



HAL
open science

Signalisation calcique et couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique : modulation par certains phosphoinositides et altérations associées dans deux myopathies centronucléaires

Candice Kutchukian

► To cite this version:

Candice Kutchukian. Signalisation calcique et couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique : modulation par certains phosphoinositides et altérations associées dans deux myopathies centronucléaires. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1148 . tel-01920316

HAL Id: tel-01920316

<https://theses.hal.science/tel-01920316>

Submitted on 13 Nov 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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1148

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 205

(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)

Spécialité de doctorat : Biologie

Discipline : Physiologie

Soutenue publiquement le 21/09/2018, par :

Candice Kutchukian

Signalisation calcique et couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique : modulation par certains phosphoinositides et altérations associées dans deux myopathies centronucléaires

Devant le jury composé de :

MARTY, Isabelle
GOMEZ, Ana-Maria
BUJ-BELLO, Ana
GIESELER, Kathrin
BITOUN, Marc

Directrice de Recherche INSERM
Directrice de Recherche INSERM
Directrice de Recherche INSERM
Professeure des Universités
Directeur de Recherche INSERM

Président.e

Rapporteure
Rapporteure
Examinatrice
Examinatrice
Examineur

JACQUEMOND, Vincent

Directeur de Recherche CNRS

Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

Signalisation calcique et couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique : modulation par certains phosphoinositides et altérations associées dans deux myopathies centronucléaires

Le couplage excitation-contraction (EC) du muscle squelettique est dû à un efflux de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytosol en réponse à une dépolarisation de la membrane plasmique, ce qui déclenche l'activation des myofilaments. Des mutations dans le gène codant pour la phosphoinositide (PtdInsP) 3-phosphatase myotubularine (MTM1) sont associées à la myopathie centronucléaire liée à l'X (XL-CNM), caractérisée par une faiblesse musculaire très sévère limitant l'espérance de vie de quelques mois à quelques années. Un modèle murin déficient en MTM1 (*Mtm1* KO) a été généré et reproduit les principales caractéristiques de la maladie humaine. Une altération du couplage EC a été rapportée dans les fibres *Mtm1* KO et joue probablement un rôle critique dans la faiblesse musculaire associée à la XL-CNM, cependant la fonction exacte de MTM1 et les mécanismes pathologiques de la XL-CNM restent peu connus.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a visé à comprendre les interactions fonctionnelles entre les PtdInsPs et l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique, avec un intérêt spécifique pour les implications pathologiques. L'étude du couplage EC et de l'homéostasie calcique s'est basée sur une combinaison d'électrophysiologie et de détection du calcium en microscopie confocale, sur fibres musculaires isolées de souris sauvages et transgéniques.

Dans un premier temps, nous avons testé les conséquences d'une réduction rapide du taux de PtdIns(4,5) P_2 dans la membrane plasmique sur la fonction du couplage EC. Pour cela, nous avons exprimé dans les fibres musculaires de souris sauvages une PtdInsP phosphatase sensible au potentiel, la Ci-VSP. Nos résultats ont montré une altération de l'efflux calcique du RS en réponse à de fortes dépolarisations activant la phosphatase, démontrant l'implication du PtdIns(4,5) P_2 dans la régulation du couplage EC et de l'homéostasie calcique.

Dans un deuxième temps, une caractérisation complète des défauts de signalisation calcique et du couplage EC a été réalisée dans les fibres musculaires isolées de souris *Mtm1* KO. Nos résultats montrent que l'efflux calcique est d'amplitude réduite, est retardé et est spatialement hétérogène. L'inhibition pharmacologique de l'activité PtdInsP 3-kinase améliore ces défauts *in vitro* et la survie des souris *in vivo*, suggérant que l'accumulation des substrats de MTM1 participe au défaut du couplage EC. Ces résultats montrent par ailleurs le bénéfice thérapeutique d'une approche pharmacologique aux inhibiteurs d'activité PtdInsP 3-kinase. Enfin, nous avons testé si ces altérations

du couplage EC étaient communes à la XL-CNM et à une forme plus modérée (autosomique dominante) de la CNM, associée à des mutations dans le gène *DNM2*. La même étude du couplage EC a été réalisée sur les fibres musculaires du modèle murin KI-*Dnm2*^{R465W} et a révélé certaines altérations similaires à celles reportées dans le modèle *Mtm1* KO (par exemple le retard de l'efflux calcique) pouvant contribuer à la faiblesse musculaire. Cependant, d'autres défauts (altérations structurales, réduction de l'efflux calcique) affectent plus sévèrement le modèle *Mtm1* KO, et pourraient être déterminants dans la différence de sévérité entre les deux formes de CNM.

MOTS-CLES : Muscle squelettique ; Couplage excitation-contraction ; Phosphoinositides ; Myopathie myotubulaire ; Myopathie centronucléaire ; Calcium.

Institut NeuroMyoGène
CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - Université Claude Bernard Lyon 1
8 avenue Rockefeller
69008 Lyon

Abstract

Calcium signaling and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: phosphoinositides implication and related alterations in two centronuclear myopathies

Excitation-contraction (EC) coupling in skeletal muscle is the process through which plasma membrane depolarization leads to Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum, which triggers activation of the contractile machinery. Mutations in the genes encoding the phosphoinositide (PtdInsP) 3-phosphatase myotubularin (MTM1) are responsible for the X-linked form of centronuclear myopathy (XL-CNM), characterized by severe muscle weakness leading to death within the first years of life. A mouse model lacking MTM1 has been generated (*Mtm1* KO) and reproduces the main features of the human condition. Interestingly, *Mtm1* KO muscle fibers suffer from defective EC coupling, which likely makes a major contribution to muscle weakness. However, the exact function of MTM1 as well as the pathological mechanisms involved in XL-CNM remain unclear.

In this context, my PhD work aimed at understanding the functional interactions between PtdInsPs and calcium homeostasis in skeletal muscle, with a specific interest for related pathological issues. The properties of EC coupling and calcium homeostasis were investigated with a combination of electrophysiology and confocal calcium imaging, on muscle fibers isolated from control and transgenic mouse models of CNMs.

In a first study, we investigated the consequences of a rapid plasma membrane PtdIns(4,5) P_2 depletion on EC coupling function. For this, we expressed a voltage sensing PtdInsP-phosphatase (Ci-VSP) in muscle fibers from control mice and we showed that VSP activation by strong depolarization alters SR Ca^{2+} release, demonstrating a role of PtdIns(4,5) P_2 in the proper regulation of EC coupling and calcium homeostasis.

In a second investigation, we made a complete characterization of calcium signaling and EC coupling properties in isolated muscle fibers from *Mtm1* KO mice. We demonstrated that SR Ca^{2+} release is depressed, delayed and spatially heterogeneous in the diseased fibers. Moreover, we showed that pharmacological inhibition of PtdInsP 3-kinase activity alleviates these defects *in vitro* and prolongs mice survival *in vivo*, suggesting that accumulation of MTM1 substrates participates to the defective EC coupling. Overall, these results provide proof of concept for the use of PtdIns 3-kinase inhibitors in XL-CNM. Finally, we tested whether XL-CNM and a less severe *DNM2*-related CNM (autosomal dominant) share specific features of defective EC coupling. Using the same approach, we studied EC coupling properties in muscle fibers isolated from the KI-*Dnm2*^{R465W} mouse

model: we demonstrated that certain defects (e.g. delayed SR Ca²⁺ release) are quantitatively similar in the two models and may contribute to muscle weakness. However, other defects (altered t-tubule network and reduction in peak Ca²⁺ release) are more severe in *Mtm1* KO fibers and may be critical in determining the severity of the corresponding CNM.

KEYWORDS: Skeletal muscle; Excitation-contraction coupling; Phosphoinositides; Myotubular myopathy; Centronuclear myopathy; Calcium.

Institut NeuroMyoGène
CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - Université Claude Bernard Lyon 1
8 avenue Rockefeller
69008 Lyon

Préambule

Mon travail de thèse a bénéficié d'un financement doctoral de l'AFM Téléthon et s'est déroulé sous la direction du Dr Vincent Jacquemond, au sein de l'Institut NeuroMyoGène. Ce laboratoire est affilié au CNRS et à l'INSERM et dirigé par Laurent Schaeffer. L'équipe que j'ai intégrée s'intéresse aux mécanismes de régulation de l'excitabilité et de la signalisation calcique dans le muscle normal et pathologique, et se compose, à la période de rédaction du présent document, de Vincent Jacquemond (Directeur de Recherche CNRS), Bruno Allard (Professeur), Christine Berthier (Maître de Conférence Universitaire), Clarisse Fuster (Postdoc), Colline Sanchez (Doctorante), Francisco Jaque (Doctorant) et Romane Idoux (Stagiaire M2). Parallèlement à ma thèse j'ai effectué une activité complémentaire d'enseignement à l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Mes travaux de thèse, présentés dans ce manuscrit, ont fait l'objet de publications et ont été présentés à l'occasion de congrès et journées scientifiques.

Publications scientifiques :

Huntoon, V., Widrick, J.J., Sanchez, C., Rosen, S.M., **Kutchukian, C.**, Cao, S., Pierson, C.R., Liu, X., Perrella, M.A., Beggs, A.H., Jacquemond, V., and Agrawal, P. (2018). SPEG-deficient skeletal muscles exhibit abnormal triad and defective calcium handling. *Hum Mol Genet.*

Kutchukian, C., Szentesi, P., Allard, B., Trochet, D., Beuvin, M., Berthier, C., Tourneur, Y., Guicheney, P., Csernoch, L., Bitoun, M., and Jacquemond, V. (2017). Impaired excitation-contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2^{R465W} mouse model of centronuclear myopathy. *J. Physiol. (Lond.)* 595, 7369–7382.

Kutchukian, C., Lo Scudato, M., Tourneur, Y., Poulard, K., Vignaud, A., Berthier, C., Allard, B., Lawlor, M.W., Buj-Bello, A., and Jacquemond, V. (2016). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca²⁺ release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 14432–14437.

Berthier, C., **Kutchukian, C.**, Bouvard, C., Okamura, Y., and Jacquemond, V. (2015). Depression of voltage-activated Ca²⁺ release in skeletal muscle by activation of a voltage-sensing phosphatase. *J. Gen. Physiol.* 145, 315–330.

Article de vulgarisation :

Kutchukian, C., Buj-Bello, A., et Jacquemond, V. (2017). L'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase : un traitement pharmacologique potentiel de la myopathie myotubulaire - Prix Master 2015 de la SFM. Cah. Myol. 60–62.

Publications de congrès :

45th European Muscle Conference – Montpellier (France)

Kutchukian C., Tourneur Y., Poulard K., Berthier C., Allard B., Buj-Bello A. and Jacquemond V. (2016) Altered Ca²⁺ homeostasis in muscle fibers from *Mtm1*-deficient mice and beneficial effect of pharmacological inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 37, S13.P17-135.

44th European Muscle Conference - Varsaw (Pologne)

Kutchukian, C., Poulard, K., Buj-Bello, A. and Jacquemond, V. (2015). Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in muscle fibers from MTM1-deficient mice: spatially discrete defects and partial rescue by phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 36, 85

59th Annual Meeting of the Biophysical Society - Baltimore (USA)

Kutchukian, C., Poulard, K., Buj-Bello, A. and Jacquemond, V. (2015). Spatially localized disruptions of voltage activated calcium release in *Mtm1*-deficient muscle fibers. *Biophysical Journal* 108, 504a

Communications de congrès :

15th French Society for Myology (SFM) – Colmar (France)

Kutchukian C., Allard B., Berthier C., Buj-Bello A., Bitoun M. and Jacquemond V. (2017) SR Ca²⁺ release alterations in two models of centronuclear myopathy.

Colloque jeunes chercheurs (AFM-Téléthon) – Paris (France)

Kutchukian C., Tourneur Y., Poulard K., Berthier C., Allard B., Buj-Bello A. et Jacquemond V. (2017) L'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase améliore les défauts de signalisation calcique et prolonge la survie des souris déficientes en myotubularine.

Gordon Research Conference – Muscle: Excitation-Contraction Coupling - Les Diablerets (Suisse)

Kutchukian C., Allard B., Berthier C., Buj-Bello A., Bitoun M., and Jacquemond V. (2017). SR Ca²⁺ release alterations in two models of centronuclear myopathy.

14th French Society for Myology (SFM) – Bordeaux (France)

Kutchukian C., Tourneur Y., Poulard K., Berthier C., Allard B., Buj-Bello A. et Jacquemond V. (2016) Signalisation calcique dans les fibres musculaires de souris déficientes en myotubularine : effet de l'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase.

45th European Muscle Conference – Montpellier (France)

Kutchukian C., Tourneur Y., Poulard K., Berthier C., Allard B., Buj-Bello A. and Jacquemond V. (2016) Altered Ca²⁺ homeostasis in muscle fibers from *Mtm1*-deficient mice and beneficial effect of pharmacological inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 37, S13.P17-135.

5th International Congress of Myology – Young investigator poster session – Lyon (France)

Kutchukian C., Tourneur Y, Poulard K, Berthier C, Allard B, Buj-Bello A, Jacquemond V (2016). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in MTM1-deficient muscle fibers exhibits reduced amplitude, slow onset and spatial heterogeneities over the full range of voltage activation: defects are partially rescued by phosphatidylinositol 3-kinase inhibition.

13th French Society for Myology (SFM) – Lyon (France)

Kutchukian C., Tourneur Y, Poulard K, Berthier C, Allard B, Buj-Bello A, Jacquemond V (2015). Global and subcellular alterations of Ca²⁺ signals in MTM1-deficient muscle fibers: effect of PtdIns 3-kinase inhibition.

44th European Muscle Conference - Varsaw (Pologne).

Kutchukian, C., Poulard, K., Buj-Bello, A. and Jacquemond, V. (2015). Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in muscle fibers from MTM1-deficient mice: spatially discrete defects and partial rescue by phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 36, 85

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse Kathrin Giesler, Ana-Maria Gomez, Isabelle Marty, Ana Buj-Bello et Marc Bitoun pour leur disponibilité et pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Je remercie également Corinne Huchet et Etienne Lefai pour leur bienveillance et pour leurs remarques constructives lors de mes deux comités de suivi de thèse, ainsi que pour m'avoir suggéré de nouvelles perspectives de recherche.

Mes sincères remerciements vont à mon directeur de thèse Vincent Jacquemond. Je te suis extrêmement reconnaissante pour ce beau projet que tu m'as confié et pour avoir dirigé ma thèse avec autant de cœur et de professionnalisme. Je te remercie pour ton soutien et ta confiance, pour avoir partagé ton savoir et ta rigueur scientifique et pour t'être toujours montré disponible.

Je remercie chaleureusement les autres membres de mon équipe, à commencer par Christine Berthier et Bruno Allard. Vos enseignements de grande qualité durant mes années de Master m'ont donné le goût de l'électrophysiologie et de la physiologie musculaire. Je vous remercie pour votre écoute et pour vos précieux conseils dans les expérimentations. Clarisse, Colline et Francisco, votre bonne humeur et vos éclats de rire ont grandement contribué à rendre cette expérience de thèse aussi belle. Je n'oublierai jamais ces bons moments passés avec vous au laboratoire et en dehors. Romane, je te souhaite plein de succès et de joie dans cette expérience de thèse qui débute pour toi.

I would like to send a big THANKS to Mariana Casas and Enrique Jaimovich who warmly welcomed me in their lab « Centro de Estudios Moleculares de la Célula ». Paola, Andrea, Francisco, Jenny, Veronica and others thank you for sharing such a good time with you, for teaching me some Chilean words and songs, for making me discover the city of Santiago and surroundings and... las empanadas ! Thank you all for your kindness, I spent a great time with you.

Je tiens également à remercier les membres de mon laboratoire ainsi que son directeur, M. Laurent Schaeffer. J'adresse une pensée particulière à l'équipe Boulin avec laquelle j'ai partagé de nombreux repas, à Marine Gueydan pour tous ces bons moments à organiser le Téléthon et autres événements, et à Thibaut Desgeorges pour ces belles années de colocation.

Je remercie mes copains du Master BIPN Guéna, Marine, Ange-Lyne, Titi, Rémi et Kévin pour ces bons moments passés et à venir, ainsi que mes biterroises préférées Noëllie et Clio pour ces fous rires et nos débuts mémorables à la fac. Je remercie mon ami Matthieu pour m'avoir soutenue durant ces trois années de thèse, et Clément pour tes nombreux coups de pouce en maths.

Pour finir, j'exprime ma profonde reconnaissance à ma famille qui m'a toujours épaulée durant ces longues années d'études. Stéphane, tu as toujours été un modèle de réussite pour moi et je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir transmis cette passion pour la recherche. Jessica, nous avons fait nos premiers pas et récité nos premières leçons ensemble. Aujourd'hui nos carrières ont pris des directions différentes, mais saches que j'admire la rigueur dont tu fais preuve au travail et la reconnaissance qu'elle suscite auprès de tes collègues. Merci pour le soutien et le bonheur que tu m'apportes au quotidien.

