIMP-63 in COS-7 cells, two siRNAs were designed according to {Nikonov, 2007 #367}, except that our siRNAs were based on human sequence of CLIMP-63: siRNA1 5'-CCAGAAUGAGAUUCUCAAATT-3' and siRNA2 5'-CCAAAUCCAUCAACGACAATT-3' corresponding to nucleotide positions 621-639 and 734-752 in human CLIMP-63 coding sequence, respectively. Scramble RNA (scRNA) was obtained from scrambled sequence of siRNA1 and synthesized by Invitrogen with the two siRNAs.

### Viruses

In this study, we used adenoviral-mediated gene transfer to express Trisk 95, Trisk 51 or Trisk 32 in HEK293 cells. These viruses were engineered and produced either by the Gene Vector Production Network at Genethon III (Evry, France) or by the Atlantic Gene Therapies (Nantes, France). We produced lentiviral vectors carrying either the rat Trisk 95 cDNA, the human CLIMP-63 cDNA or the cDNAs of the mutants CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-).



These lentiviral vectors were produced into HEK293T cells as previously described {Zufferey, 1997 #373;Bovia, 2003 #374} with the following modifications. High-titer lentiviral vector stocks were generated by calcium phosphate-mediated transient transfection (Clontech) of the HEK293T cells by 3 plasmids (Addgene): the transfer vector plasmid in pWPXLD, the packaging plasmid psPAX2 and the vesicular stomatitis virus G protein (VSV G) envelope protein-coding plasmid. Titers of viruses in cell culture supernatants were determined as previously described {Nguyen, 2005 #375} and were in the range of  $1-10 \times 10^7$  transducing units/ml. For all transduction experiments, cells were infected by overnight incubation with the chosen virus, at a multiplicity of infection 5. Control cells were infected with the control virus (lentivirus-GFP).

### **Antibodies**

Primary polyclonal antibodies (pAbs) used in this study are: guinea pig or rabbit pAbs against the C-terminus of rat Trisk 95 (Vassilopoulos et al., 2005); chicken pAB against GFP (Abcam); rabbit pAbs against the N-terminus of all triadin isoforms {Vassilopoulos, 2005 #14}, the C-terminus of rat RyR1 {Marty, 1994 #9}, CLIMP-63 (anti-CKAP4, Euromedex) and calnexin (Stressgen). Primary mouse monoclonal antibodies (mAbs) used are against RyR (RyR34C clone, DSHB), GFP (GFP12A6 clone, DSHB), myosin heavy chain (MF20 clone, DSHB), beta-tubulin (TUB2.1 clone, Sigma) and Flag® (M2 clone, Sigma). Secondary antibodies used for immunofluorescence studies were coupled to Alexa-Fluor 488 or Alexa-Fluor 546 (Molecular Probes); or to Cy3 or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Secondary antibodies used for western blotting were HRP-coupled rabbit pAbs (Jackson ImmunoResearch Laboratories). For western blotting after IP, TrueBlot® HRP-coupled rabbit pAbs (Rockland) were used.

### **Proteomic analyses**

Proteomic experiments were performed as previously described {Milbradt, 2014 #44}. Briefly, proteins were stacked in the top of a 4-12% NuPAGE gel (Invitrogen) before R-250 Coomassie blue (BioRad) staining and in-gel digestion using modified trypsin (Promega, sequencing grade). Resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS with Ultimate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos pro, Thermo Scientific) using a 120-min gradient. Peptides and proteins were identified through concomitant searches against the Uniprot databank (September 2014 version, Homo sapiens taxonomy, 138560 sequences) and a classical contaminants database

(homemade, 260 sequences) and the corresponding reversed databases using Mascot (version 2.5). The IRMa software, version 1.31.1 {Dupierris, 2009 #45}, was used to filter the results: conservation of rank 1 peptides, peptide identification FDR < 1% (as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy), and minimum of 1 specific peptide per identified protein group. Filtered results were uploaded into a relational mass spectrometry identification database before performing a compilation, grouping and comparison of the protein groups from the different samples using a homemade tool (hEIDI). Differential analysis of GFP and Trisk 95-GFP co-immunoprecipitation eluates was performed using extracted spectral counts (SC) and specific spectral counts (SSC). A protein was considered as a potential binding partner if it was identified with a minimum of 10 SC and if its corresponding SC and SSC were enriched at least 4 times in Trisk 95-GFP sample compared to GFP one.

### **Cell culture and transfection**

COS-7 and HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies). Transient transfections were carried out with of DNA using Exgen 500 reagent (Euromedex), according to the manufacturer's protocol. After 28 hours of transfection, cells were treated for either IP or immunofluorescence. For IP, cells grown in 60 mm diameter plates were collected by trypsinization, rinsed once in PBS and stored at -20°C until used. For immunofluorescence, cells grown on coverslips were fixed for 6 min in methanol at -20°C. Human immortalized myoblasts were engineered and produced by the Institute of myology (Paris, France). Mouse satellite cells were obtained by trypsinization of skeletal muscle fragments of 1-day-old mice. These satellite cells were seeded on matrigel-coated Ibidi  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> (Biovalley). When human or mouse myoblasts were confluent (approximately 24 h after seeding), differentiation was induced by changing the culture medium for Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% horse serum and 1% penicillin-streptomycin. The differentiation days are counted from this medium change. Myotubes were fixed after 5-10 days of differentiation with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) in PBS for 20 min and permeabilized with 1% TritonX-100 in PBS for 20 min.

### **Preparation of muscle fibers**

Flexor Digitorum Brevis (FDB) muscle fibers were dissociated as described previously {Fourest-Lieuvin, 2012 #364} with the following modifications. Dissected FDB

muscles were digested for 60-90 minutes in collagenase, and dissociated fibers were seeded on matrigel-coated Ibidi  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> for 1 hour at 37°C and were fixed for 20 minutes in 4% paraformaldehyde in PBS. Fibers were then permeabilized for 45 minutes with 1% Triton X-100 in PBS at 30°C.

### **Immunofluorescence microscopy**

Cells and FDB fibers were saturated in PBS supplemented with 0.1% TritonX-100, 0.5% bovine serum albumin, and 2% goat serum for 30 minutes. Cells were incubated with primary antibodies in PBS-0.1% Tween20 either at room temperature for 1 hour (model cells) or at 4°C overnight (differentiated myotubes and FDBs). After incubation for 1-3 hour(s) at room temperature with fluorescent secondary antibodies, nuclei were stained with Hoechst33258 (Life Technologies). Coverslips were mounted on microscope slides with FluorSave<sup>TM</sup> reagent (Calbiochem). Images were captured on a Zeiss LSM710 confocal microscope or Leica SPE confocal microscope.