Liste des abréviations

Ach : acétylcholine
ATP/ADP : adénosine tri/di phosphate
BAR : BIN1/Amphiphysin/Rvs167
BIN1 : bridging integrator 1
Ca²⁺ : calcium
CICR : calcium-induced calcium release
CNM : centronnuclear myopathy
Couplage EC : couplage excitation-contraction
DAG : diacylglycérol
DHPR : dihydropyridine receptor
DMSO : diméthyle sulfoxide
DNM2 : dynamine 2
FDB : *flexor digitorum brevis*
ECE : evénement calcique elémentaire
FWHM : full width at half maximum
FYVE : Fab-1, YGL023, Vps27, EEA1
GTP : guanosine triphosphate
HM : hyperthermie maligne
HypoPP1 : paralysie périodique hypokaliémique de type 1
IO : interosseux
JNM : jonction neuromusculaire
K⁺ : potassium
MCC : myopathie à cores centraux
MHC : myosin heavy chain
MTM1 : Myotubularine
MTMR : Myotubularin and Myopathy Related
Na⁺ : sodium
NO : nitric oxide
PA : potentiel d'action
PH : pleckstrin homology
Pi : phosphate inorganique
PLC : Phospholipase C

RS : réticulum sarcoplasmique

RyR : ryanodine receptor

SNA : système nerveux autonomie

Tm : tropomiosine

TnT, TnC, TnI : troponine I, C, I

Tubule T : tubule transverse

VSD : voltage sensor domain

VSP : voltage sensing phosphatase

3-MA : 3-méthyladénine

Liste des figures

- Figure 1.** Schéma illustrant l'organisation générale du muscle squelettique.
- Figure 2.** Structures contractiles de la fibre musculaire squelettique.
- Figure 3.** Le cycle des ponts transversaux.
- Figure 4.** Les systèmes membranaires de la fibre musculaire squelettique.
- Figure 5.** La super famille des canaux calciques voltages dépendants et leurs fonctions physiologiques.
- Figure 6.** Structure du récepteur des dihydropyridines (DHPR).
- Figure 7.** Structure du récepteur de la ryanodine (RYR).
- Figure 8.** Evénements calciques élémentaires (ECE) dans la fibre musculaire de mammifère.
- Figure 9.** Position des mutations de RYR1 associées à l'hyperthermie maligne (MH) et à la myopathie à cores centraux (CCD).
- Figure 10.** Schéma illustrant les protéines triadiques dans le muscle squelettique.
- Figure 11.** Gènes codant pour la SERCA et expression tissulaire des différentes isoformes.
- Figure 12.** Gènes associés à la myopathie centronucléaire.
- Figure 13.** Caractéristiques histologiques de la myopathie centronucléaire liée à l'X (XL-CNM) et représentation des domaines de MTM1.
- Figure 14.** La famille des myotubularines.
- Figure 15.** Histologie de la myopathie centronucléaire autosomique dominante (AD-CNM) et représentation des domaines et des mutations pathologiques de DNM2.
- Figure 16.** Histologie de la myopathie centronucléaire autosomique récessive (AR-CNM) associée à BIN1 et représentation des domaines et des mutations pathologiques de BIN1.
- Figure 17.** Modèle de l'effet de la composition membranaire en $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ou de l'interaction avec des ligands protéiques sur l'activité de BIN1, proposé par Wu et Baumgart.
- Figure 18.** La famille des phosphoinositides (PtdInsPs).
- Figure 19.** Les domaines de liaison aux phosphoinositides (PtdInsPs).
- Figure 20.** La localisation subcellulaire des différentes espèces de PtdInsPs .
- Figure 21.** La famille des PtdInsP 3-kinases.
- Figure 22.** Canaux ioniques et transporteurs sensibles au $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$.

- Figure 23.** Schéma illustrant le protocole et le dispositif d'électroporation *in vivo*.
- Figure 24.** Schéma illustrant le silicone clamp et le dispositif expérimental permettant l'étude du couplage EC.
- Figure 25.** Schéma illustrant le principe du microscope confocal à balayage laser.
- Figure 26.** Structures chimiques et spectres d'excitation et d'émission des indicateurs calciques rhod-2 et fluo-4 AM.
- Figure 27.** Calculs des variations de calcium au cours du temps à partir du signal de fluorescence du rhod-2.
- Figure 28.** Modulation du couplage EC par le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$.
- Figure 29.** Schéma bilan représentant les différentes possibilités de régulation du couplage EC par le métabolisme des PtdInsPs .

Sommaire

HISTORIQUE.....	19
Chapitre 1. Muscle strié squelettique et couplage excitation-contraction.....	19
I. Ultrastructure du muscle strié squelettique	19
1.1. Organisation générale	19
a) Les enveloppes conjonctives	19
b) La fibre musculaire striée squelettique	20
c) Les types de fibres	20
1.2. La machinerie contractile	21
a) Les protéines contractiles.....	22
b) Le cycle contractile	22
1.3. Les systèmes membranaires spécifiques	23
a) Le sarcolemme et les tubules transverses	23
b) Le réticulum sarcoplasmique	24
c) La triade.....	24
II. Couplage excitation-contraction	25
2.1. Genèse d'un potentiel d'action à la membrane.....	25
2.2. Le récepteur des dihydropyridines.....	26
a) Structure moléculaire et fonctions.....	26
b) La souris dysgénique	28
c) Les pathologies associées.....	28
2.3. Le récepteur de la ryanodine	30
a) Structure moléculaire.....	30
b) Propriétés et rôles fonctionnels	31
c) Evénements calciques élémentaires (ECE).....	32
d) Régulations	34

e)	Les pathologies associées.....	37
2.4.	Interactions entre le RYR et le DHPR.....	39
a)	La boucle II-III de α_{1S}	39
b)	La sous-unité β_{1a}	40
c)	Les domaines SPRY de RYR1.....	40
d)	Le couplage rétrograde.....	41
2.5.	Les autres protéines du complexe.....	41
a)	La FKBP12 (calstabine 1).....	41
b)	STAC3.....	42
c)	La triadine.....	42
d)	La junctine.....	43
e)	La calséquestrine.....	44
f)	La junctophiline de type 1 et de type 2.....	45
2.6.	Systèmes tampons et d'extrusion du Ca^{2+}	45
a)	La calséquestrine, tampon calcique du réticulum sarcoplasmique.....	46
b)	Les tampons calciques du cytoplasme.....	46
c)	Les systèmes d'extrusion du sarcolemme.....	48
d)	La recapture du Ca^{2+} dans le RS.....	49
2.7.	Voie d'influx calcique activée par la déplétion des stocks intracellulaires (SOCE).....	50
Chapitre 2. La myopathie centronucléaire.....		51
I.	La myopathie centronucléaire liée à l'X.....	51
a)	Les symptômes cliniques et histologiques.....	51
b)	La myotubularine (MTM1).....	52
c)	Etude des mécanismes physiopathologiques de la XL-CNM.....	53
II.	La myopathie centronucléaire autosomique dominante.....	56
a)	Les symptômes cliniques et histologiques.....	56
b)	La dynamine (DNM2).....	57

c)	Etudes des mécanismes physiopathologiques de l'AD-CNM	58
III.	La myopathie centronucléaire autosomique récessive.....	61
a)	Les symptômes cliniques et histologiques	61
b)	L'amphiphysine 2 (BIN1).....	61
c)	SPEG.....	64
IV.	Les approches thérapeutiques	65
a)	La thérapie génique : de la preuve de concept à l'essai clinique	65
b)	La réduction de DNM2	66
c)	La surexpression de MTMR2	67
d)	La thérapie enzymatique de substitution.....	67
e)	L'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase.....	68
	Chapitre 3. Phosphoinositides.....	69
I.	La famille des PtdInsPs	69
a)	Structure et espèces.....	69
b)	Phosphatases et kinases.....	70
c)	Les PtdInsPs de la membrane plasmique	78
d)	Le PtdIns(3,5)P ₂ et le PtdIns(3)P.....	79
II.	Régulation du couplage EC par les PtdInsPs.....	80
a)	Le rôle de l'inositol triphosphate (Ins(1,4,5)P ₃).....	80
b)	Canaux ioniques sensibles au PtdIns(4,5)P ₂	81
c)	Régulation du couplage EC par les substrats de MTM1.....	82
	SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE	84
	MATERIEL ET METHODES	86
I.	Modèles animaux et muscle utilisés	86
II.	Transfert de gènes <i>in vivo</i>	86
a)	La technique d'électroporation	86
b)	Les plasmides utilisés	87

V.	Electrophysiologie	89
	a) La technique de Silicone Clamp.....	89
	b) Dispositif d'enregistrement.....	89
	c) Analyse des courants I _{Ca}	90
VI.	Microscopie confocale à balayage laser.....	91
	a) Principe.....	91
	b) Dispositif d'enregistrement et réglages	91
	c) Les sondes calciques.....	92
	d) Marquage du réseau de tubules transverses.....	94
VII.	Analyses des images de fluorescence	94
	a) Calcul du flux calcique	94
	b) Calcul de la densité de tubules T.....	95
	c) Analyse des sparks.....	96
VIII.	Solutions	96
	a) Tyrode.....	96
	b) Solution extracellulaire.....	96
	c) Solution intracellulaire	97
IX.	Traitement pharmacologique <i>in vivo</i>	97
X.	Analyse statistique	97
	RESULTATS.....	99
	Section 1.....	99
	Section 2.....	103
	Section 3.....	108
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	112
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121

HISTORIQUE

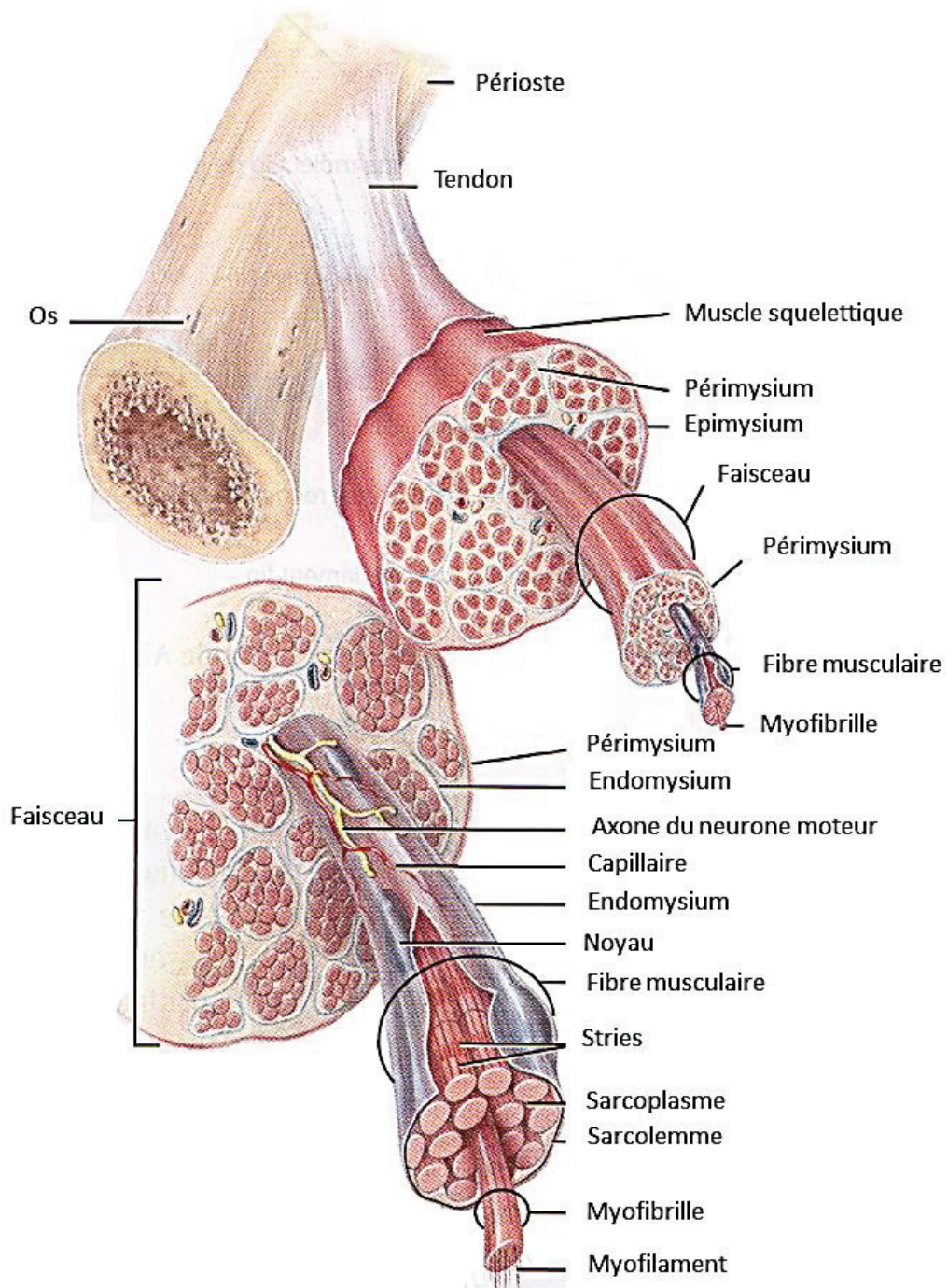


Figure 1. Schéma illustrant l'organisation générale du muscle squelettique.

HISTORIQUE

Chapitre 1. Muscle strié squelettique et couplage excitation-contraction

Le corps humain comprend trois types de muscles : les muscles lisses, le muscle cardiaque et les muscles squelettiques. Les muscles lisses assurent les contractions involontaires commandées par le système nerveux autonome (SNA) et sont situés dans les parois des organes viscéraux principalement. Le muscle cardiaque ou myocarde est la pompe assurant la circulation sanguine dans l'organisme et sa contraction involontaire est régulée intrinsèquement par le centre rythmogène et par le SNA. Enfin les muscles squelettiques sont rattachés aux os et permettent la mise en mouvement du corps via une contraction volontaire commandée par le système nerveux somatique. Par opposition aux muscles lisses, les fibres musculaires squelettiques et du myocarde arborent un aspect strié lié à l'organisation subcellulaire de leurs protéines contractiles. Mon travail de thèse s'est focalisé sur l'étude des fibres musculaires striées squelettiques et pour cette raison, ce chapitre traitera uniquement de ce type musculaire.

I. Ultrastructure du muscle strié squelettique

1.1. Organisation générale

Les muscles squelettiques représentent environ 40 à 50 % du poids corporel. Grâce à leurs propriétés d'excitabilité, de contractilité et d'extensibilité, ils permettent la production de force, la mise en mouvement du corps et le maintien de la posture et sont par ailleurs une source essentielle de production de chaleur.

a) *Les enveloppes conjonctives*

La composition du muscle squelettique fait intervenir majoritairement des fibres musculaires, ou myocytes, mais également des cellules satellites et différentes enveloppes de tissu conjonctif. La plus externe, l'épimysium, est une enveloppe aponévrotique renfermant plusieurs faisceaux de fibres musculaires. Chaque faisceau, délimité par un péri-mysium, contient plusieurs milliers de fibres musculaires. Ces dernières sont enveloppées individuellement dans une gaine conjonctive appelée

endomysium (Figure 1). L'ensemble de ces enveloppes se rejoint à chaque extrémité du muscle en un tissu conjonctif riche en fibres de collagène orientées parallèlement formant le tendon. A ce niveau, la force générée par les fibres musculaires est transmise mécaniquement au squelette, permettant sa mise en mouvement.

b) La fibre musculaire striée squelettique

La fibre musculaire a une forme cylindrique, un diamètre transversal compris entre 10 et 100 μm et une longueur pouvant atteindre plus de 20 cm pour le muscle *sartorius* de la cuisse. Au cours de la myogénèse embryonnaire, les myoblastes fusionnent entre eux pour former des cellules plurinucléées : les myotubes. A ce stade, les noyaux sont positionnés centralement et l'appareil contractile est non fonctionnel. Puis les myotubes fusionnent entre eux et se différencient en fibres matures. Elles acquièrent alors une propriété contractile fonctionnelle et leurs noyaux (jusqu'à plusieurs centaines) se positionnent en périphérie sous la membrane plasmique, le sarcolemme. Chaque fibre musculaire reçoit l'innervation d'un seul neurone moteur et celui-ci peut stimuler entre 2 fibres (muscles du larynx) et 3 000 fibres (muscles biceps et gastrocnémien) selon la puissance et l'amplitude des mouvements. L'ensemble formé par un neurone moteur et les fibres musculaires qu'il innerve constitue l'unité motrice.

c) Les types de fibres

Bien qu'il existe plusieurs critères de classification de fibres (couleur, métabolisme énergétique, isoforme de chaîne lourde de myosine), ceux-ci s'accordent sur la distinction entre les fibres à contraction rapide et les fibres à contraction lente.

C'est à partir de la première moitié du XIX^{ème} siècle que les fibres rapides et lentes ont été attribuées respectivement aux muscles blancs et rouges. Cette différence de couleur tient à la présence de myoglobine dans les muscles lents, une hémoprotéine fixant l'oxygène et associée au métabolisme énergétique oxydatif. A l'inverse, les fibres rapides sont associées au métabolisme énergétique glycolytique. Puis, en 1967, les travaux de Michael Bárány ont montré pour la première fois la corrélation entre la vitesse de raccourcissement des fibres et l'intensité de l'activité ATPase de la myosine, une protéine contractile.

La classification des types de fibres s'est complexifiée les années qui ont suivi, avec notamment la mise en évidence de l'homogénéité de la composition des fibres au sein d'une unité motrice

(Edström et Kugelberg, 1968) et la caractérisation enzymatique de quatre populations principales (pour revue, voir Schiaffino et Reggiani, 2011) :

- Les fibres de type 1 : Riches en mitochondries, myoglobine et vaisseaux sanguins, elles tirent leur énergie du métabolisme oxydatif. Elles ont une activité tonique, une vitesse de contraction lente et possèdent une très grande résistance à la fatigue.
- Les fibres de type 2 : Elles possèdent généralement un plus gros diamètre que les fibres de type I, ainsi qu'une vitesse de contraction rapide. On distingue 3 sous-groupes en fonction de l'isoforme de chaîne lourde de myosine qu'elles expriment : 2A, 2B ou 2X. Les fibres de type 2A ont un métabolisme à la fois oxydatif et glycolytique et présentent une résistance à la fatigue modérée. Les fibres de type 2B tirent leur énergie du métabolisme glycolytique et ont une activité phasique leur permettant de générer une force importante mais peu soutenue dans le temps. Enfin, les fibres de type 2X possèdent un métabolisme énergétique oxydatif variable et une résistance à la fatigue intermédiaire à celle des fibres 2A et des fibres 2B.

Ainsi, chaque muscle correspond à un patchwork d'unités motrices lentes et rapides, mais dont la proportion varie selon la position anatomique du muscle et de son activité. A titre d'exemple, les muscles postérieurs des jambes impliqués dans la posture, comme le soléaire, sont riches en fibres lentes de type 1. Les muscles sur lesquels j'ai travaillé durant mon travail de thèse sont l'interosseux (IO) et le *flexor digitorum brevis* (FDB) de souris, dont la composition est riche en fibres de type 2 (~ 90 % et 83 % respectivement) (Braubach et al., 2014; Calderón et al., 2009).

1.2. La machinerie contractile

Les myofibrilles sont les éléments contractiles de la fibre musculaire. Ces organites (jusqu'à 2 000 par fibre) ont une forme cylindrique et occupent près de 80 % du volume de la fibre. Les myofibrilles arborent un aspect strié lié à l'organisation parallèle des protéines contractiles, les myofilaments. En particulier, cette organisation striée observée en microscopie électronique fait intervenir une alternance de bandes claires et de bandes sombres, également appelées bandes I (pour isotrope) et bandes A (pour anisotrope), respectivement (Figure 2A). Au centre de chaque bande I se trouve la strie Z, une région riche en α -actinine. La bande A présente dans sa région médiane une zone plus claire appelée zone H, au centre de laquelle se trouve la ligne M (Figure 2B). Le sarcomère, délimité entre deux lignes Z, est l'unité contractile de la fibre musculaire. Au repos, il mesure environ 2 μ m de longueur.

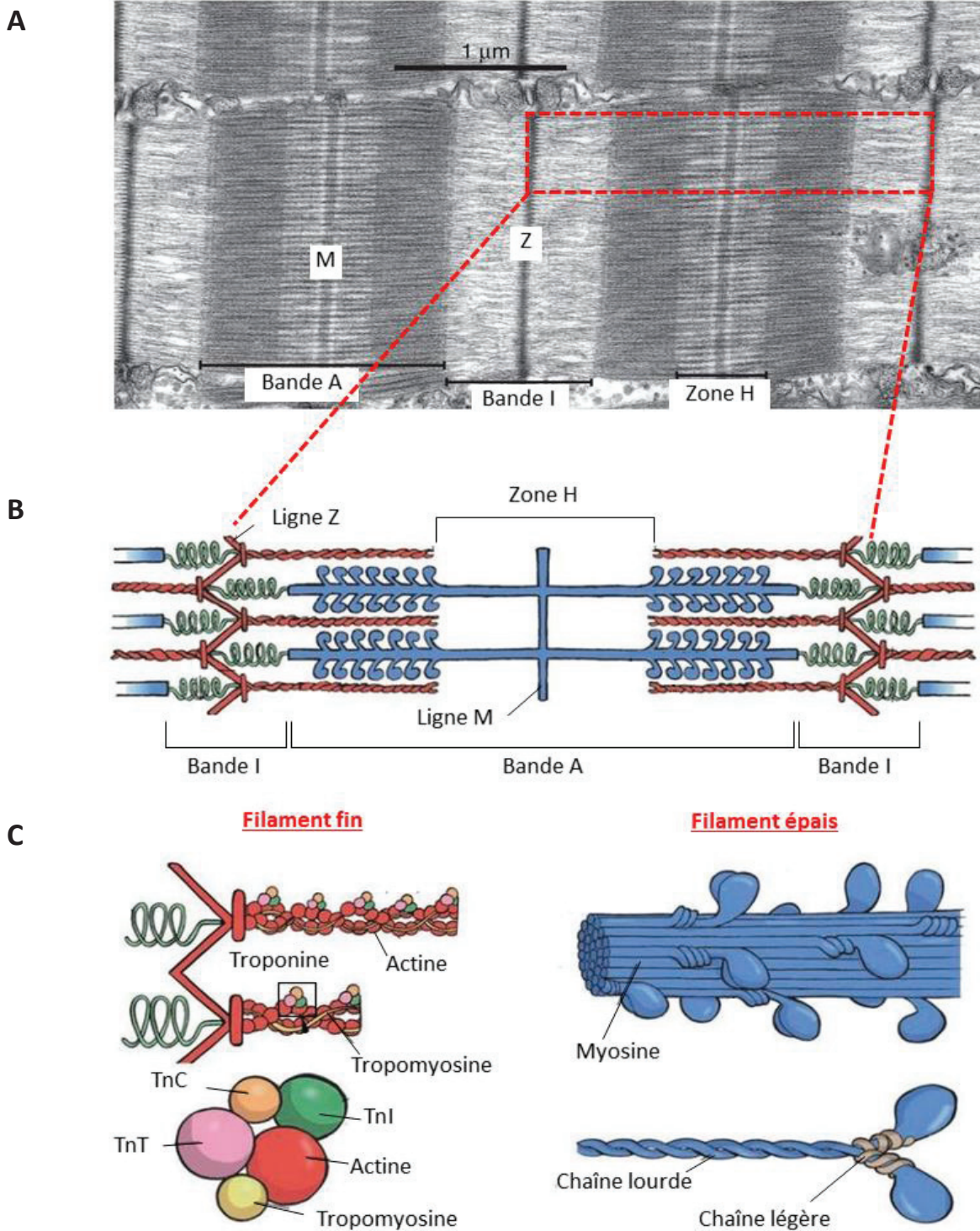


Figure 2. Structures contractiles de la fibre musculaire squelettique.

A/ Coupe longitudinale de fibre musculaire de grenouille observée en microscopie électronique, et montrant l'organisation striée d'un sarcomère.

B/ Schéma illustrant la disposition des filaments fins et épais au sein d'un sarcomère.

C/ Schéma illustrant la composition et l'organisation des protéines contractiles.

D'après Sweeney et Hammers, 2018.

D'après Physiologie Humaine, Dunod, 2016.

a) Les protéines contractiles

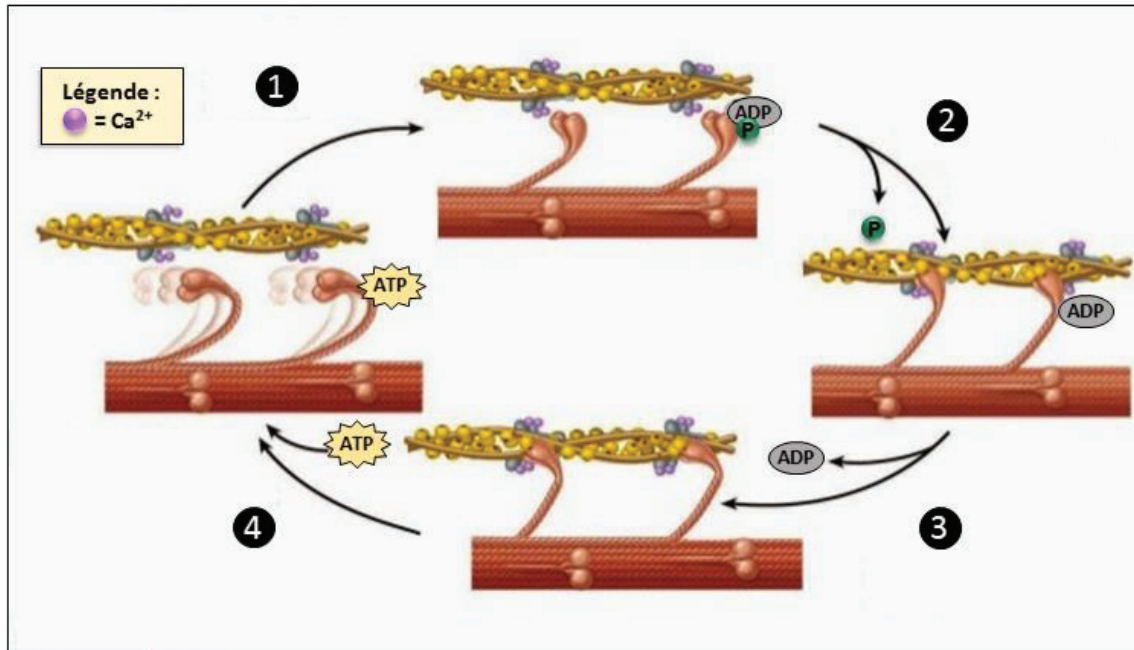
En microscopie électronique, on distingue deux types de myofilaments orientés parallèlement à l'axe de la fibre (Figure 2C).

- Les myofilaments fins mesurent 5 nm de diamètre. Ils s'insèrent sur les stries Z et projettent vers le centre du sarcomère. Ils se composent majoritairement d'actine globulaire polymérisée en forme de double hélice. Ce squelette d'actine forme une gouttière sur laquelle s'insère une double hélice de tropomyosine (Tm). On retrouve également un complexe de trois sous-unités de troponine : la troponine T (TnT) interagissant avec Tm, la troponine C (TnC) fixant le Ca^{2+} et la troponine I (TnI) inhibitrice.
- Les myofilaments épais mesurent 10 nm de diamètre. Ils occupent toute la longueur de la bande A (soit 1,5 μm) et présentent des projections latérales se liant aux filaments fins et appelées ponts transversaux. Ces myofilaments sont constitués de myosine organisée en hexamère avec 2 chaînes lourdes (MHC, myosin heavy chain) et 4 chaînes légères (MLC, myosin light chain). Chaque MHC, semblable à un club de golf, possède une partie globulaire, la « tête », et une partie filamentaire, la « queue ». Les MLC quant à elles se situent à la jonction entre la tête et la queue de chaque MHC. Le filament épais correspond donc à un enchevêtrement d'hexamères de myosine dont les queues sont dans l'axe longitudinal de la fibre et les têtes sont dirigées vers l'extérieur et correspondent aux ponts transversaux.

b) Le cycle contractile

Les myofilaments fins et épais se chevauchent aux extrémités de la bande A. La zone H apparaît donc plus claire en raison de sa composition exclusive en filaments épais de myosine, qui plus est, dépourvue de ponts transversaux. Lors d'une contraction concentrique, les ponts transversaux tirent les filaments fins vers la ligne M, raccourcissant ainsi la bande H et la bande I, sans que la bande A ne varie. Ceci a été mis en évidence pour la première fois en 1954 par les travaux de Huxley et Niedergerke et de Huxley et Hanson, à l'origine de la théorie du glissement des filaments (Huxley et Hanson, 1954; Huxley et Niedergerke, 1954).

Par ailleurs, le Ca^{2+} joue un rôle prépondérant dans la régulation du cycle contractile : au repos, le Ca^{2+} libre cytosolique a une concentration proche de 100 nM. Les sites de fixation de l'actine réservés aux têtes de myosine sont alors occupés par la Tm. Lors du couplage excitation-contraction,



- ❶ Les têtes de myosine hydrolysent l'ATP en ADP + Pi, changent de conformation et adoptent une position de haute énergie.
- ❷ Les têtes de myosine se lient à l'actine, formant ainsi des ponts transversaux et libèrent le Pi.
- ❸ L'interaction myosine-actine libère de l'ADP, permettant un fouetté du cou de la tête de myosine vers le centre du sarcomère et donc le glissement des filaments fins.
- ❹ La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP détache la tête de myosine de l'actine, adoptant de nouveau une configuration de basse énergie.

Figure 3. Le cycle des ponts transversaux.

D'après Principles of Anatomy and Physiology, Wiley, 2006.

la concentration du Ca^{2+} cytosolique atteint $10 \mu\text{M}$. La liaison du Ca^{2+} sur la TnC induit alors un glissement de la Tm sur l'actine, démasquant ainsi le site de liaison actine-myosine. Le cycle contractile peut alors s'initier, et se déroule en quatre étapes (Figure 3):

1. En présence d'ATP, la myosine est détachée du filament d'actine. L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi (pour phosphate inorganique) par la myosine entraîne un rapprochement des têtes de myosine avec les filaments d'actine.
2. Cette configuration de haute énergie entraîne l'interaction entre l'actine et la myosine, suivie de la libération du Pi.
3. La molécule d'ADP à son tour est évacuée, entraînant un « fouetté » du cou de la tête de myosine : le filament d'actine est alors tiré vers le centre du sarcomère.
4. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP détache l'actine de la myosine.

1.3. Les systèmes membranaires spécifiques

Afin d'assurer ses fonctions d'excitabilité électrique et de contractilité, la fibre musculaire présente des systèmes membranaires hautement organisés faisant intervenir à la fois les membranes externes (sarcolemme et tubules transverses) et la membrane d'un organite cellulaire, le réticulum sarcoplasmique. Ces systèmes membranaires se rejoignent au niveau de la triade.

a) *Le sarcolemme et les tubules transverses*

Le sarcolemme, du grec ancien *σάρξ*, *sárx* (« chair ») et *λέμμα*, *lémma* (« enveloppe »), désigne la membrane de surface de la fibre musculaire. Cette membrane forme un réseau d'invaginations dans l'axe transversal de la fibre : les tubules transverses (tubules T) (Figure 4A). De par leur composition en canaux ioniques, le sarcolemme et les tubules T ont la propriété d'être des membranes excitables. Ainsi, suite à une impulsion nerveuse, le potentiel d'action généré au niveau du sarcolemme se propage en surface et en profondeur via les tubules T. Dans les fibres musculaires squelettiques de mammifères, les tubules T sont répartis sur toute la longueur de la fibre à chaque interface entre les bandes A et les bandes I, et sont donc au nombre de deux par sarcomère. Chez la grenouille en revanche, ces structures sont moins nombreuses et plus éloignées des zones de recouvrement entre les protéines contractiles. En effet, on compte un tubule T par sarcomère, positionné au niveau de chaque strie Z. Il a été postulé que cette différence morphologique soit corrélée à une différence fonctionnelle essentielle entre les deux situations : en résumé, à la différence du muscle de