### **Preparation of microsomes**

Tibialis anterior skeletal muscle was collected from adult mouse hindlimb. Crude microsomes were prepared with slight modifications of the procedures previously described {Marty, 2000 #18}. Indeed, after muscle homogenization in a 30-ml solution made of 200 mM sucrose, 20 mM HEPES (pH 7.4), 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM leupeptin, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM diisopropyl fluorophosphate (DFP), the low-speed (10 min at 1,500 g) pellet was discarded, and microsomes were obtained after 50 min of centrifugation at 41,000 g. They were homogenized at 8–10 mg/ml in 0.1 M NaCl, 30 mM imidazole (pH 6.8) and 8% sucrose and stored in liquid nitrogen.

### **Immuno-precipitation (IP), SDS-PAGE and western blotting**

Mouse skeletal muscle microsomes or transfected HEK293 cells were lysed by sonication (10 X 1 second) in lysis buffer (1mM EDTA, 15 mM NaCl pH7.1). Samples (3 mg/ml) were then solubilized for 30 min at 4°C in a buffer composed of 0.9 M NaCl, 1.6% CHAPS, 0.1% phospholipids (Avanti Polar Lipids), 20 mM Pipes (pH 7.1), 200  $\mu$ M PMSF, and 1 mM DFP, and the solubilized proteins were diluted with 1 volume of PBS and 1 volume of H<sub>2</sub>O. IPs were then performed with the chosen antibody and Dynabeads® Protein G (Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. All Triadin or CLIMP-63 constructs fused with GFP were immuno-precipitated from transfected HEK293 cell extracts using GFP-

Trap® (Chromotek), according to the manufacturer's protocol. The immuno-precipitated proteins were then analyzed by SDS-PAGE (5-15% gradient gels, Bio-Rad Laboratories) and Western blotting performed with antibodies described above and with ECL substrate reagent (Thermo Scientific). Acquisitions were done using a ChemiDoc XRS apparatus (Bio-Rad) and quantification was performed using Quantity One software.

### **Co-localization analysis on immunofluorescence images of FDB muscle cells**

To quantify CLIMP-63 co-localization with Trisk 95 or RyR1, or MT co-localization with RyR1, a binary mask corresponding to the overlap between the green and the red stainings was generated with a homemade ImageJ macro. This mask corresponded to the surface of co-localization on one confocal plane. A ratio was calculated between the surface of co-localization and the total green surface. Results were given as percentages and averaged from at least three independent experiments.

### **Statistics**

All statistical analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA).

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Française contre les Myopathies (AFM), and the foundation Daniel Ducoin. Proteomic experiments were partly supported by the Agence Nationale pour la Recherche (Investissement d'Avenir Infrastructures, ProFi project ANR-10-INBS-08-01). We are grateful to Hesso Farhan and Hans-Peter Hauri for giving us CLIMP-63 plasmids. We thank Oriana Sarraute, Julie Brocard for technical help and Eric Denarier for adaptation of a Macro in Image J to quantify co-localizations. A.O. and M.S. were supported by a grant from the AFM.

## References

### Figure legends

#### **Fig. 1. Endogenous CLIMP-63 associates with transfected Trisk 95 in COS-7 and HEK293 cells.**

(A) Trisk 95 (T95) was expressed in COS-7 cells before fixation and permeabilization. Cells were labeled with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green), T95 (red) and  $\beta$ -tubulin to label MTs (gray). The CLIMP-63 and T95 stainings are merged in the right panel. Insets 1 and 2 are zoomed in lower panel for each image. Cells expressing T95 exhibit an ER deformation called rope-like structures (RLS) and a disorganization of MTs (insets 2), which is not the case in cells that do not express T95 (insets 1). Endogenous CLIMP-63 co-localizes with T95 in RLS in T95-expressing cells (right panel and insets 2). Scale bar, 20  $\mu$ m. (B) HEK293 cells were either not transfected (lanes 1, 2) or transfected with the plasmid coding for T95 (lanes 3, 4) before extraction (lanes 1, 3) and immunoprecipitation (IP) with an antibody to CLIMP-63 (lanes 2, 4). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left.

#### **Fig. 2. The luminal part of Trisk 95 is important for its association with CLIMP-63.**

(A) Schematic representation of CLIMP-63 (CLIMP), Trisk 95 (T95) and constructs of T95 deleted either for the cytosolic domain ( $\Delta$ cyto-T95), the cytosolic and transmembrane domains (T95-lumen), the luminal domain (T95-mini) or the RLS-specific sequences (T95- $\Delta$ RLS, coiled-coil domain removed and cysteines mutated) The T95-lumen construct is fused to the Flag peptide in its C-terminus. Specific sequences in CLIMP-63 and T95 are highlighted: transmembrane domains (TM, yellow boxes), coiled-coil domains (CC, gray boxes) and the KEKE domain in triadin (brown box). Numbers indicate amino acids. (B) COS-7 cells were co-transfected with CLIMP-63 and one of the Trisk 95 construct: wild type T95 (B1),  $\Delta$ cyto-T95 (B2), T95-lumen (B3), T95-mini (B4) or T95- $\Delta$ RLS (B5). After fixation, cells were stained with antibodies against CLIMP-63 and Trisk 95 or Flag. T95,  $\Delta$ cyto-T95 and T95-lumen co-localize with CLIMP-63 in RLS whereas T95-mini and T95- $\Delta$ RLS do not. Scale bar, 10  $\mu$ m. (C) Quantification of transfected cells exhibiting RLS with both CLIMP-63 and T95, or with both CLIMP-63 and one of the deletion mutants of T95. \*\*P<0.01, Mann-Whitney test, error bars are SEM, n=3 to 5 counts of 100 transfected cells in

at least 2 experiments for each condition. (D, E and F) Co-IP experiments performed on extracts of HEK293 cells expressing the indicated proteins. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot. (D) T95,  $\Delta$ cyto-T95 or T95- $\Delta$ RLS were immuno-precipitated with an antibody to T95 (IP Triadin). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. (E) T95-GFP or T95-mini-GFP were immuno-precipitated with the kit anti-GFP trap (IP GFP). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with GFP (upper and middle) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. (F) Trisk isoforms T95, T51 or T32 (depicted in G) were immuno-precipitated with an antibody to the N-terminus of triadins (IP Triadin). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with the same antibody as for IP (upper) and with CLIMP-63 antibody (lower panel). (G) Schematic representation of triadin isoforms, Trisk 95 (T95), Trisk 51 (T51) and Trisk 32 (T32), with specific sequences as in (A).

**Fig. 3. The luminal domain of CLIMP-63 is responsible for the association with Trisk 95.**

(A) Schematic representation of constructs of CLIMP-63, with EGFP inserted in place of the luminal domain (CLIMP- $\Delta$ lumen) or in place of the cytosolic domain ( $\Delta$ cyto-CLIMP). Specific sequences are as in Fig. 2A. (B) COS-7 cells were co-transfected with T95 and either CLIMP- $\Delta$ lumen (B1) or  $\Delta$ cyto-CLIMP (B2). After fixation, cells were stained with antibodies against CLIMP-63 (green) and T95 (red). Merged images are shown. Scale bar, 10  $\mu$ m. (C) Co-IP experiments performed on extracts of HEK293 cells expressing the indicated proteins. CLIMP- $\Delta$ lumen or  $\Delta$ cyto-CLIMP were immuno-precipitated with the kit anti-GFP trap (IP GFP). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and GFP (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

**Fig. 4. Trisk 95 phenotype is abolished by a mutant of CLIMP-63 that does not bind to MTs.**

(A) Schematic representation of CLIMP-63 in which three serines at positions 3, 17 and 19 of the cytosolic N-terminal part were mutated either in alanines (mutant CLIMP-MT(+)) or in glutamic acids (mutant CLIMP-MT(-)). CLIMP-MT(+) can bind MTs while CLIMP-MT(-) cannot. (B) COS-7 cells were co-transfected with T95 and either CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-) and labeled with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green), T95 (red) and  $\beta$ -tubulin to label MTs (gray). All cells co-expressing T95 and CLIMP-MT(+) present RLS in which both proteins are co-localized (zooms 1), and their MTs are

disorganized. In cells co-expressing T95 and CLIMP-MT(-), both proteins are co-localized in the ER (zooms 2) but the ER never exhibit RLS and the MT network appears normal. Thus, CLIMP-MT(-) behaves as a dominant-negative mutant and abolishes the RLS phenotype induced by T95. Scale bar, 20  $\mu$ m. (C) Quantification of transfected cells exhibiting RLS. Cells were either transfected with T95, CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-) separately, or co-transfected as indicated. Quantifications were also performed on non-transfected cells as a control (first column).  $**P < 0.01$ , Mann-Whitney test, error bars are SEM, n=4 to 5 counts of 100 transfected cells in at least 2 experiments for each condition. (D) Co-IP experiments performed on extracts of HEK293 cells expressing the indicated proteins. CLIMP-MT(+) or CLIMP-MT(-) were fused to EGFP in this experiment and were immuno-precipitated with the kit anti-GFP trap (IP GFP). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and GFP (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

**Fig. 5. In muscle cells, CLIMP-63 and T95 stainings partly overlap.**

(A) Isolated FDB muscle fibers from rat were double stained with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green) and Trisk 95 (T95, red). Each image represents one single confocal plane. Scale bar, 5  $\mu$ m. The inset in the merged panel is zoomed (fourth panel). Scale bar in the zoom, 2.5  $\mu$ m. The binary image (mask, right panel) represents in black the CLIMP-63 staining area that co-localizes with the T95 staining on the zoomed image. (B) The fluorescence intensity as a function of distance was plotted for six successive triads in the fiber. The green curve corresponds to CLIMP-63, and the red curve to T95. (C) Percentages of CLIMP-63 staining area co-localizing with T95 labeling on confocal images of FDB muscle fibers of rats and mice, quantified by using masks as illustrated in (A). Quantifications were performed on 7 images from 2 experiments on rat FDB and 11 images from 3 experiments on mouse FDB. (D) Co-IP experiments performed on mouse TA muscle microsomes (lysate, lane 1) with an antibody to T95 (IP T95, lane 2). Control IP was performed with pre-immune IgGs (lane 3). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with T95 (upper) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

**Fig. 6. Absence of triadin results in delocalization of CLIMP-63.**

(A) Isolated FDB muscle fibers from WT or triadin-KO mice were double-stained with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green) and the ryanodine receptor (RyR) to label

triads (red). Each image represents one single confocal plane. A zoom of the merged image is shown (fourth panel). Scale bars, 2  $\mu\text{m}$ . The binary image (mask, right panel) represents in black the CLIMP-63 staining area that co-localizes with the RyR staining in the zoomed image. (B) The fluorescence intensity as a function of distance was plotted for three successive triads in fibers of WT (upper) or triadin-KO (lower panel) mice. The green curve corresponds to CLIMP-63, and the red curve to RyR. (C) Percentage of CLIMP-63 staining area co-localizing with RyR labeling on confocal images of FDB muscle fibers of WT or triadin-KO mice. \*\*\* $P < 0.001$ , Mann-Whitney test, error bars are SEM,  $n = 11$  and 6 quantified images for WT and KO conditions, respectively. Images were from 3 different dissections. (D) Co-IP experiments performed on WT (lane 1) or triadin-KO (lane 2) mouse TA muscle microsomes with an antibody to RyR (IP anti-RyR). Immunoblot analysis of co-IP proteins was performed with RyR (upper), T95 (middle) and CLIMP-63 (lower panel) antibodies. Molecular weights are indicated in the left of each immunoblot.

**Fig. 7. Disorganization of microtubule network in muscles of triadin KO mice.**

(A) Isolated FDB muscle fibers from WT or triadin-KO mice were double-stained with antibodies against tubulin to label MTs (green) and the ryanodine receptor (RyR) to label triads (red). Each image represents one single confocal plane. A zoom of the merged image is shown (fourth panel). Scale bars, 2.5  $\mu\text{m}$ . The binary image (mask, right panel) represents in black the MT staining area that co-localizes with the RyR staining in the zoomed image. (B) The fluorescence intensity as a function of distance was plotted for three successive triads in the fiber. The green curve corresponds to MTs, and the red curve to RyR. (C) Percentage of MT surface co-localizing with RyR labeling on confocal images of FDB muscle fibers of WT or triadin-KO mice. \*\*\* $P < 0.001$ , Mann-Whitney test, errors bars are SEM,  $n = 9$  and 6 quantified images for WT and KO conditions, respectively. Images were from 3 different dissections.