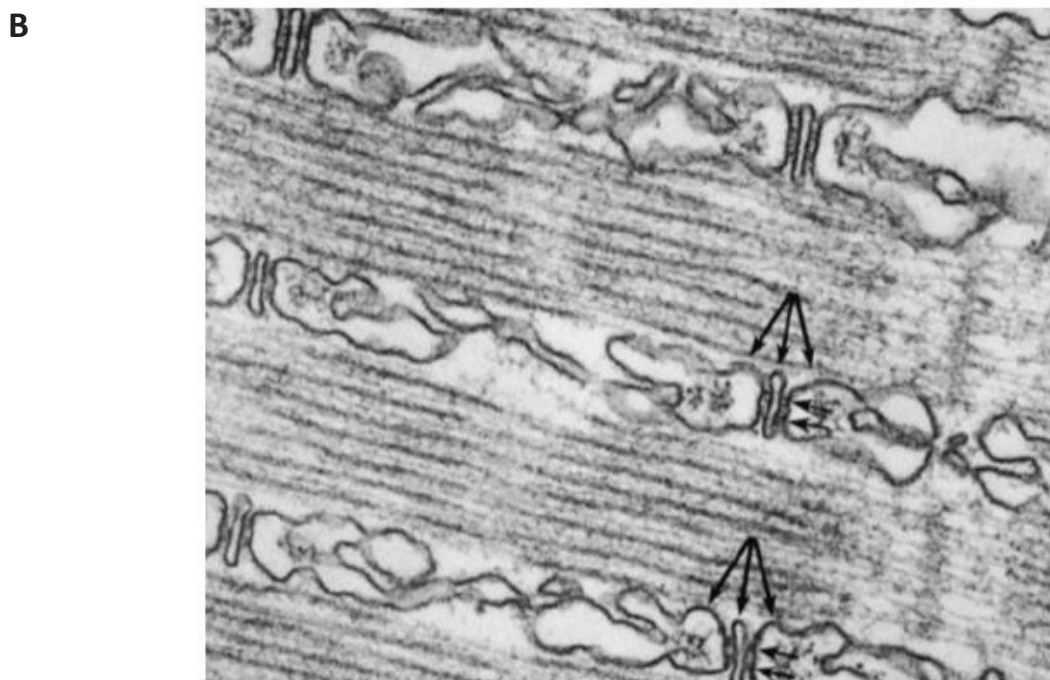
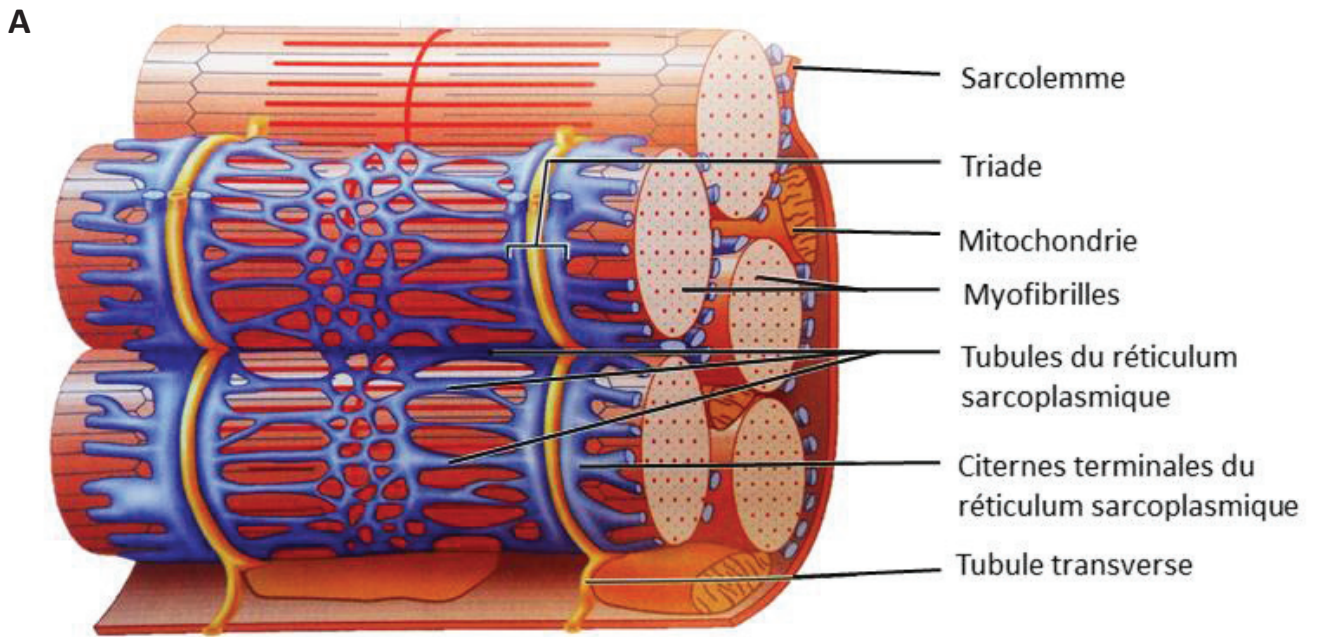


Figure 4. Les systèmes membranaires de la fibre musculaire squelettique.

A/ Organisation générale du réticulum sarcoplasmique, des tubules transverse et des myofibrilles. D'après Marieb E. N, Pearson Education, 2007.

B/ Cliché de microscopie électronique d'une fibre musculaire squelettique de poisson, en coupe longitudinale. Les trois flèches désignent une triade avec le tubule T au centre encadré par deux citernes terminales. Les deux flèches montrent les projections des citernes terminales vers le tubule T appelées « pieds » jonctionnels. D'après Franzini-Armstrong et Peachey, 1981.

mammifère, la fibre musculaire d'amphibien fait intervenir un mécanisme à caractère explosif de libération de calcium, appelé « calcium-induced calcium release » (CICR), porté par des éléments situés dans les régions para-jonctionnelles du réticulum sarcoplasmique et absents chez les mammifères. En revanche, chez ces derniers les doublets de triades permettraient un contrôle plus étroit de la contraction (Ríos, 2018, et pour plus de détails, voir la section 2.3.c) *Evénements calciques élémentaires*).

b) Le réticulum sarcoplasmique

On retrouve à l'intérieur de la fibre musculaire un réseau dense et clos de tubules communicants, le réticulum sarcoplasmique (RS). Ce compartiment, spécifique aux fibres musculaires, s'apparente au réticulum endoplasmique lisse. Le RS s'étend sur toute la longueur de la fibre et recouvre parallèlement chaque myofibrille. A ses extrémités, les tubules fusionnent latéralement pour former les citernes terminales tandis que le reste du RS est longitudinal, avec une région médiane fenestrée (Figure 4A). Ce compartiment occupe 10 % du volume de la fibre musculaire et joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie calcique. Sa lumière contient 0,5 mM de Ca^{2+} libre contre 100 nM dans le cytoplasme, soit une concentration 5 000 fois plus élevée. Chez le mammifère, les citernes terminales se positionnent à chaque jonction entre la bande A et la bande I et s'accolent de part et d'autre à la membrane du tubule T (pour revue, voir Franzini-Armstrong, 1999).

c) La triade

L'ensemble de deux citernes terminales de RS en apposition de part et d'autre d'un tubule T forme la triade (figure 4B). En microscopie électronique, on observe un espace cytoplasmique de 15 nm séparant la membrane du RS de la membrane du tubule T et dans lequel se trouvent des structures denses appelées « pieds » jonctionnels (Figure 4B). En 1980, ces éléments ont été identifiés par Campbell *et al.* comme des projections provenant des citernes terminales, avant d'être définitivement associées aux canaux calciques du RS, les récepteurs de la ryanodine (pour revue, voir Franzini-Armstrong, 2018).

II. Couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction se définit par la succession d'évènements entre l'excitation du sarcolemme et la réponse contractile, déclenchée par une augmentation massive de Ca^{2+} intracellulaire. Dès la fin du XVIIIème siècle, les célèbres travaux de Luigi Galvani sur l'électricité animale puis d'Edgar Douglas Adrian dans les années 1920 sur le potentiel d'action ont permis d'établir la nature électrique du signal déclencheur de la contraction, cependant le mécanisme de transmission de ce signal à l'intérieur de la fibre était encore méconnu. A la fin des années 1940, les calculs du physiologiste anglais A. V. Hill ont rejeté l'hypothèse de la diffusion d'un « activateur » jusqu'aux myofibrilles, trop lente pour soutenir un mécanisme de quelques ms entre l'application d'un potentiel d'action à la surface de la fibre et la contraction. Plus tard, les célèbres « stimulations locales » de Huxley et Taylor (1958) ont démontré l'existence d'une région, localisée au niveau de la strie Z chez la grenouille et à l'interface de la bande A et de la bande I dans la fibre musculaire de crabe, permettant la propagation du signal en profondeur. L'observation de ces régions au microscope électronique révélera l'existence des structures triadiques décrites précédemment. En parallèle, les travaux de Hodgkin et Horowicz (1960) réalisés sur des fibres de grenouille exposées à différentes concentrations de K^+ extracellulaire ont montré que la variation du potentiel de membrane était le signal déclencheur de la contraction, et que par ailleurs la dépendance au potentiel de la contraction suit une courbe sigmoïde avec une initiation à -50 mV et une tension maximale atteinte à partir de -20 mV. Cette dépendance au potentiel de la contraction est en fait conditionnée par celle de la libération de Ca^{2+} par le RS. En effet, de nombreux travaux menés *in vitro* et *in situ* ont montré le rôle prépondérant du Ca^{2+} dans l'activation des protéines contractiles, et que cet ion est libéré par le RS en réponse à des dépolarisations membranaires (pour revue, voir Franzini-Armstrong, 2018).

On sait aujourd'hui que la transmission du signal entre le tubule T et la libération de Ca^{2+} par le RS fait intervenir le récepteur des dihydropyridines (DHPR) présent dans la membrane du tubule T et le canal calcique du RS, le récepteur de la ryanodine (RYR). Le mécanisme détaillé de la communication entre ces deux partenaires moléculaires sera traité dans cette sous-partie.

2.1. Genèse d'un potentiel d'action à la membrane

Chaque fibre musculaire reçoit l'innervation d'un motoneurone et la zone de contact entre ces deux éléments s'appelle la jonction neuro-musculaire (JNM). Au niveau de la terminaison nerveuse,

Type de courant Ca^{2+}	Sous unité $\alpha 1$	Gène	Principales fonctions physiologiques
Type L	$\text{Ca}_v1.1, \alpha 1S$	<i>CACNA1S</i>	Couplage EC du muscle squelettique, régulation de la transcription
	$\text{Ca}_v1.2, \alpha 1C$	<i>CACNA1C</i>	Couplage EC du muscle cardiaque et du muscle lisse, sécrétion endocrine, transitoires calciques neuronaux des corps cellulaires et dendrites, régulation d'activité enzymatique, régulation de la transcription
	$\text{Ca}_v1.3, \alpha 1D$	<i>CACNA1D</i>	Sécrétion endocrine, transitoires calciques neuronaux des corps cellulaires et dendrites, transduction auditive, pacemaker cardiaque
	$\text{Ca}_v1.4, \alpha 1F$	<i>CACNA1F</i>	Transduction visuelle
Type P/Q	$\text{Ca}_v2.1, \alpha 1A$	<i>CACNA1A</i>	Libération de neurotransmetteurs, transitoires calciques dans les dendrites
Type N	$\text{Ca}_v2.2, \alpha 1B$	<i>CACNA1B</i>	Libération de neurotransmetteurs, transitoires calciques dans les dendrites
Type R	$\text{Ca}_v2.3, \alpha 1E$	<i>CACNA1E</i>	Libération de neurotransmetteurs, transitoires calciques dans les dendrites
Type T	$\text{Ca}_v3.1, \alpha 1G$	<i>CACNA1G</i>	Pacemaker et décharges répétées de PA
	$\text{Ca}_v3.2, \alpha 1H$	<i>CACNA1H</i>	Pacemaker et décharges répétées de PA
	$\text{Ca}_v3.3, \alpha 1I$	<i>CACNA1I</i>	

Figure 5. La super famille des canaux calciques voltages dépendants et leurs fonctions physiologiques.

Chez le mammifère, dix gènes codent pour dix isoformes différentes de sous unité $\alpha 1$. Les courants de type L, P/Q, N et R sont portés par des canaux à haut seuil (HVA, high voltage activated) et les courants de type T sont portés par les $\text{Ca}_v1.3$, à bas seuil d'activation (LVA, low voltage activated).

D'après Catterall, 2011.

l'arrivée d'un influx électrique déclenche la fusion des vésicules d'acétylcholine (ACh) avec la membrane présynaptique. La membrane post-synaptique, également appelée plaque motrice, présente de nombreux replis contenant les récepteurs nicotiques de l'ACh. Les molécules d'ACh libérées dans la fente synaptique se fixent à leurs récepteurs ligand-dépendants, provoquant l'ouverture des canaux ioniques $\text{Na}^+\text{-K}^+$. L'entrée de Na^+ dans la fibre musculaire au niveau de la plaque motrice dépolarise localement le sarcolemme, créant un potentiel de plaque motrice. Si la dépolarisation est assez forte, alors un potentiel d'action (PA) porté par les canaux sodiques voltage-dépendants est déclenché et se propage de proche en proche le long du sarcolemme et en profondeur dans les tubules T.

2.2. Le récepteur des dihydropyridines

a) *Structure moléculaire et fonctions*

Le DHPR appartient à la super famille des canaux calciques dont l'activité est dépendante du potentiel (voltage-dépendante), codés par les gènes *CACNA1x*. Les seuils d'activation ainsi que les propriétés d'ouverture et de fermeture de ces canaux sont variables. Ainsi on distingue les canaux à haut seuil d'activation (courants de type L, N, P/Q et R) des canaux activés à de faibles potentiels (courant de type T) (pour revue, voir Catterall, 2011). En particulier, le DHPR génère un courant de type L (pour *large* et *long-lasting*) et présente une conductance élevée et des cinétiques lentes d'activation et d'inactivation. Les gènes *CACNA1S*, *CACNA1C*, *CACNA1D* et *CACNA1F* codent pour quatre différentes isoformes de sous unités principales du DHPR. En particulier, les isoformes $\alpha 1S$ (ou $\text{Ca}_v1.1$) et $\alpha 1C$ (ou $\text{Ca}_v1.2$) sont exprimées dans les tubules T du muscle squelettique et du cœur respectivement, où elles jouent un rôle majeur dans le couplage EC (Figure 5).

La structure du DHPR observée en cryo-microscopie électronique, a récemment été décrite avec une résolution de 3,6 Å (Wu et al., 2016) (Figure 6A). Le DHPR est un hétéropentamère de 430 kDa constitué d'une sous unité principale $\alpha 1$ ayant la double fonction de canal calcique et de senseur de potentiel, et de quatre sous-unités régulatrices $\alpha 2/\delta$, β et γ . En particulier, l'isoforme $\alpha 1S$ (ou $\text{Ca}_v1.1$) est issue du gène *CACNA1S* situé sur le chromosome 1 en position q32 et est spécifique au muscle squelettique. La structure de la sous-unité $\alpha 1S$ est très proche de celle des canaux Na^+ et K^+ voltage-dépendants (Catterall, 2000) et comprend 4 domaines analogues (I à IV) de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) (Figure 6B). Les segments S5 et S6 de chaque domaine ainsi que les boucles intra-membranaires entre ces deux segments forment le « domaine pore » de $\alpha 1S$, assurant la fonction de canal calcique. En particulier, la sélectivité aux ions Ca^{2+} est conférée par la présence

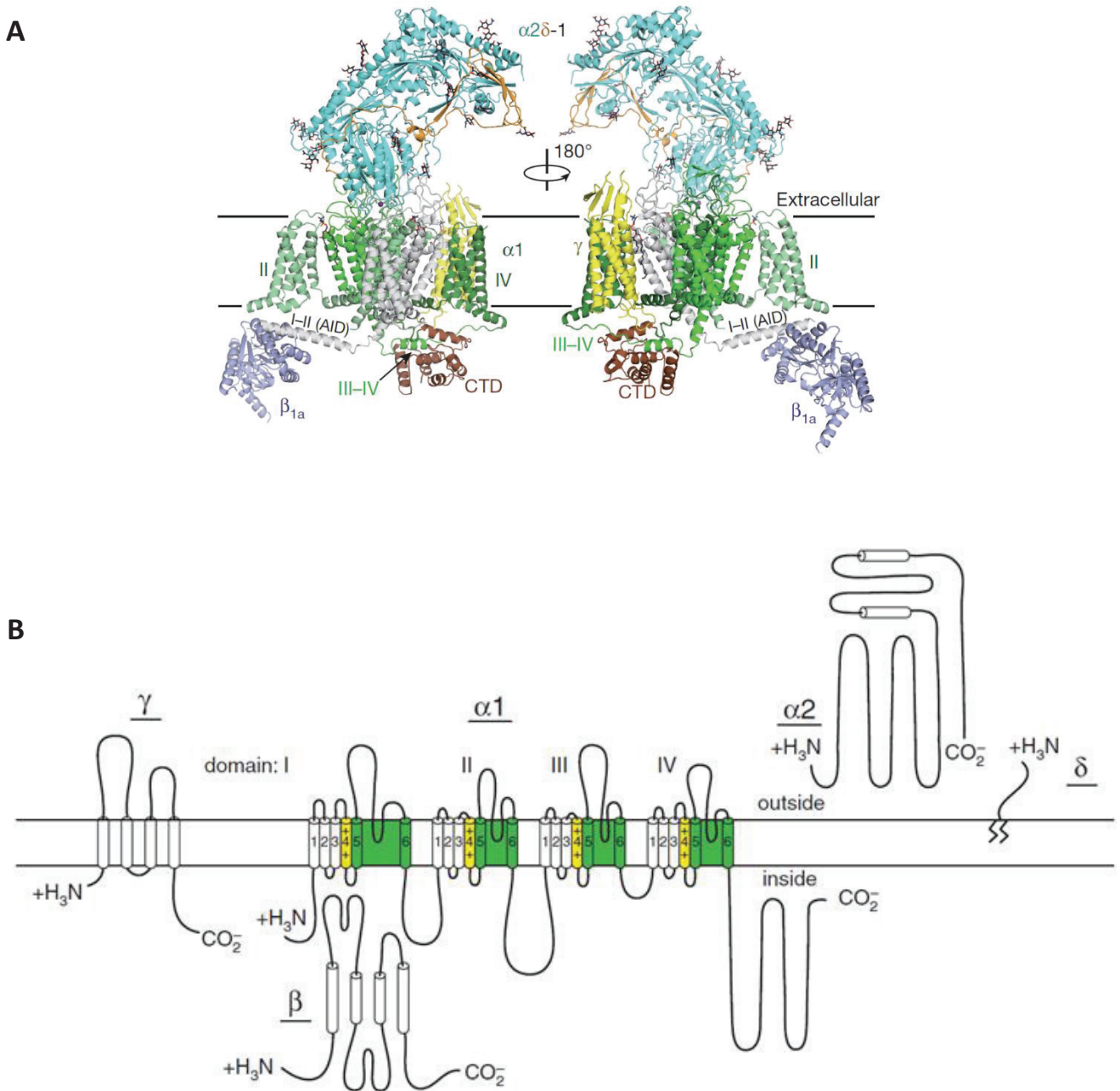


Figure 6. Structure du récepteur des dihydropyridines (DHPR).

A/ Structure générale du DHPR modélisé en 3 dimensions à partir d'images de cryo-microscopie électronique avec une résolution de 3.6 Å. Chaque sous-unité est représentée avec une couleur différente, avec les 4 domaines analogues de $\alpha 1S$ colorés avec différentes nuances de vert. D'après Wu et al., 2016.

B/ Schéma représentant des 5 sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2/\delta$, β et γ du DHPR. Les segments S4 chargés positivement (en jaune) forment le domaine senseur de potentiel. Les segments S5-S6 et les boucles entre ces deux segments (en vert) forment le domaine pore sélectif aux ions Ca^{2+} . D'après Catterall, 2011.

d'une paire de glutamates dans la boucle S5-S6 de chaque domaine (Heinemann et al., 1992; Catterall, 2011). Si le courant calcique à travers α_{1S} est essentiel au couplage EC dans le muscle cardiaque, son rôle physiologique dans le muscle squelettique reste controversé. Chez le poisson zèbre (*Danio reiro*), les sous-unités principales (α_{1S} -a et α_{1S} -b) présentent des substitutions des paires de glutamates par des résidus neutres dans la boucle S5-S6, conduisant à la perte de conductance du canal sans que le couplage EC ne soit affecté (Schredelseker et al., 2010; Bannister et Beam, 2013). La fonction du courant calcique voltage dépendant a également été étudiée chez le mammifère à l'aide de deux souris transgéniques portant une mutation de α_{1S} conduisant à un canal calcique non-conducteur. Dans l'un de ces deux modèles, ni l'efflux calcique par le RS ni la fonction contractile ne sont altérés, suggérant que le courant calcique dans le muscle squelettique serait un vestige de l'évolution (Dayal et al., 2017). En revanche, dans l'autre modèle, les fibres musculaires présentent des altérations du remplissage du RS au cours d'une activité prolongée (Lee et al., 2015). En accord avec ces résultats, des expériences de mesure de Ca^{2+} dans la lumière du RS sur des fibres musculaires de souris ont montré l'implication du courant calcique voltage dépendant dans le maintien des réserves de Ca^{2+} du RS (Robin et Allard, 2015).

L'activité canal calcique des isoformes α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} et α_{1F} est modulée par la famille des dihydropyridines : l'agoniste Bay K 8644 augmente le temps d'ouverture du canal tandis que le bloqueur nifédipine stabilise l'état inactivé du canal (Benedetti et al., 2015). Ce dernier est notamment utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle.

La sous unité α_2/δ , codée par le gène *CACNA2D1* (Jongh et al., 1990), est constituée d'une partie α_2 (extracellulaire) reliée par une liaison pont disulfure à la partie δ ancrée à la membrane plasmique par un glycoposphatidylinositol. Elle est notamment impliquée dans l'adressage de la sous-unité α_{1S} ainsi que dans la régulation de la densité et des cinétiques du courant calcique (Obermair et al., 2005). La sous-unité squelettique β_{1A} est codée par le gène *CACNB1* et joue un rôle important dans le trafic de α_{1S} jusqu'à la surface membranaire et dans l'interaction entre RYR1 et α_{1S} (voir la sous-partie 2.4 *Interactions entre le RyR et le DHPR*). Enfin, la sous-unité γ_1 , codée par le gène *CACNG1* n'est pas essentielle au couplage EC et son absence dans muscle squelettique provoque une augmentation du courant calcique de type L et une altération des propriétés d'inactivation du canal (Freise et al., 2000).

Contrairement au muscle cardiaque, le couplage EC du muscle squelettique n'est pas sous le contrôle de l'entrée de Ca^{2+} à travers le DHPR (Armstrong et al., 1972; Dayal et al., 2017) mais repose sur une interaction mécanique avec RYR1, médiée par la fonction senseur de potentiel de α_{1S} . En effet, chaque segment S4 comporte 5 à 6 acides aminés - lysine ou arginine - chargés positivement et capables de se déplacer dans la membrane sous l'effet d'un champ électrique. Ces mouvements de

charges ont été mesurés sur des fibres musculaires de grenouille en 1973 par Schneider et Chandler, en condition de potentiel imposé (voltage clamp) et en l'absence de toute conductance ionique. Dans ces conditions, les mouvements de charges se présentent sous la forme de petits courants capacitifs non linéaires dont la dépendance au potentiel est similaire à celle des transitoires calciques du RS (Rakowski et al., 1985; Garcia et al., 1994). Ainsi au cours d'une dépolarisation, ces charges sont repoussées vers le bord externe de la membrane et leur déplacement induit un changement de conformation conduisant d'une part à l'entrée de Ca^{2+} à travers le domaine pore et d'autre part à l'interaction mécanique entre le DHPR et RYR1 qui déclenche le couplage (Ríos et al., 1992).

b) *La souris dysgénique*

L'étude fonctionnelle de l'activité et du rôle du DHPR et de ses différentes régions a été favorisée par l'apparition fortuite d'une mutation *mdg* chez la souris, dite « dysgénique ». Cette mutation, à l'état homozygote, est létale et cause l'absence totale de la sous-unité $\alpha 1S$ (Beam et al., 1986). Les myotubes en culture de souris dysgéniques ne présentent ni courant Ca^{2+} , ni mouvements de charge et sont par ailleurs incapables de se contracter. En revanche, l'injection d'ADNc codant pour la sous-unité $\alpha 1S$ restaure ces trois paramètres dans les myotubes *mdg* (Tanabe et al., 1988; Adams et al., 1990), démontrant la double fonction de senseur de potentiel et de canal calcique de $Ca_v1.1$. Dans une autre série expérimentale, Tanabe et al. (1990) ont exprimé différentes constructions chimériques de $\alpha 1S$ et $\alpha 1C$ (pour squelettique et cardiaque respectivement) dans les myotubes *mdg*. La différence entre ces deux isoformes tient au fait que le couplage EC est dépendant de l'entrée de Ca^{2+} externe dans le cœur, et non dans le muscle squelettique. En remplaçant des boucles cardiaques par des boucles squelettiques, les auteurs ont identifié la portion entre les domaines II et III de $\alpha 1S$ comme étant essentielle au couplage EC dans le muscle squelettique.

c) *Les pathologies associées*

Des mutations dans le gène *CACNA1S*, codant pour la sous unité principale du DHPR, sont associées à deux pathologies congénitales : la paralysie périodique hypokaliémique de type 1 et l'hyperthermie maligne.

La paralysie périodique hypokaliémique de type 1 :

Chez l'Homme, la Paralysie Périodique Hypokaliémique de type 1 (HypoPP1) est caractérisée par des épisodes transitoires de paralysie flaccide associés à une baisse de la concentration plasmatique de K^+ dans le sang. En général, les crises surviennent à la suite d'un exercice intense, d'un stress ou d'un régime riche en carbohydrates (Cannon, 2010; Allard et Fuster, 2018). L'HypoPP1 est causée par des mutations faux-sens dans le gène CACNA1S concernant des arginines dans les segments S4 substituées par des résidus neutres (Jurkat-Rott et al., 1994; Ptáček et al., 1994; Wang et al., 2005) à l'exception des mutations V876E et H916Q localisées respectivement dans le segment S3 et la boucle S4-S5 du domaine III (Ke et al., 2009; Li et al., 2012). Les fibres musculaires issues de biopsies de patients révèlent une dépolarisation membranaire de 5-15 mV au repos dans un milieu appauvri en K^+ (Rüdel et al., 1984), probablement causée par l'entrée constitutive d'un courant cationique dit « accessoire » à travers $Ca_v1.1$, ou « gating pore current » (Jurkat-Rott et al., 2009; Wu et al., 2012; Fuster et al., 2017).

L'hyperthermie maligne

L'hyperthermie maligne (HM) est une maladie génétique autosomique dominante qui se manifeste par une réaction très violente aux anesthésiques volatiles et/ou à la succinylcholine, un relaxant musculaire. En effet, l'exposition à l'un de ces déclencheurs provoque chez l'individu susceptible à l'HM (SHM) une crise caractérisée par une forte augmentation de la température corporelle, une contracture musculaire généralisée et une rhabdomyolyse pouvant être fatale. A ce jour, l'administration intraveineuse de dantrolène, un inhibiteur de la libération de Ca^{2+} par le RS, est le seul traitement capable d'enrayer cette crise hyper métabolique. En dehors de ces situations, l'individu SHM est asymptomatique et pour cette raison, la prévalence de cette maladie (1 :5000 à 1 :50000) est sous-estimée (Beam et al., 2017). La SHM est dépistable *in vitro* sur des biopsies avec un test de contracture employant de la caféine et de l'halothane (Hopkins et al., 1991; The European Malignant Hyperpyrexia Group, 1984).

La majorité des cas de SHM (entre 50 et 70 %) est associée à des mutations localisées dans le gène codant pour RYR1, le canal calcique du RS. Cependant des mutations dans le gène CACNA1S (Monnier et al., 1997; Carpenter et al., 2009) ont été reportées et représenteraient 1% des SHM. En particulier, les études fonctionnelles des mutations R1086H et R174W suggèrent que la sensibilité au potentiel du couplage EC ainsi que la fuite de Ca^{2+} à travers RYR1 au repos sont davantage amplifiées en présence d'anesthésiques et pourraient participer aux mécanismes pathologiques de l'HM (Weiss et al., 2004; Eltit et al., 2012).

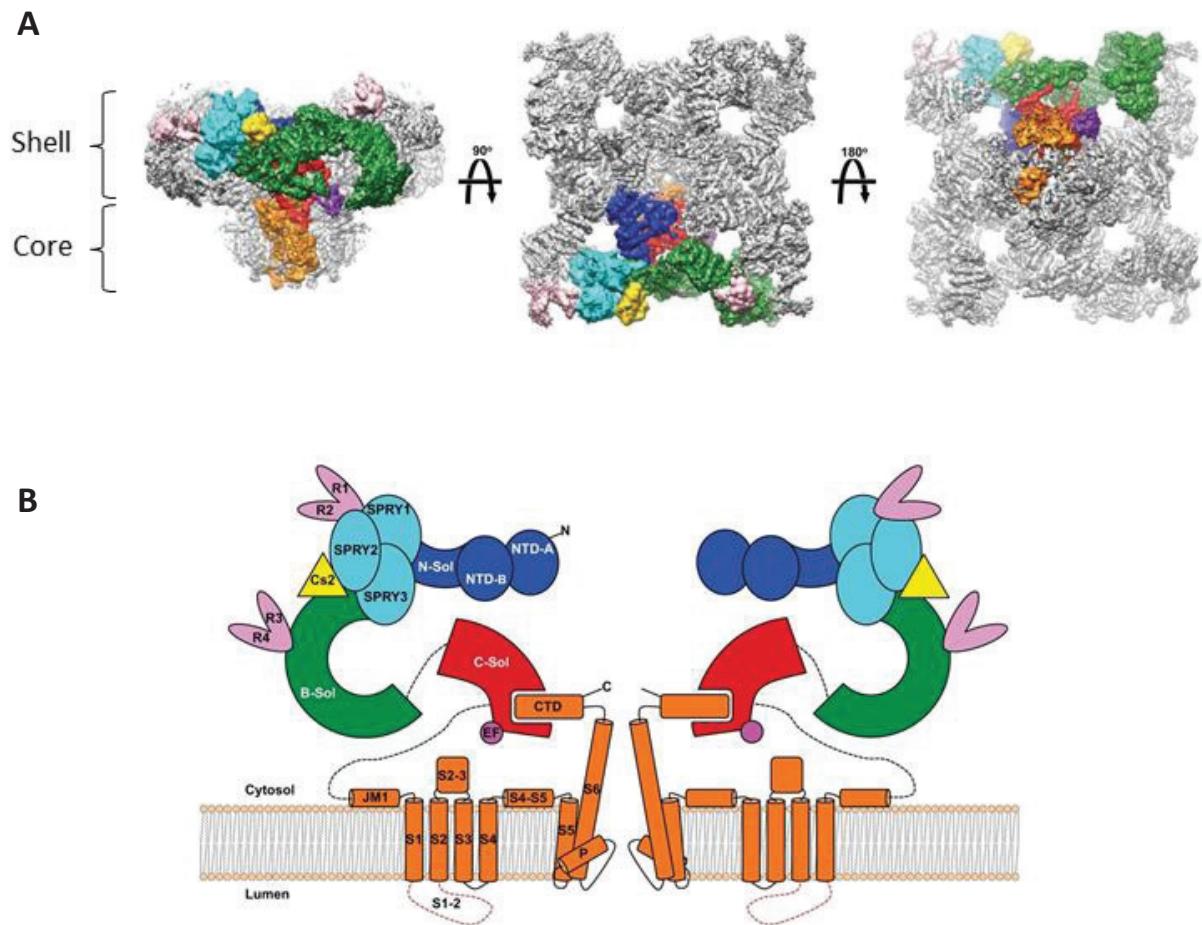


Figure 7. Structure du récepteur de la ryanodine (RYR).

A/ Vues de RYR1 dans le plan de la membrane du RS, du côté cytosolique et du côté luminal. La structure a été modélisée à partir de micrographies de cryo-microscopie électronique avec une résolution de 4,8 Å.

B/ Représentation schématique des différents domaines de RYR1. Le domaine N-terminal est représenté en bleu foncé, les domaines SPRY (1-3) en cyan, la région clamp (R1-R2) et le domaine de phosphorylation (R3-R4) sont en rose, le domaine de liaison à la calstabin en jaune, le solénoïde périphérique en vert et le solénoïde central en rouge, les domaines transmembranaires et le domaine C-terminal en orange et enfin en violet le site de fixation du Ca^{2+} (main EF).

D'après Zalk et al., 2015.

2.3. Le récepteur de la ryanodine

Le récepteur de la ryanodine (RYR), avec le récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), sont deux canaux calciques de structure proche présents dans la membrane du RS, et dont l'ouverture provoque une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique. Cependant seul le RYR est impliqué de manière prépondérante dans le couplage EC et fera l'objet de cette sous partie.

a) *Structure moléculaire*

Le RYR est le plus gros canal ionique connu et se lie avec une très forte affinité à la ryanodine, un alcaloïde extrait de l'arbuste tropical *Ryania speciosa*. D'ailleurs cette propriété a permis la purification et le clonage de cette protéine (Takeshima et al., 1989). Chez le mammifère, il existe 3 gènes *RYR* codant pour les isoformes RYR1, RYR2 et RYR3 (pour revue, voir Meissner, 2017). RYR1 est la principale isoforme présente dans le RS jonctionnel du muscle squelettique, RYR2 est présente dans le muscle cardiaque et dans le muscle lisse et RYR3 est exprimée principalement dans le muscle lisse mais on la retrouve aussi dans le diaphragme, dans les fibres lentes du muscle squelettique en développement et dans le cerveau. Le gène *RYR1* est localisé sur le chromosome 19q13.1 (MacKenzie et al., 1990) et présente 66 % et 67 % d'homologies de séquence avec *RYR2* et *RYR3* respectivement (Nakai et al., 1990; Hakamata et al., 1992). Depuis quelques années, les progrès de cryo-microscopie électronique ont permis d'aborder la structure de RYR1 avec une résolution de 10 Å (Ludtke et al., 2005; Samsó et al., 2005) puis plus récemment avec la résolution quasi atomique de 4,8 Å (Yan et al., 2015; Zalk et al., 2015; Efremov et al., 2015). Le RYR est un homotétramère en forme de trèfle à quatre feuilles, dont chaque sous-unité fait 565 kDa. Il se compose d'une partie transmembranaire (ou « core ») et d'une partie cytosolique très volumineuse (ou « shell ») (Figure 7A) correspondant aux pieds jonctionnels observés en microscopie électronique. La région « core », ancrée dans la membrane du RS, a une structure proche de celle des canaux Na^+ voltage dépendants et contient 6 segments transmembranaires (S1 à S6) entourant le pore central. Les segments S5-S6, le segment P et le segment *helix* forment le domaine pore du canal tandis que les segments S1 à S4 forment le domaine pseudo sensible au potentiel (pVSD, pseudo voltage sensor domain) communiquant avec le domaine pore de la sous-unité adjacente.

La région « shell » représente 80 % de la protéine et se compose pour chaque protomère de plusieurs domaines solénoïdes α dont un solénoïde central formant l'entrée cytosolique du canal et un solénoïde périphérique surmonté par deux domaines N-terminaux (NTD-A et NTD-B) (Figure 7B).