**Fig. S1. Quantification of cells, either transfected or co-transfected, exhibiting RLS.**

COS-7 cells were mono-transfected with T95,  $\Delta\text{cyto-T95}$ , T95-lumen, T95-mini, T95- $\Delta\text{RLS}$ , CLIMP-63,  $\Delta\text{cyto-CLIMP}$ , or CLIMP- $\Delta\text{lumen}$ ; or they were co-transfected with T95 and one of the CLIMP-63 construct. After fixation, cells were stained with antibodies against Trisk 95 or Flag and against CLIMP-63. Cells exhibiting RLS were counted among

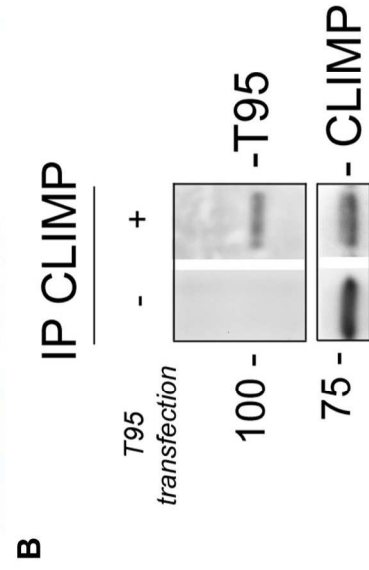
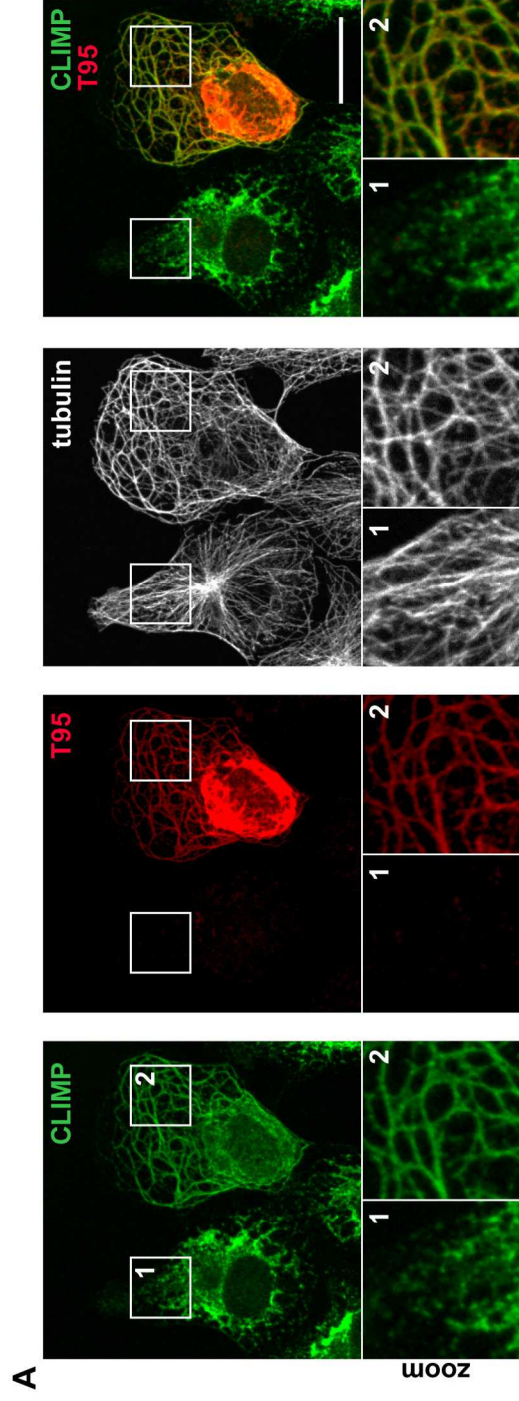


transfected cells. Error bars are SEM, n=3 to 9 counts of 100 transfected cells in at least 2 experiments for each condition.

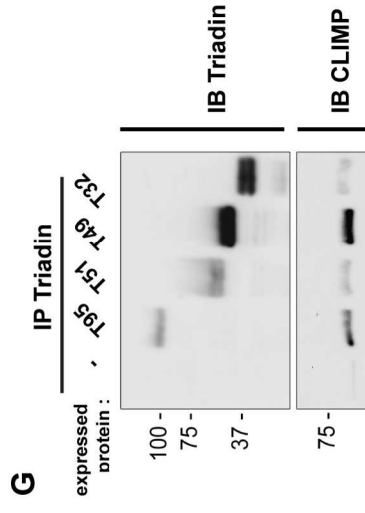
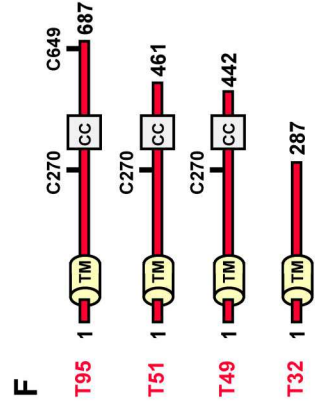
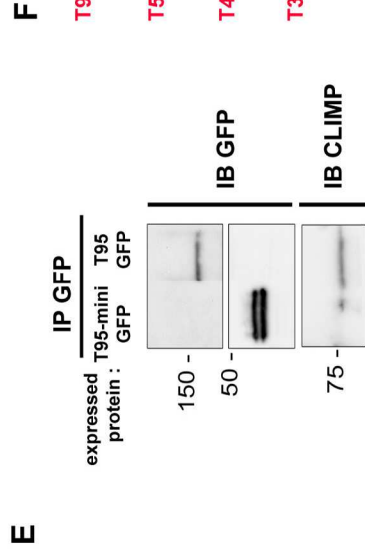
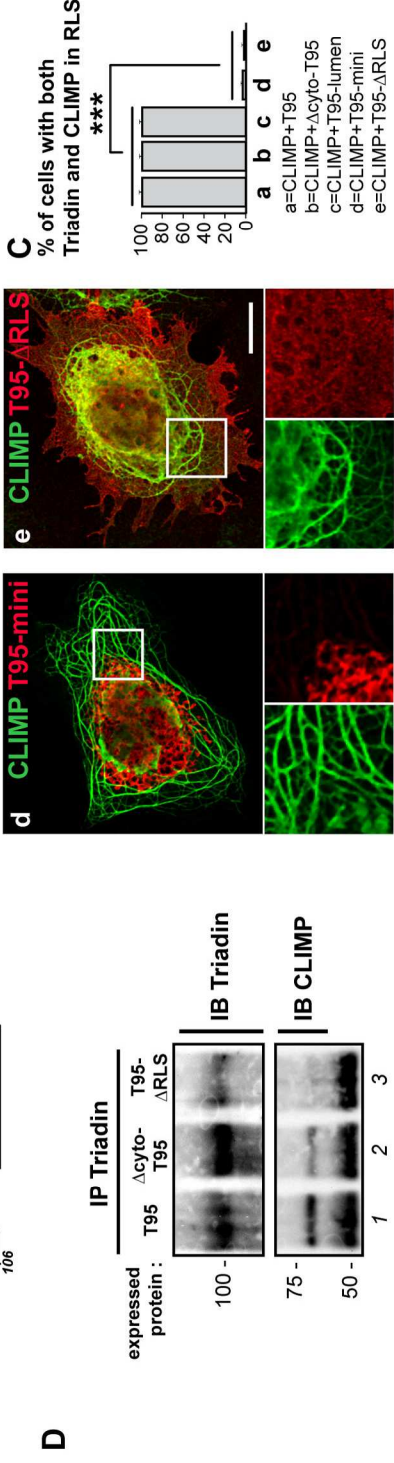
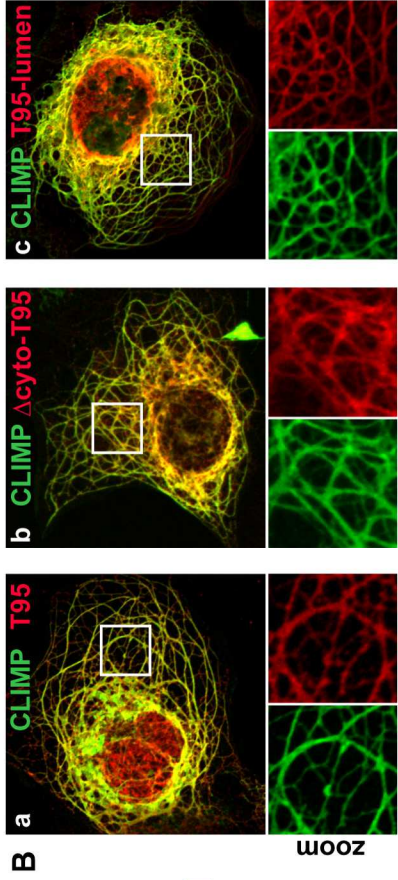
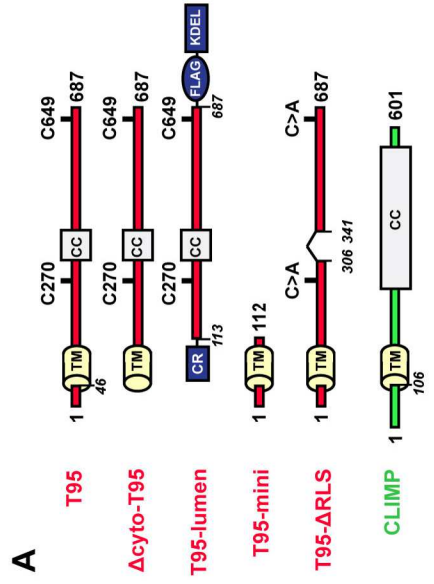
**Fig. S2. The knock-down of CLIMP-63 by siRNAs is not efficient enough to abolish the RLS phenotype.**