En particulier, ces régions périphériques sont mobiles et la liaison de certaines molécules et protéines modulent l'état d'ouverture du canal via des changements de conformation (Tian et al., 2013). Les nouvelles données structurales de RYR1 à très haute résolution ont permis d'identifier, *via* des simulations de dynamiques moléculaires, les mécanismes de conduction et de sélectivité du canal. En particulier, la sélectivité du canal pour le Ca^{2+} serait conférée par une interaction électrostatique avec des résidus chargés négativement (glutamate et aspartate) dans le pore. Dans ce modèle, l'interaction électrostatique d'un cation divalent avec ces résidus bloquerait le passage de cations monovalents en raison de leur force de répulsion trop faible. Seule l'arrivée d'un autre cation divalent à l'entrée du pore pourrait chasser le premier dans le cytoplasme et le remplacer sur son site (Heinz et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs ont également identifié une nouvelle voie de passage dans laquelle les ions quitteraient RYR1 latéralement.

b) Propriétés et rôles fonctionnels

L'incorporation de vésicules de RS jonctionnel de lapin dans une bicouche lipidique a permis l'identification et l'étude des canaux calciques présents dans ce compartiment (Smith et al., 1985). Ainsi, ces canaux présentent une conductance de 100 pS en présence de 53 mM de Ca^{2+} du côté luminal et leur efflux calcique est activé en présence de Ca^{2+} et d'ATP et inhibé en présence de Mg^{2+} (Smith et al., 1986). La perméabilité de RYR1 aux autres cations est relativement grande avec une spécificité relative : $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ \approx \text{Cs}^+$ et $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ pour les cations monovalents et bivalents respectivement (pour revue, voir Meissner, 2017). Les propriétés d'ouverture et de perméabilité ionique seraient assurées par des résidus glycine présents dans le segment S6 en position 4934 et 4941 pour RYR1 (Ludtke et al., 2005; Mei et al., 2015; Samsó et al., 2009) et en position 4864 pour RYR2 (Euden et al., 2013).

Chez la souris, l'inactivation du gène *Ryr1* (Takeshima et al., 1994) est létale à l'état homozygote et conduit à la perte totale de couplage EC, soulignant son rôle critique dans ce mécanisme. Les myotubes isolés de ces souris « dyspédiques », en référence à l'absence de pieds jonctionnels, ne répondent pas aux stimulations électriques mais se contractent légèrement en présence de caféine, une molécule pharmacologique augmentant la sensibilité de RYR1 pour le Ca^{2+} . Ceci est dû à la présence de RYR3, activable par CICR, dans le muscle squelettique chez l'embryon de mammifère (Conti et al., 1996).

RYR1 et RYR2 jouent respectivement un rôle majeur dans le couplage EC du muscle squelettique et cardiaque puisque leur activation permet la libération massive des stocks de Ca^{2+} du RS dans le cytoplasme, activant la machinerie contractile. Cependant, une différence majeure existe entre ces

deux types de muscles et réside dans le mode d'activation du RYR. Dans le cœur, le couplage EC repose sur un mécanisme appelé « Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release » (CICR, Fabiato, 1985) où l'entrée de Ca^{2+} à travers la sous-unité $\alpha 1\text{C}$ du DHPR est nécessaire à l'ouverture des canaux RYR2. En revanche, dans le muscle squelettique, le couplage EC repose sur l'interaction mécanique entre RYR1 et le DHPR, médiée par la fonction senseur de potentiel de $\alpha 1\text{S}$ (Rios et Brum, 1987; Tanabe et al., 1990; Marty et al., 1994). Dans le muscle squelettique de vertébrés, les DHPRs sont groupés par quatre (tétrade) et chaque DHPR fait face à un monomère de RYR1 (Franzini-Armstrong et Nunzi, 1983). On estime qu'une tétrade sur deux de DHPR fait face à un RYR, soit environ 50 % des RYR1 sont activés directement par $\text{Ca}_v1.1$ via un couplage mécanique (Paolini et al., 2004; Rios et Pizarro, 1988). Ainsi l'ensemble des RYR1 et des DHPRs associés sur la face d'un domaine jonctionnel sont activés de concert et forment une unité fonctionnelle appelée « couplon » (Stern et al., 1997). De plus, plusieurs études et notamment sur fibres pelées montrent que RYR1 conserve sa capacité à être activé par le Ca^{2+} lorsqu'il n'est plus sous la répression du DHPR (Stienen et al., 1985). Ainsi les RYR1 non couplés dans les tétrades pourraient être activés par CICR (Fabiato, 1985) ou par couplage mécanique (ou « coupled gating ») avec les RYR1 adjacents (Marx et al., 1998; Yin et al., 2005).

c) *Événements calciques élémentaires (ECE)*

L'avènement de la microscopie confocale à balayage laser à la fin des années 1980 a permis l'étude des signaux calciques dans un volume confocal de l'ordre de $0.3 \times 0.3 \times 0.5 \mu\text{m}^3$. La première détection d'événements calciques localisés a été réalisée en 1993 par Cheng et son équipe, sur des cardiomyocytes de rat. Ces événements calciques élémentaires (ECE), appelés *sparks*, correspondent à des élévations rapides et transitoires de Ca^{2+} dans un espace restreint.

La présence de *sparks* au niveau des triades a également été observée dans les fibres musculaires squelettiques de grenouille (Tsugorka et al., 1995; Klein et al., 1996). Leur fréquence d'apparition est relativement faible au repos mais augmente fortement en réponse à des dépolarisations. La sommation temporelle des *sparks* au cours d'une dépolarisation est responsable du signal calcique macroscopique (Klein et al., 1997) et la dépendance au potentiel de ces événements montre que plus la dépolarisation est élevée, plus les *sparks* apparaissent en début de pulse et plus leur fréquence augmente. En revanche l'amplitude unitaire et le temps de montée ne varient pas, suggérant que la conductance et les cinétiques d'ouverture du canal sont indépendantes du potentiel (Klein et al., 1997; Lacampagne et al., 1996). La caractérisation des *sparks* indique une largeur à mi-hauteur (ou FWHM pour Full Width at Half Maximum) de $2 \mu\text{m}$, une amplitude de l'ordre de 1 unité de fluorescence ($F/F_0 = 1$) de l'indicateur fluo-3, une phase de montée de 5 ms et une durée d'environ

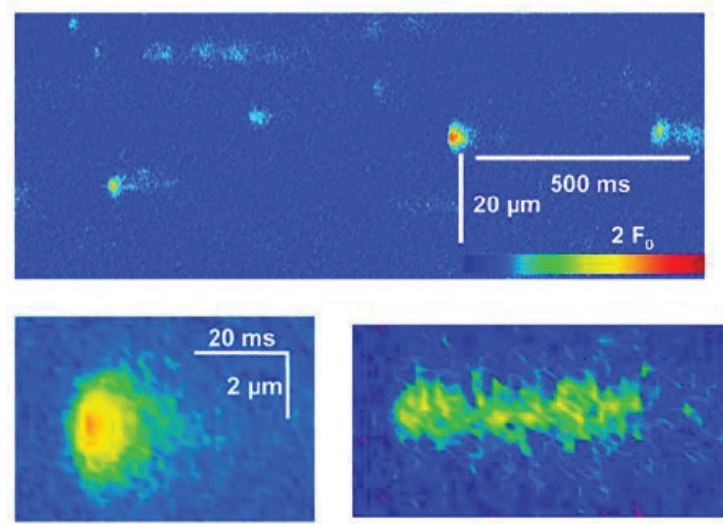
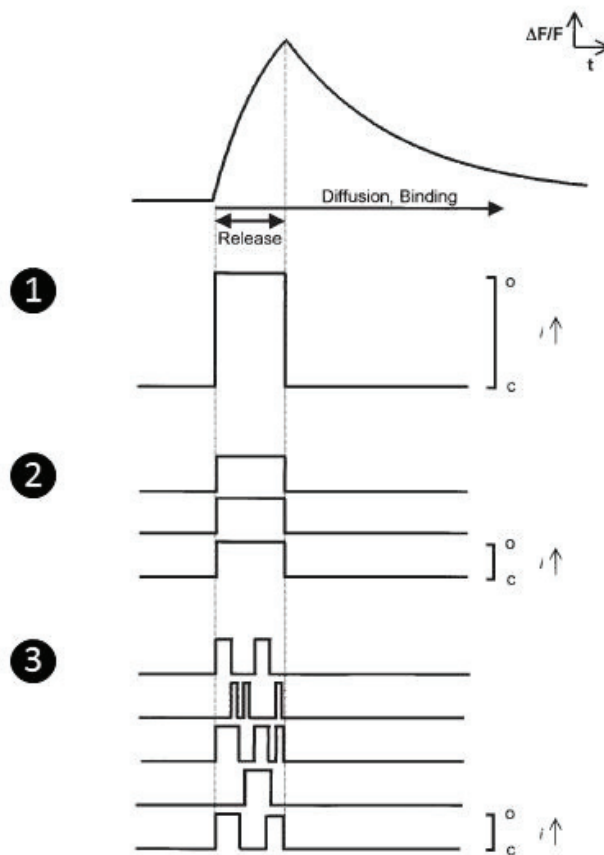
A**B**

Figure 8. Événements calciques élémentaires (ECE) dans la fibre musculaire de mammifère.

A/ Images en mode *line-scan* (x,t) de la fluorescence (F/F_0) d'un indicateur calcique, enregistrées dans une fibre musculaire squelettique de rat perméabilisée à la saponine. Les images du bas illustrent les deux types d'ECE : un *spark* à gauche et un *ember* à droite.

B/ Modèles proposés par Schneider (1999) décomposant les événements unitaires à l'origine d'un *spark*. Ainsi la phase de montée d'un *spark* pourrait résulter de :

- (1) l'ouverture prolongée d'un seul canal.
- (2) l'ouverture simultanée et prolongée de plusieurs canaux.
- (3) l'ouverture et la fermeture asynchrone et en rafale d'un groupe de canaux.

10 ms (Figure 8A) (pour revue, voir Csernoch, 2007). Bien que les *sparks* soient considérés comme des ECE, plusieurs modèles existent concernant les mécanismes à l'origine de leur formation (Schneider, 1999). Ainsi la phase de montée d'un *spark* pourrait résulter de l'ouverture (1) d'un seul ou (2) de plusieurs canaux simultanément. Une troisième hypothèse serait qu'un groupe de canaux s'ouvrent et se ferment en rafale et de façon asynchrone (Figure 8B).

Alors que des *sparks* sont déclenchés par dépolarisation dans les fibres musculaires squelettiques d'amphibiens, les fibres adultes de mammifères génèrent un transitoire calcique homogène, dénué d'ECE détectables en microscopie confocale (Shirokova et al., 1998). En revanche, les fibres embryonnaires de mammifères ou en culture présentent des *sparks* (Shirokova et al., 1999; Chun et al., 2003). Ainsi la capacité de la fibre à produire des *sparks* a été attribuée dans un premier temps à la présence respective de RYR3 ou de son analogue RYR β dans les fibres embryonnaires de mammifères et les fibres adultes d'amphibiens. Cependant, quelques études portant sur des myotubes déficients en RYR3 ou en RYR1 ont montré la présence de *sparks* dans ces deux conditions (Shirokova et al., 1999; Ward et al., 2000) suggérant que la répression des ECE dans les fibres adultes de mammifère résulte d'un mécanisme de contrôle de l'activité de RYR1 plutôt que de la composition en isoforme. De plus, des ECE ont été observés dans les régions triadiques de fibres pelées de mammifères, c'est à dire dans des conditions expérimentales où le sarcolemme est enlevé mécaniquement ou chimiquement (Kirsch et al., 2001). L'ensemble de ces observations indique que (1) RYR1 est également capable de générer des ECE (2) dans des conditions où le complexe triadique n'est pas encore formé ou encore lorsque l'interaction mécanique avec le DHPR est abolie. Dans le muscle squelettique adulte de mammifère, en conditions physiologiques, le couplage mécanique entre le DHPR et RYR1 réprime toute activation de ce dernier par CICR. Chez les amphibiens et les embryons de mammifères, les RYR3 sont exprimés et localisés dans les régions para-jonctionnelles, de part et d'autre des doubles rangées de RYR1 (Felder et Franzini-Armstrong, 2002). Dans ce contexte, l'activation des RYR3 par CICR contribuerait aux *sparks* générés au cours d'une dépolarisation. En accord avec cette hypothèse, la transfection d'ADNc de RYR3 dans le muscle adulte de souris recrée le phénotype de la grenouille, avec la production de *sparks* spontanés et générés par dépolarisations (Pouvreau et al., 2007). Cependant, une autre étude réalisée dans des conditions similaires montre des résultats divergents avec notamment l'observation de vagues calciques spontanées mais pas de *sparks* (Legrand et al., 2008). La question reste donc encore controversée.

En 2004, une étude a identifié la présence d'ECE appelés *embers* dans la fibre musculaire de rat, en condition de potentiel imposé avec la technique de *Vaseline Gap* (Csernoch et al., 2004). Par comparaison, les *embers* sont des ECE moins intenses que les *sparks* (entre 0.1 et 0.4 unités de

fluorescence de l'indicateur fluo-3) et bien plus prolongés (jusqu'à 100 ms) (Figure 8A). Ces événements, d'amplitude constante et dont la fréquence est dépendante du potentiel, sont suspectés refléter l'activité d'un seul ou d'un groupe très restreint et synchronisé de RYRs. De plus, leur durée est fortement corrélée à celle de la dépolarisation, suggérant que l'activité des canaux s'interrompt lors de la repolarisation membranaire (Csernoch et al., 2008). A l'image des *sparks* dans le muscle d'amphibien, la sommation des *embers* semble constituer le transitoire calcique macroscopique dans le muscle de mammifère.

d) Régulations

Régulation endogène de RYR1

De nombreux travaux ont identifié une grande variété de seconds messagers et de ligands intracellulaires impliqués dans la régulation de RYR1. Cependant, ces études ont été réalisées pour la plupart sur des préparations de canal isolé, c'est-à-dire hors de l'influence de son environnement, et nécessitent d'être confirmées en conditions physiologiques.

Parmi les molécules régulatrices de l'activité de RYR1, le Ca^{2+} peut agir du côté cytosolique comme du côté luminal. La relation entre l'activité du canal et la concentration en Ca^{2+} cytosolique $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a la forme d'une courbe en cloche, avec une activation maximale autour de $5 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alors que de fortes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\sim 1 \text{ mM}$) inhibent le canal (Meissner et al., 1986). La sensibilité d'activation par le Ca^{2+} de RYR2 et de RYR3 est similaire à celle de RYR1, cependant leur probabilité d'ouverture maximale est supérieure et leur inactivation nécessite une plus forte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Chen et al., 1997; Xu et al., 1998). Ce comportement biphasique implique que le RYR possède au moins deux sites de liaison au Ca^{2+} : un site de haute affinité permettant l'ouverture du canal et un site de faible affinité inhibant le canal. Les récentes données de cryo-microscopie électronique identifient le site de haute affinité à l'interface entre le domaine solénoïde central et le domaine C-terminal, tandis que le site de faible affinité serait porté par deux motifs dits « main EF » présents dans le domaine C-terminal (pour revue, voir Meissner, 2017). La modulation de l'activité du RYR par le Ca^{2+} luminal est potentialisée en présence d'ATP ou de caféine du côté cytosolique.

Le Mg^{2+} cytosolique libre inhibe l'activité de RYR1 par deux mécanismes : (1) en entrant en compétition avec le Ca^{2+} pour le site cytosolique de haute affinité pour le Ca^{2+} et (2) en se liant aux sites de faible affinité inhibant le canal (Meissner et al., 1986; Ogawa et al., 1999). Ainsi, le Mg^{2+} décale la dépendance au Ca^{2+} de l'activité du RYR vers des concentrations plus élevées et diminue l'amplitude maximale de l'efflux calcique (Ogawa et al., 1999).

L'ATP est un activateur du RYR, et la probabilité d'ouverture du canal dépendante du Ca^{2+} atteint son maximum en présence d'ATP (Meissner et al., 1986; Smith et al., 1986). Les autres nucléotides adénylés (ADP, AMP, cAMP, adénosine et adénine) activent également le RYR mais moins efficacement que l'ATP (Meissner, 1984; Laver et al., 2001). D'après les récentes données de cryo-microscopie électronique, le site de liaison de l'ATP serait localisé au niveau de l'extension cytoplasmique du segment S6 et du domaine C-terminal (Des Georges et al., 2016). En conditions physiologiques, la majorité de l'ATP intracellulaire forme un complexe avec le Mg^{2+} qui est présent en grandes quantités (1,5 mM). Ainsi, une augmentation de $[\text{Mg}^{2+}]$ favorise la formation du complexe Mg-ATP et diminue la concentration d'ATP libre, réduisant l'activité du RYR. Cependant, peu de données permettent de définir si c'est la forme libre ou complexée de l'ATP qui régule l'activité du RYR en conditions physiologiques.