COS-7 cells were treated for 24h either with a siRNA targeting CLIMP-63 (siRNA KD) or with a scrambled siRNA (Sc) used as a control. They were then transfected with a plasmid expressing Trisk 95 (T95) for another 24h (i.e. 48h of treatment with siRNAs). Cells were either fixed for immunofluorescence (A, D, E) or scraped for cell extraction and western blotting (B, C). (A, D) Cells were labeled with antibodies against CLIMP-63 (CLIMP, green), T95 (red) and tubulin (gray). Scale bars, 20  $\mu$ m. (B) Immunoblots for endogenous CLIMP-63 and calnexin from siRNA-treated COS-7 cell extracts. (C) Quantification of CLIMP-63 expression performed on 4 immunoblots. The siRNA KD was able to lower the amount of CLIMP-63 by 70 %. \* $P < 0.05$ , Mann-Whitney test, errors bars are SEM. (D) Image showing that among KD treated cells, the vast majority of cells do not exhibit CLIMP-63 staining anymore (insets 1, see also image in A, right), but it is still possible to find cells exhibiting RLS with little amounts of CLIMP-63 and with T95 in these ER structures (insets 2). These RLS co-align with bundled MTs. (E) Cells exhibiting RLS were counted among T95 transfected cells. ns,  $P > 0.05$ , Mann-Whitney test, error bars are SEM, n=3 to 5 counts of 100 transfected cells in at least 2 experiments for each condition.