RYR1 possède dans sa partie cytosolique plusieurs sites potentiels de phosphorylation, régulés par des protéines telles que les protéines kinase A, G, C (PKA, PKG, PKC), la Ca^{2+} -dépendante calmoduline kinase II (CaMKII), et les protéines phosphatases 1, 2A, 2B (PP1, PP2A, PP2B) (pour revue, voir Meissner, 2017). En particulier, un résidu sérine (S2843) présent dans le domaine P2 - entre les résidus 2734 et 2940 - du RYR1 de lapin a été identifié comme site de phosphorylation par la PKA, la PKG et la CaMKII (Suko et al., 1993). Dans le cœur, l'hyper-phosphorylation du résidu S2814 par la CaMKII est associée à un état fuiteux de RYR2, à l'origine d'une fibrillation auriculaire (Li et al., 2014). Des états fuiteux de RYR1 et de RYR2 ont également été reportés dans un modèle d'insuffisance cardiaque et impliqueraient le détachement de la FKBP (FK506-binding protein) du complexe RYR, médié par une hyperactivité de la PKA (Marx et al., 2000; Reiken et al., 2003; Ward et al., 2003). Cependant ces résultats ont été remis en cause par d'autres études (Stange et al., 2003; Xiao et al., 2005; Alvarado et al., 2017).

Le RYR est hautement sensible aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) et aux espèces réactives nitriques (RNS), produites naturellement par le muscle à de faibles concentrations pendant l'exercice. Ces molécules régulent l'activité du RYR en interagissant avec les groupements sulfhydriles (ou thiols) des cystéines. En particulier, chaque sous-unité de RYR1 possède 100 résidus cystéines auxquels s'ajoute une cystéine par FKBP12 (pour revue, voir Lanner et al., 2010). Dans des conditions comparables au repos musculaire, environ 20 % de ces résidus sont dans un état réduit (*i. e.* les thiols sont libres) et peuvent être oxydés ou S-nitrosylés par le NO, le glutathion réduit ou oxydé (GSH/GSSH) et une augmentation de la pO_2 . En 2001, Sun et al. ont montré qu'une oxydation modérée à pO_2 tissulaire (~10 mm Hg) augmentait l'activité de RYR1 de manière réversible. En revanche, une oxydation plus importante conduit à l'inactivation irréversible du canal. Les mécanismes physiologiques de régulation de l'activité de RYR1 et de l'homéostasie calcique par le

NO ont été étudiés en dans la fibre musculaire intacte et révèlent qu'en excès, le NO active RYR1 en modifiant son état redox et maintient le canal ouvert (Pouvreau et al., 2004). Un état fuitieux de RYR1 a également été constaté en conditions pathologiques, et serait causé par une augmentation de la S-nitrosylation de RYR1 provoquant sa dissociation de la FKBP12 (Bellinger et al., 2009; Matecki et al., 2016).

La régulation de l'activité de RYR1 et de l'homéostasie calcique a aussi été étudiée vis-à-vis des phosphoinositides (PtdInsPs), qui sont de petites molécules insérées dans les membranes. En particulier, de faibles concentrations de PtdIns(4,5)P₂, présent majoritairement dans la membrane plasmique et le tubule T, stimulent la libération de Ca²⁺ lorsqu'appliquées sur une préparation de vésicules membranaires de citernes terminales de RS (Chu et Stefani, 1991), suggérant un possible rôle de modulateur direct du couplage EC. Cette possibilité a été étayée par d'autres travaux sur fibre musculaire pelée ainsi que sur vésicules de RS (Kobayashi et al., 1989; Ogawa et Harafuji, 1989; Ohizumi et al., 1999). Les données de la littérature concernant le rôle potentiel des PtdInsPs sur l'activité du RYR et le couplage EC sont détaillées dans le *Chapitre 3 Phosphoinositides*.

Pharmacologie

Le récepteur de la ryanodine est la cible de nombreux agents pharmacologiques. La majorité des molécules régulant positivement l'activité du RYR augmentent la sensibilité du canal au Ca²⁺ cytosolique sans altérer la conductance unitaire. La caféine en est la démonstration : à faible concentration (de 0,5 à 2 mM), cet alcaloïde végétal provoque un accroissement de la probabilité d'ouverture des canaux en présence de concentrations micromolaires de Ca²⁺ du côté cytosolique. A forte concentration de caféine (> 5 mM), la durée d'ouverture du canal est augmentée et l'efflux calcique à lieu même en présence de quelques nM de [Ca²⁺]_i (Rousseau et al., 1988).

Le 4-chloro-m-cresol (4-CmC) est un activateur spécifique de RYR1 (Zorzato et al., 1993) mais n'a aucun effet sur RYR3 (Fessenden et al., 2000). L'expression de chimères RYR1-RYR3 dans des myotubes dyspédiques indique que la région de RYR1 ciblée par le 4-CmC est située entre les résidus 4007 et 4180 (Fessenden et al., 2003). Le 4-CmC est notamment utilisé dans le test de contracture *in vitro* pour diagnostiquer la SHM (Gilly et al., 1997) ou encore en recherche pour vider et ainsi évaluer le contenu calcique du RS (Ziman et al., 2010).

Le dantrolène est un bloqueur de l'activité de RYR1. Ce dérivé de l'hydanthoine est utilisé en clinique pour stopper la crise hypermétabolique déclenchée par les anesthésiques halogénés chez les patients souffrant de SHM. Les études de l'activité du canal en présence de dantrolène faites sur des vésicules de RS purifiées suggèrent une liaison de haute affinité à RYR1, limitant son activation par le Ca²⁺ et la calmoduline (Fruen et al., 1997). Notamment, un site potentiel de fixation identifié *in vitro*

serait localisé dans la région N-terminale de RYR1, entre les résidus 590 et 609 (Paul-Pletzer et al., 2002). Cependant les mécanismes de son mode d'action sont loin d'être entièrement élucidés. En particulier, une étude utilisant la technique de double vaseline gap et de silicone clamp a montré qu'il n'y avait pas d'effet direct du dantrolène sur la probabilité d'ouverture du canal, et suggère que le site d'interaction ne serait directement sur RYR1 mais dans son environnement proche (Szentesi et al., 2001). Plus récemment, Launikonis et son équipe ont montré sur fibre musculaire pelée, que le dantrolène régule négativement l'activité de RYR1 en augmentant son affinité pour le Mg^{2+} (Choi et al., 2017).

La ryanodine est un alcaloïde végétal se fixant sur deux sites respectivement de haute et de faible affinité situés sur l'extrémité C-terminale du RYR (Callaway et al., 1994) : à faible concentration (~ 10 nM), la fréquence d'ouverture du RYR est augmentée et sa conductance est normale. A une concentration comprise entre 1 et 10 μM , la ryanodine provoque une sous-conductance du canal associée à des temps d'ouverture plus lents, conduisant à une fuite de Ca^{2+} et à la vidange du RS. Enfin, à forte concentration (> 50 μM), le canal est maintenu dans un état fermé. Cependant, aucune preuve de ce dernier résultat n'a été obtenue en condition physiologique. L'injection de ryanodine dans la fibre musculaire intacte en condition de potentiel imposé a montré une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ après stimulation d'autant plus importante que l'amplitude ou la durée de la dépolarisation est élevée. Ces résultats favorisent l'hypothèse selon laquelle la fixation de la ryanodine au canal dépend de son ouverture et a comme conséquence le maintien du canal dans un état ouvert (Collet et Jacquemond, 2002).

Le rouge de ruthénium est également un bloqueur du RYR. Dans un modèle de bicouche lipidique en présence de Ca^{2+} (μM) du côté *cis* (équivalent cytoplasmique), le rouge de ruthénium inhibe l'activité du canal en augmentant son temps de fermeture et son mécanisme d'action est dépendant du potentiel (Buck et al., 1992; Ma, 1993). En particulier, le rouge de ruthénium se lierait au RYR sur des sites communs au Ca^{2+} et à la calmoduline, dans un environnement proche du pore du canal (pour revue, voir Zucchi et Ronca-Testoni, 1997).

e) Les pathologies associées

Chez l'Homme, près de 300 mutations ont été identifiées dans le gène codant pour RYR1 et peuvent conduire à des perturbations fonctionnelles du couplage EC et/ou de l'homéostasie calcique. Les pathologies causées par ces mutations sont la susceptibilité à l'hyperthermie maligne (SHM), la myopathie à cores centraux (MCC), la myopathie multi-minicores (multi-minicore disease ; MmD) et la myopathie centronucléaire. En particulier, les altérations du couplage EC semblent participer aux

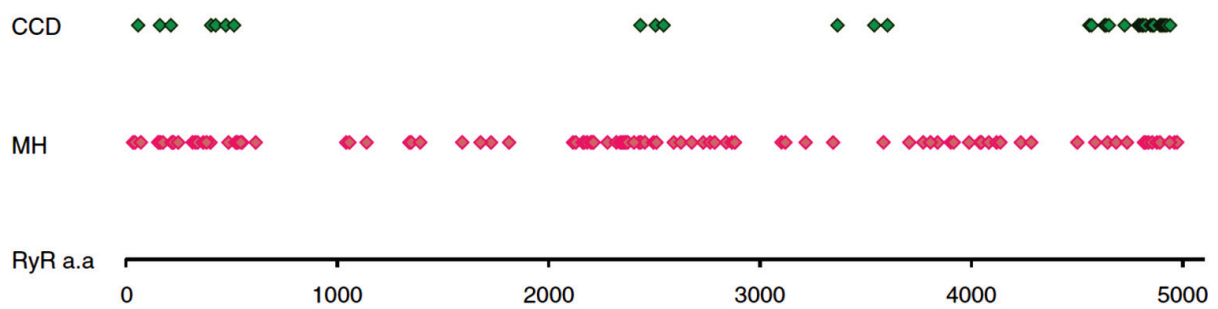


Figure 9. Position des mutations de RYR1 associées à l'hyperthermie maligne (MH) et à la myopathie à cores centraux (CCD).

La majorité de ces mutations sont localisées entre les résidus C35 et R614 dans le domaine N-terminal, entre D2129 et R2458 dans la région centrale et entre I3916 et G4942 dans l'extrémité C-terminale. D'après Lanner et al., (2010).

mécanismes pathologiques de la SHM et de la MCC (pour revues, voir Marty et Fauré, 2016; Allard, 2018; Jungbluth et al., 2018). En revanche, les conséquences fonctionnelles des mutations de RYR1 associées à la MmD ont été peu étudiées dans un environnement physiologique et les études sur des myotubes dyspédiques exprimant certains de ces RYR1 mutants indiquent que la réduction de l'expression et de la stabilité de RYR1, davantage qu'un défaut de son activité, pourraient jouer un rôle pathologique (Zhou et al., 2006, 2010). La myopathie centronucléaire sera traitée dans le *Chapitre 2*.

L'hyperthermie maligne

L'origine et les bases moléculaires de l'HM, évoquée précédemment dans le cadre des pathologies associées au DHPR, ont été découvertes dans une série d'expérimentations menées sur le cochon. Le syndrome du stress porcin (SSP), formulé pour la première fois en 1968 par Topel et al., réfère à la mort subite de porcs suite à un stress lié à leur transport ou à une manipulation trop brusque. Ces porcs présentent une unique mutation dans le gène codant pour RYR1 (Fujii et al., 1991) conduisant au remplacement d'une arginine par une cystéine en position 615 (R615C) dans la partie cytosolique de RYR1. Plusieurs études menées dans les années 1990 ont montré une activité prolongée ainsi qu'une hypersensibilité du RYR mutant à la caféine et à l'halothane (Shomer et al., 1994; Otsu et al., 1994). Chez l'Homme, plus de 150 mutations de RYR1 sont responsables de la SHM et sont localisées pour la majorité entre les résidus C35 et R614 dans le domaine N-terminal, entre D2129 et R2458 dans la région centrale et entre I3916 et G4942 dans l'extrémité C-terminale (pour revues, voir Lanner et al., 2010; Reddish et al., 2017) (Figure 9). A l'instar de la mutation porcine, certaines mutations humaines étudiées dans des systèmes hétérologues, dans des myotubes transfectés, ou encore dans des fibres musculaires de souris transgéniques réduisent le seuil d'activation de RYR1 en présence d'halothane ou de caféine (Censier et al., 1998; Chelu et al., 2005; Tong et al., 1997). Outre l'hypersensibilité de l'efflux calcique vis-à-vis de ces activateurs pharmacologiques, la dépendance au potentiel du relargage de calcium est décalée vers des valeurs plus négatives dans les muscles porcins (Gallant et Lentz, 1992; Dietze et al., 2000) et dans les fibres de souris transgéniques exprimant la mutation humaine Y523S (Andronache et al., 2009; Lefebvre et al., 2011). De plus, une récente étude suggère que cette altération du couplage EC serait potentialisée en présence d'anesthésiques volatiles halogénés (Zullo et al., 2018).

La myopathie à cores centraux

La MCC est une maladie congénitale autosomique dominante se manifestant généralement dans l'enfance par une activité motrice retardée, et se caractérisant par une hypotonie plus ou moins

sévère selon les patients MCC et par une faiblesse musculaire typiquement proximale. Les biopsies musculaires de patients révèlent la présence de cores centraux préférentiellement dans les fibres de type 1 associés à une réduction de mitochondries et d'enzymes oxydatives, ainsi qu'une désorganisation de l'appareil contractile (pour revue, voir Jungbluth, 2007). Environ 50 % des cas de MCC sont causés par des mutations dans le gène *RYR1*, majoritairement localisées dans la partie C-terminale du canal, dont certaines sont communes à la SHM et/ou présentent un risque de SHM (Figure 9). Même si pour l'instant le lien entre *RYR1* et la présence de cores n'est pas connu, l'altération de l'efflux calcique résultant d'une réduction de la perméabilité du canal semble être un mécanisme pathologique responsable de la faiblesse musculaire associée à la MCC. En effet, plusieurs travaux ont montré une nette réduction de l'amplitude des transitoires calciques déclenchés par dépolarisation dans les fibres musculaires exprimant des formes mutées MCC de *RYR* (Lefebvre et al., 2011, 2013) ou de souris transgénique reproduisant la mutation I4898T (Loy et al., 2011).

2.4. Interactions entre le RYR et le DHPR

a) La boucle II-III de α_{1S}

La première indication d'une interaction mécanique au sein du complexe protéique formé par *RYR1* et le DHPR a été mise en évidence dans le muscle squelettique de lapin avec la co-immunoprécipitation de *RYR1* et de la sous-unité α_{1S} (Marty et al., 1994). Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'utilisation d'un DHPR chimère composé de portions squelettique et cardiaque de la sous unité α a permis de cibler la boucle entre les domaines transmembranaire II et III comme étant nécessaire au couplage EC (Tanabe et al., 1990). Spécifiquement, plusieurs études du couplage EC dans des myotubes dysgéniques exprimant des formes mutées de α_{1S} indiquent que la région centrale et la région C-terminale de la boucle II-III sont critiques au couplage conformationnel avec *RYR1* (pour revue, voir Bannister, 2016). En 2010, Beam et Bannister ont proposé un modèle dans lequel l'interaction transitoire entre la région centrale (entre les résidus 720 et 765) et son partenaire jonctionnel permettrait l'efflux calcique du RS tandis que la région C-terminale (entre les résidus 766 et 799) serait impliquée dans l'ancrage jonctionnel et dans le couplage rétrograde, un mécanisme que nous détaillerons plus loin.

b) La sous-unité β_{1a}

La sous-unité α_1 du DHPR ne serait pas la seule à participer à l'interaction DHPR-RYR. En effet, les myotubes de la souris déficiente pour la sous-unité squelettique β_{1a} du DHPR présentent une interruption du couplage EC caractérisée par l'absence de transitoires calciques et une réduction drastique du courant Ca^{2+} de type L (Gregg et al., 1996). Cependant, le rôle direct de β_{1a} dans le couplage conformationnel entre RYR1 et le DHPR est difficile à mettre en évidence puisqu'il participe également à l'adressage de α_{1S} à la membrane et à son organisation en tétrades. En 2005, Cheng et son équipe ont identifié *in vitro* un site d'interaction entre β_{1a} et une séquence $\text{K}^{3495}\text{KKRR} _ _ \text{R}^{3502}$ de RYR1 riche en résidus chargés positivement. De plus, l'expression d'un RYR1 mutant pour cette séquence dans les myotubes dyspédiques altère fortement l'amplitude des transitoires calciques. En accord avec ces résultats, une récente étude a montré que la surexpression d'une protéine interagissant avec β_{1a} dans les fibres matures de poisson zèbre provoquait un découplage entre α_{1S} et RYR1, caractérisé par une altération sensible des transitoires Ca^{2+} sans que la fonction senseur de potentiel de α_{1S} et le contenu calcique du RS ne soient affectés (Beqollari et al., 2015). Bien que la région spécifique et minimale de β_{1a} interagissant avec RYR1 ne soit pas encore identifiée, plusieurs études soulignent l'importance de sa partie C-terminale dans le couplage EC (Rebeck et al., 2011; Hernández-Ochoa et al., 2014).

c) Les domaines SPRY de RYR1

Les dernières avancées dans la résolution structurale de RYR1 ont permis d'identifier les domaines cytosoliques SPRY comme des sites potentiels de liaison avec le DHPR. Ces domaines SPRY (1-3) sont impliqués dans les interactions protéine-protéine et se constituent de deux feuillets β apposés antiparallèlement. Plus spécifiquement, une étude de liaison *in vitro* a identifié le peptide 1076-1112 du domaine SPRY2 comme site d'interaction avec la boucle II-III du DHPR (Leong et MacLennan, 1998). En accord avec ces résultats, des études de reconstructions 3D et d'immunomarquage menées par Samsó et son équipe suggèrent que la boucle II-III de α_{1S} pourrait accéder au domaine SPRY2 soit en surface à travers un sillon, soit par une interaction sur le bord de RYR1 (Perálvarez-Marín et al., 2011; Szpyt et al., 2012).