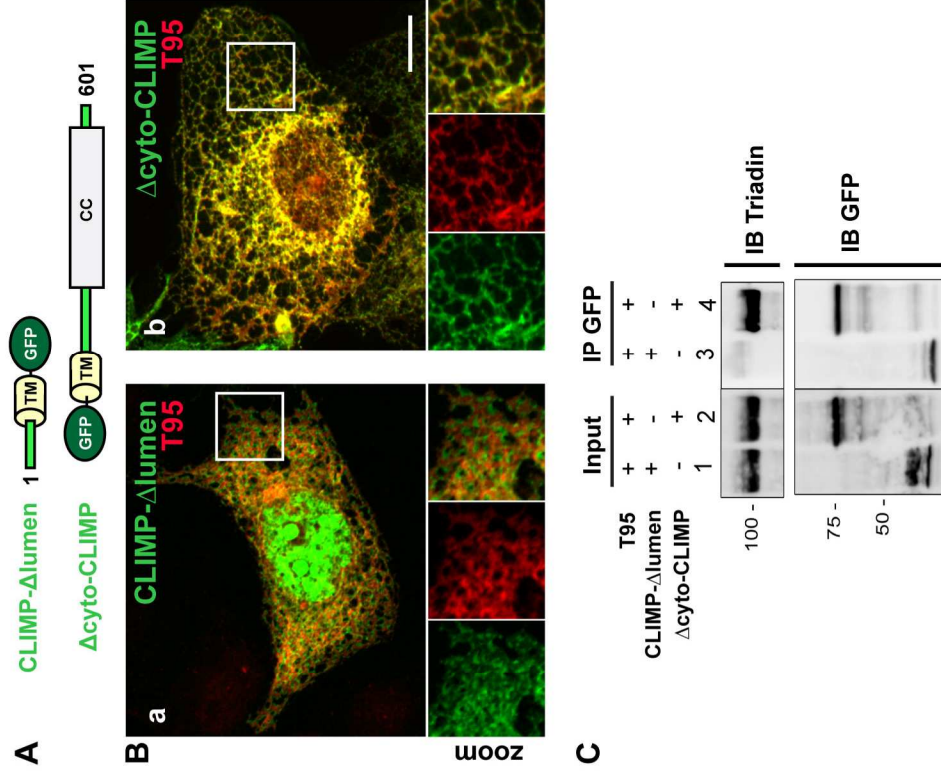
**Table S1**



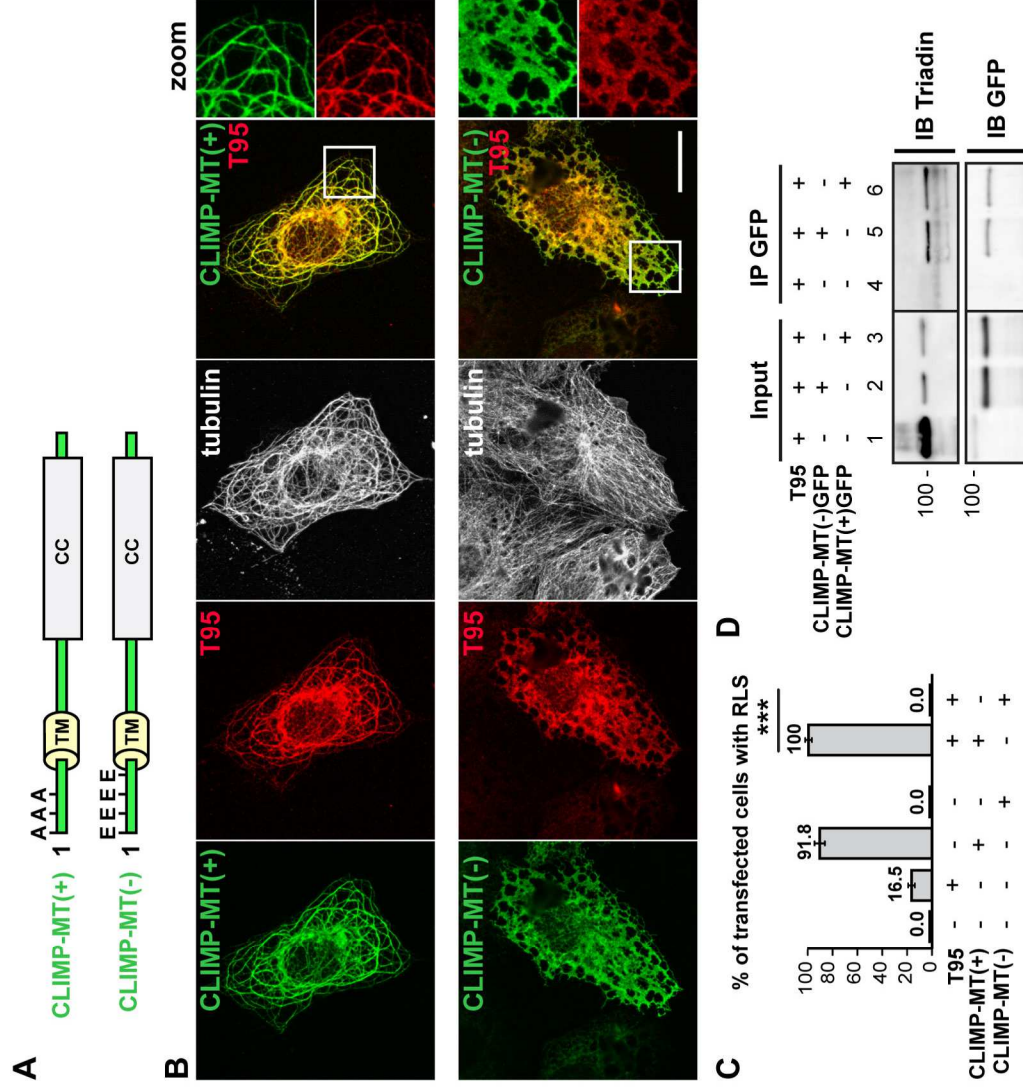
**Fig. 1**



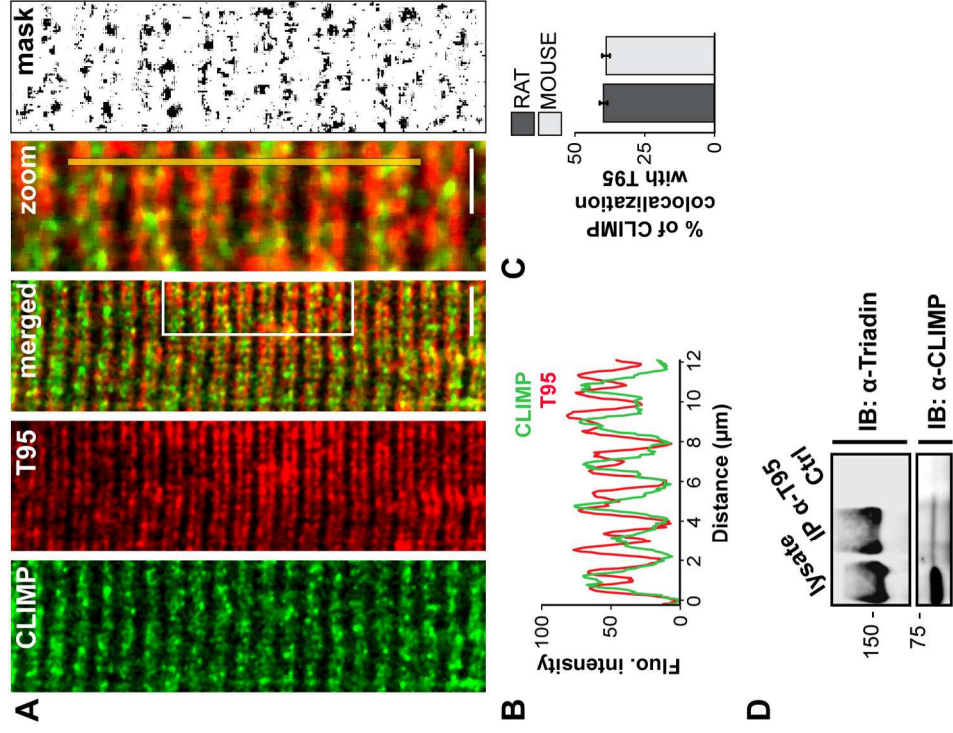
**Fig. 2**



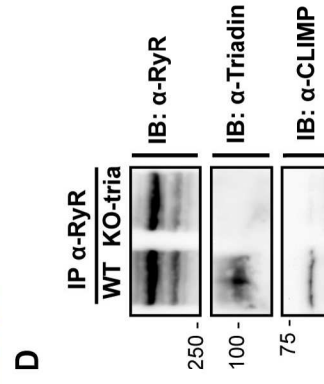
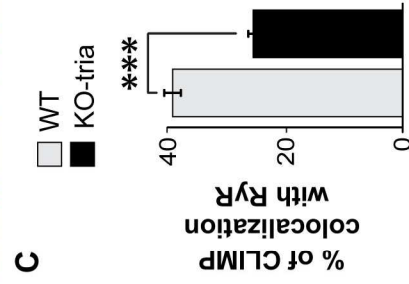
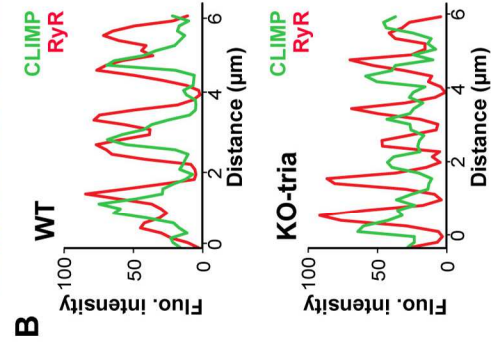
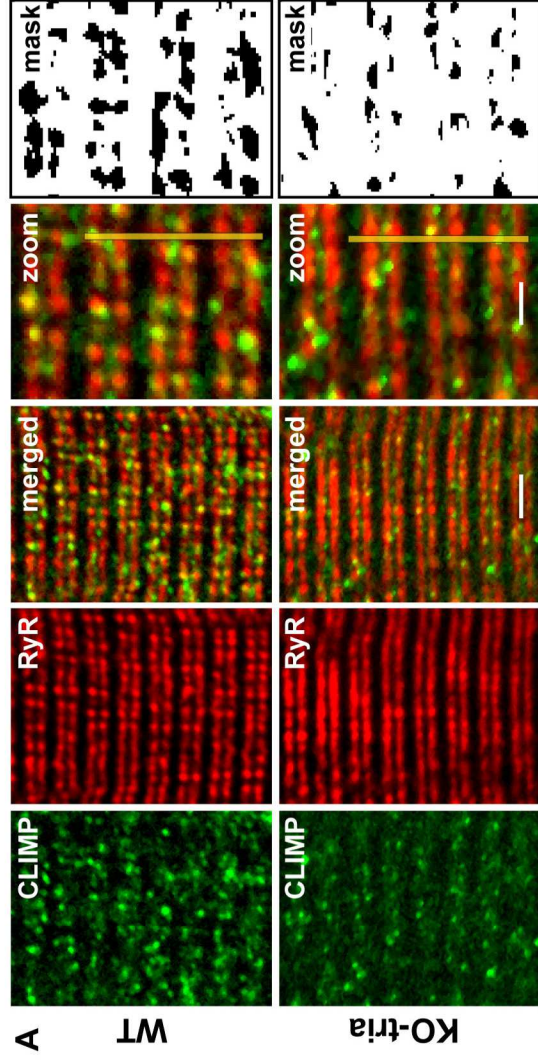
**Fig. 3**



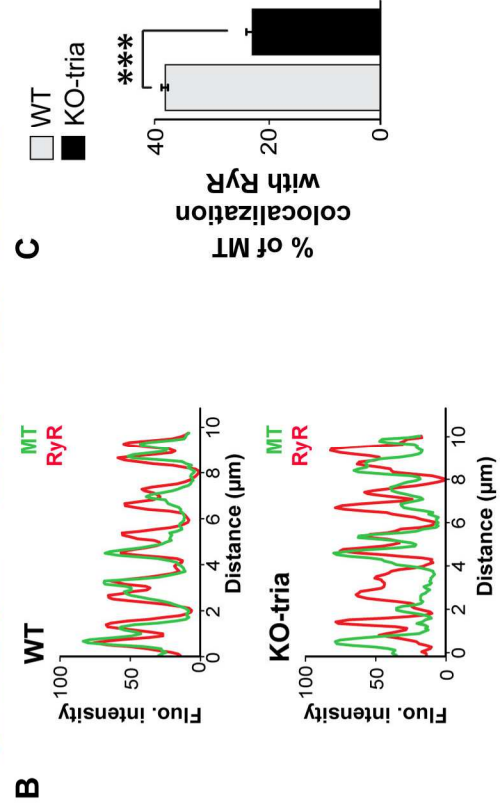
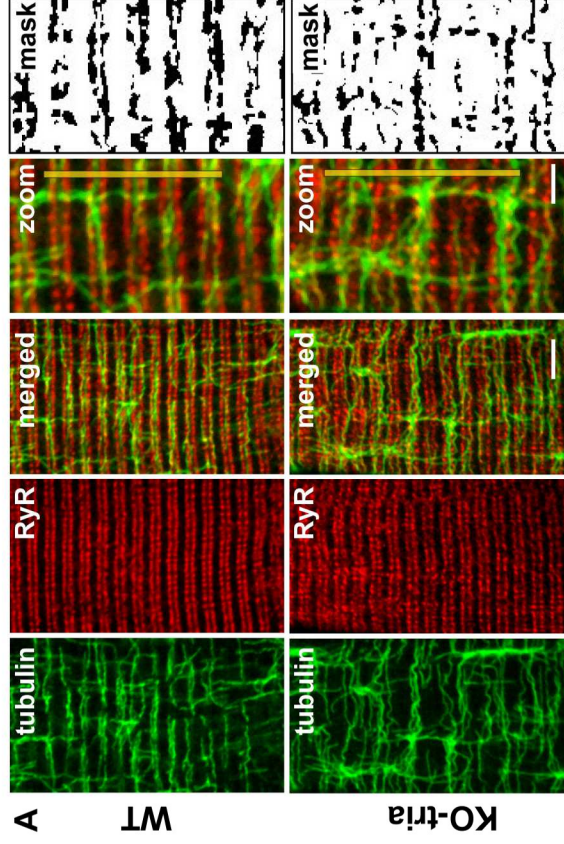
**Fig. 4**



**Fig. 5**

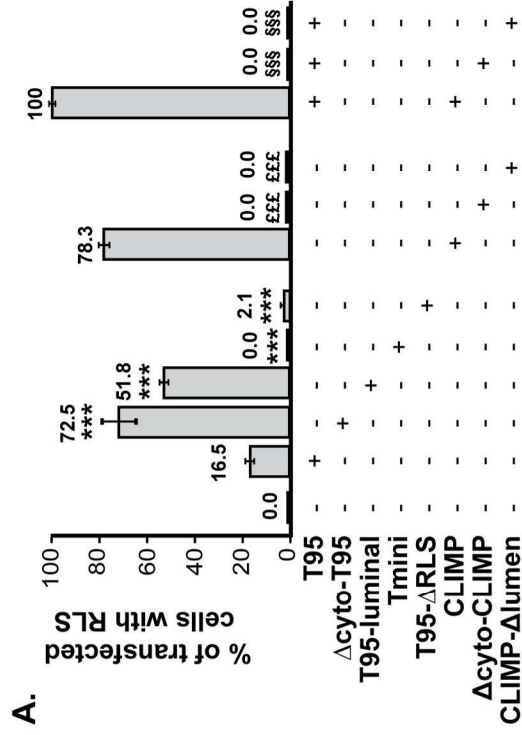


**Fig. 6**

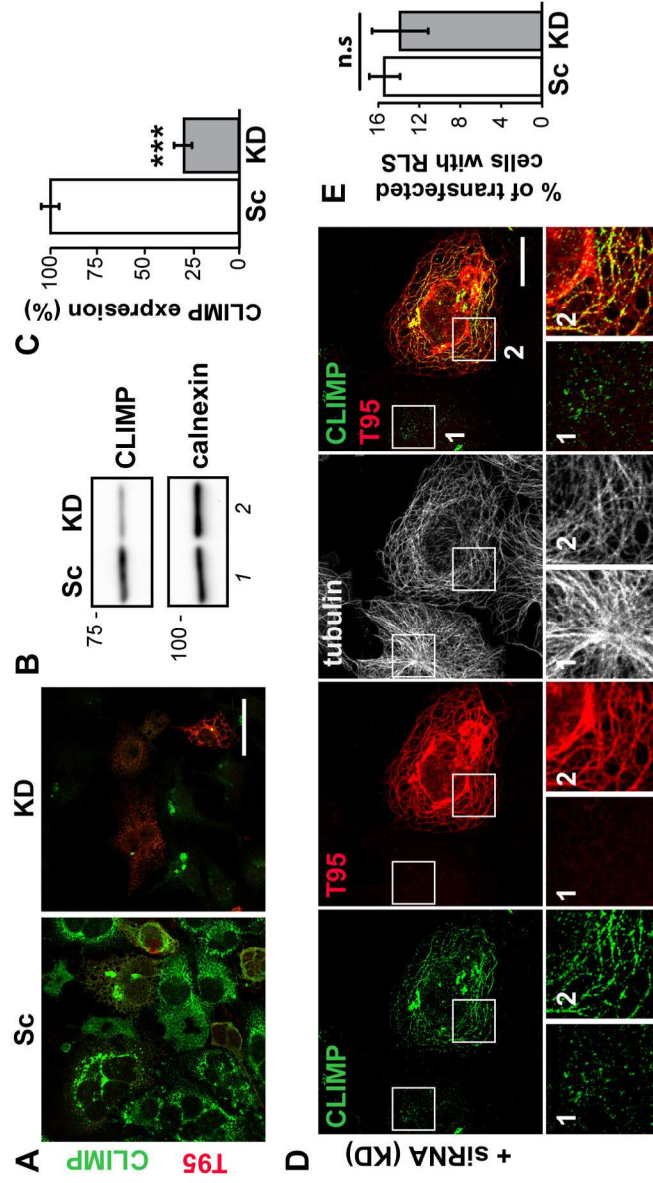


**Fig. 7**





**S1**



**S2**



Résumé:

**Un lien entre les triades et les microtubules dans la cellule musculaire :  
Rôle de la triadine et de CLIMP-63**

La contraction musculaire est provoquée par un relâchement massif de calcium à partir du reticulum sarcoplasmique (RS) des cellules musculaires. Ce relâchement de calcium réalisé par le récepteur de la ryanodine (RyR1), s'effectue dans des structures membranaires spécialisées et très organisées : les triades. Cette architecture spécifique est essentielle à l'activité correcte de RyR1. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la formation et le maintien des triades ne sont pas connus. La triadine, qui est une protéine localisée dans la membrane du RS et qui est associée à RyR1, pourrait jouer un rôle dans la structure du reticulum sarcoplasmique pour permettre un relâchement de calcium efficace. L'équipe a montré que l'ablation du gène de la triadine chez la souris induisait une altération des relâchements de calcium et une modification de la forme des triades. Nous avons montré que la triadine pouvait indirectement interagir avec les microtubules et qu'elle pourrait ancrer le RS aux microtubules (Fourest-Lieuvain, J Cell Science, 2012). Par analyse en spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec la triadine, nous avons identifié un nouveau partenaire de la triadine, CLIMP-63 qui pourrait être impliqué dans cette fonction. CLIMP-63 est décrite comme une protéine capable d'ancrer le reticulum aux microtubules et de maintenir la forme du reticulum endoplasmique. Nous avons ensuite confirmé son interaction avec la triadine par différentes approches dans différents modèles cellulaires. L'étude et la caractérisation de CLIMP-63 dans le muscle sont tout à fait innovantes et nous avons étudié les conséquences de l'association triadine/CLIMP-63 pour la fonction du muscle et dans la formation ou la maintenance des triades.

*Mot Clefs* : Triadine / CLIMP-63 / microtubules / triade / reticulum / muscle

---

Abstract:

**Link between triads and microtubules in the muscle cells:  
Role of triadin and the shaping protein CLIMP-63**

Muscle contraction is achieved when an efficient excitation signal at the plasma membrane triggers intracellular calcium release. This process called "excitation-contraction (E-C) coupling" relies on a macromolecular protein complex, spanning the plasma membrane and the sarcoplasmic reticulum (SR), containing the calcium channel of the SR, the ryanodine receptor (RyR1). This calcium release complex is present exclusively in highly organized membrane structures called triads. A triad is composed of two SR terminal cisternae surrounding a plasma membrane transverse-tubule. This architecture is essential to sustain the activity of the calcium channel RyR1, which is located in the membrane of SR terminal cisternae. However, little is known about the molecular mechanisms allowing the formation and maintenance of SR terminal cisternae. Triadin is a member of this complex, present in the SR membrane and interacting with RyR1. Deletion of the triadin gene leads to partial disorganisation of SR membranes in skeletal muscles, with abnormal orientation of part of the triads. Triadin could play a role in the structure of sarcoplasmic reticulum to allow efficient E-C coupling. We have shown that triadin could indirectly interact with the microtubules, and therefore anchor the sarcoplasmic reticulum to the microtubule network (Fourest-Lieuvain, J Cell Science, 2012). Using mass spectrometry analysis of proteins co-immunoprecipitated with triadin, we have identified a new partner of triadin, CLIMP-63 which could be involved in this function. CLIMP-63 is a shaping protein able to mediate the anchoring of the reticulum to microtubules and to maintain the shape of endoplasmic reticulum. We have dissected the interacting domains between CLIMP-63 and triadin, and study the consequences of this association for muscle function, and triad formation or maintenance.

*Key words*: Triadin / CLIMP-63 / microtubules / Triad / reticulum / muscle