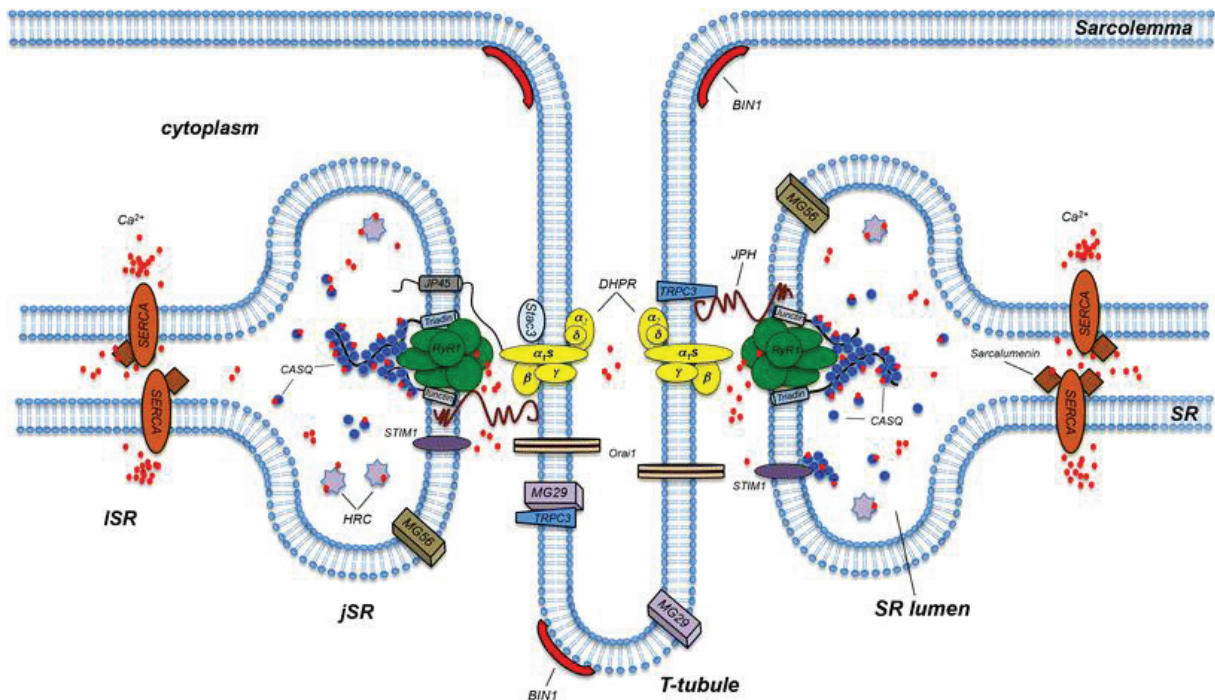


Figure 10. Schéma illustrant les protéines triadiques dans le muscle squelettique.

D'après Barone et al., (2015)

d) Le couplage rétrograde

En parallèle du couplage orthograde, c'est à dire le signal du couplage EC, RYR1 a la capacité de contrôler l'activité du DHPR. En effet, il a été observé dans les myotubes dyspédiques une réduction drastique du courant à travers les canaux calciques de type L, sans altération des mouvements de charges ni de l'expression du DHPR à la membrane (Nakai et al., 1996). Le couplage rétrograde n'influe donc pas sur la fonction détecteur de potentiel du DHPR mais uniquement sur sa fonction de canal calcique. De plus, la réexpression dans les myotubes dysgéniques d'une sous-unité α_1 chimérique suggère que la boucle II-III squelettique et en particulier sa région centrale (720-765) est nécessaire au couplage ortho- et rétrograde (Grabner et al., 1999).

2.5. Les autres protéines du complexe

Le complexe formé par RYR1 et le DHPR est stabilisé et régulé par de nombreuses protéines associées, incluant la FKBP12 (12 kDa FK506 binding protein) et STAC3 dans l'espace triadique et la triadine, la calsequestrine et la junctine régulant RYR1 du côté luminal (Figure 10).

a) La FKBP12 (calstabin 1)

Cette petite protéine de 12 kDa tient son nom de l'agent immunosuppresseur FK506 avec lequel elle se lie avec une forte affinité. Dans le muscle squelettique, la FKBP12 se lie à RYR1 avec une stœchiométrie de 4 :1 (une FKBP12 par sous unité de RYR1) (Collins, 1991; Jayaraman et al., 1992). La co-expression de la FKBP12 et de RYR1 dans les cellules d'insecte a révélé un effet suppresseur des états de sous-conductance et stabilisateur de l'état fermé du canal (Brillantes et al., 1994). De plus, le décrochage de la FKBP12 de RYR1 en présence de rapamycine ou de FK506 provoque une augmentation des états de sous-conductance ainsi que de la probabilité et du temps d'ouverture du canal (Ahern et al., 1997; Brillantes et al., 1994). D'après les études de cryo-microscopie électronique, le site de fixation de la FKBP12 serait localisé à l'interface entre les domaines SPRY1, SPRY3 sur le bord latéral de la région cytosolique (Samsó, 2017; Samsó et al., 2006). Même s'il existe peu/pas d'arguments expérimentaux démontrant un effet de la dissociation de la FKBP12 sur l'activité de RYR1 en conditions physiologiques dans une fibre musculaire intacte, il est important de rappeler qu'un tel mécanisme est postulé jouer un rôle crucial dans l'augmentation de la fuite de Ca^{2+} du RS dans diverses situations pathologiques (voir chapitre 1-II-3-d).

b) STAC3

Chez l'Homme, une mutation dans le gène *STAC3* a été découverte dans 5 familles américaines atteintes de « Native American myopathy » (NAM) (Horstick et al., 2013), une myopathie rare associée à une faiblesse musculaire congénitale, une raideur articulaire, un ptosis et une susceptibilité à l'HM (Stamm et al., 2008). Cette petite protéine apparaît comme un élément essentiel à la régulation du couplage EC. En effet, à l'instar des souris déficientes en α_{1S} , β_{1A} , et RYR1, la souris déficiente en *STAC3* meurt d'asphyxie durant la période périnatale. Les myotubes de cette souris présentent une altération du couplage EC, caractérisée par une absence de transitoires calciques déclenchés par dépolarisation mais un efflux calcique normal en présence de 4-CmC (Nelson et al., 2013). Des défauts similaires ont été observés dans les fibres embryonnaires d'une lignée mutante de poisson zèbre (*mi34*) et l'expression exogène de la forme sauvage de *STAC3* restaure les transitoires calciques déclenchés par dépolarisation (Horstick et al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle critique de *STAC3* dans la communication entre α_{1S} et RYR1 et/ou dans l'adressage correct de α_{1S} à la membrane du tubule T. En faveur de cette deuxième hypothèse, la co-expression hétérologue de *STAC3* et de α_{1S} est nécessaire à l'adressage de ce dernier à la membrane des cellules tsA201 (Polster et al., 2015). Il a récemment été démontré que *STAC3* se lie à l'extrémité C-terminale de *Ca_v1.1*, et que par ailleurs cette interaction est affaiblie chez différents variants de *STAC3* associés à la NAM, conduisant à une plus faible expression de *Ca_v1.1* à la membrane de cellules recombinantes HEK293 (Niu et al., 2018).

c) La triadine

Plusieurs isoformes de la triadine (Trisk 32, Trisk 51 et Trisk 95) sont exprimées dans le muscle squelettique et le cœur, et résultent d'un épissage alternatif du gène *TRDN*. Ces isoformes sont nommées ainsi en raison de leur poids moléculaire de 32, 51 et 95 kDa respectivement et s'insèrent dans la membrane du RS via une hélice α . Trisk 95 et Trisk 51 sont majoritairement exprimées dans le muscle squelettique et notamment à la triade où leur domaine N-terminal interagit avec la région cytoplasmique de RYR1 tandis que leur partie C-terminale interagit avec RYR1 et la calséquestrine dans la lumière du RS (pour revues, voir Marty, 2015; Dulhunty et al., 2017). Contrairement à RYR1, α_{1S} , β_{1A} et *STAC3*, l'ablation génétique de la triadine chez la souris n'est pas létale mais provoque une faiblesse musculaire modérée associée à une arythmie cardiaque (Oddoux et al., 2009; Shen et al., 2007). En particulier, les fibres musculaires de souris déficientes en triadine présentent ~ 25 % de triades anormalement orientées, et une déformation du RS a été observée dans des cellules COS-7

exprimant Trisk 95 de manière ectopique (Oddoux et al., 2009; Fourest-Lieuvin et al., 2012). Ces résultats suggèrent un rôle structural de la protéine dans la stabilisation des jonctions entre les tubules T et le RS. De plus, une réduction de l'amplitude des transitoires calciques ainsi que du contenu calcique du RS ont été observées dans ces modèles, cependant la réduction concomitante de l'expression de la calséquestrine rend l'interprétation complexe quant au rôle individuel de la triadine dans la régulation du couplage EC. La surexpression de Trisk 95 dans des myotubes squelettiques de rat, de même que l'utilisation de siRNA spécifique de la triadine dans les cellules C2C12, provoquent une réduction du relargage calcique dans le cytosol sans affecter les stocks calciques du RS (Rezgui et al., 2005; Wang et al., 2009). Ces altérations ont également été observées dans des myotubes dyspédiques exprimant des RYR1 mutants dont le domaine d'interaction cytosolique avec la triadine est abrogé (Goonasekera et al., 2007). L'étude en bicouche lipidique de RYR1 purifié a montré une activité augmentée du canal en présence de Trisk 95 du côté *trans* (luminal) (Wei et al., 2009). De plus, la récente identification d'un site d'interaction entre les deux protéines dans un environnement proche du pore (Wium et al., 2016) étaye la possibilité que la triadine puisse réguler directement l'activité de RYR1.

d) La junctine

La junctine a une structure proche de la triadine et possède plusieurs sites d'interaction avec RYR1 et la calséquestrine. En particulier, dans sa partie luminale C-terminale, la junctine (C-jun) se lie à la boucle S1-S2 de RYR1 et au pore et segments S1-S2 avec une plus forte affinité. La partie N-terminale (N-jun) quant à elle interagit avec RYR1 du côté cytosolique, entre les résidus 1078 et 2158 du canal (Li et al., 2015). De même que la triadine, l'application de junctine du côté *trans* d'une bicouche lipidique augmente l'activité des RYR1 purifiés (Li et al., 2015; Wei et al., 2009) et l'extinction de l'expression de la junctine dans les myotubes C2C12 altère l'amplitude des transitoires ainsi que les stocks calciques du RS (Wang et al., 2009). Cependant de telles altérations n'ont pas été observées dans les myotubes de souris déficiente en junctine (Boncompagni et al., 2012). Bien que non critique pour le couplage EC, la junctine semble participer à la régulation de RYR1 via son interaction avec la calséquestrine. En effet, l'étude en bicouche lipidique a montré un effet inhibiteur de la calséquestrine sur l'activité de RYR1 régulé par la junctine alors qu'aucun effet sur le complexe RYR1/triadine n'a été observé (Wei et al., 2009). Ainsi la junctine, en facilitant les interactions entre la calséquestrine et RYR1, participerait à conserver les stocks calciques du RS, indépendamment de la triadine.

e) *La calséquestrine*

Deux isoformes de la calséquestrine, codées par les gènes *CASQ1* et *CASQ2*, sont exprimées dans le muscle squelettique. Plus spécifiquement, les fibres musculaires rapides expriment uniquement CSQ1 tandis que les fibres musculaires lentes expriment les deux isoformes. Par ailleurs, seule l'isoforme CSQ2 est présente dans le cœur (Lamboley et al., 2013). Ces deux isoformes sont localisées dans la lumière du RS où elles interagissent avec la triadine et la junctine et constituent par ailleurs le principal tampon calcique du RS (MacLennan et Wong, 1971 ; voir la sous-partie 2.6. *Systèmes tampons et d'extrusion*).

A l'instar de la triadine et de la junctine, l'ablation génétique de CSQ1 chez la souris n'est pas critique à la survie et au couplage EC, mais affecte l'activité de RYR1 (Paolini et al., 2007). Les études en bicouche lipidique révèlent un effet inhibiteur de la calséquestrine sur l'activité des RYR1 purifiés et de plus, la dissociation du complexe en présence d'une forte concentration luminale de Ca^{2+} (> 5 mM) augmente d'un facteur 10 la durée d'ouverture des canaux (Beard et al., 2002). En accord avec ces résultats, une nette augmentation de l'efflux calcique déclenché par dépolarisation a été observée dans les myotubes déficients en CSQ1 (Dainese et al., 2009). Ainsi, CSQ1 jouerait un rôle de senseur calcique luminal et limiterait la déplétion des stocks du RS au cours du couplage EC. Outre sa fonction de tampon calcique, la calséquestrine participe à la régulation de la structure du RS et des mitochondries. En effet, des altérations structurales du RS ont été relevées dans les fibres musculaires de la souris déficiente en CSQ1 (*Casq1-KO*), et se caractérisent par des empilements de domaines jonctionnels, une baisse du volume des citernes terminales ainsi qu'une augmentation du nombre de mitochondries et de l'expression de RYR1 (Protasi et al., 2011).

Chez l'Homme, au moins 15 mutations dans le gène *CASQ2* sont associées à la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC), une pathologie autosomique récessive caractérisée par une arythmie cardiaque et associée à une fuite de Ca^{2+} à travers RYR2 dans les cardiomyocytes (pour revue, voir Faggioni et al., 2012). Dans le muscle squelettique, le phénotype de la SHM, analogue de la TVPC, a été observé chez la souris *Casq1-KO* exposée à l'halothane (Dainese et al., 2009; Paolini et al., 2015). Récemment, une mutation dans le gène *CASQ1* (p.Asp244Gly) a été identifiée et provoque une myopathie vacuolaire associée à la présence d'agrégats de protéines du RS dans les fibres musculaires (Rossi et al., 2014). En particulier, la mutation N244G affecterait la liaison du Ca^{2+} à haute affinité ainsi que la polymérisation de CSQ1, conduisant à une perte de fonction de la protéine (Lewis et al., 2015).

f) La junctophiline de type 1 et de type 2

Les junctophilines (JPs), codées par les gènes *JPH₁*, *JPH₂*, *JPH₃* et *JPH₄*, sont des protéines très conservées localisées au niveau des complexes membranaires jonctionnels. Leur structure fait intervenir une large région cytoplasmique contactant les phospholipides de la membrane plasmique/ du sarcolemme via un motif « MORN » (pour membrane occupation and recognition nexus) et une partie C-terminale s'insérant dans la membrane du réticulum endoplasmique/sarcoplasmique. En particulier, les deux isoformes JP1 et JP2 sont présentes dans le muscle squelettique tandis que seule JP2 est exprimée dans le cœur et le muscle lisse (pour revue, voir Barone et al., 2015). JP1 et JP2 jouent un rôle crucial dans l'assemblage et la stabilisation du complexe membranaire tubule T et RS et possèdent notamment des sites d'interactions avec RYR1 et RYR2 respectivement (Phimister et al., 2007; van Oort et al., 2011) et avec le DHPR (Golini et al., 2011; Jiang et al., 2016; Nakada et al., 2018). Jusqu'alors, les études visant à moduler l'expression de JP1 et/ou de JP2 ont montré des altérations du couplage EC et de l'homéostasie calcique associées à des défauts structuraux du complexe jonctionnel membranaire (Takeshima et al., 2000; Golini et al., 2011; Van Oort et al., 2011). Très récemment, la preuve d'une régulation directe du couplage EC médiée par l'interaction entre JP1 et Ca_v1.1 a été apportée par Nakada et son équipe (2018). Dans cette étude, les auteurs ont notamment surexprimé *in vivo* dans les muscles *FDB* un mutant de JP1 tronqué pour sa partie C-terminale (JP1ΔCT) et donc incapable de s'insérer dans la membrane du RS. De manière très intéressante, les fibres JP1ΔCT présentent une nette réduction de l'interaction entre RYR1 et Ca_v1.1 et de l'amplitude des transitoires calciques ; et ce sans altération de la morphologie du complexe membranaire jonctionnel.

2.6. Systèmes tampons et d'extrusion du Ca²⁺

Au cours du couplage EC, la concentration cytosolique de Ca²⁺ (~ 100 nM au repos) augmente soudainement d'un facteur 100 à 1000 en réponse à l'ouverture des RYRs présents dans la membrane du RS. A long terme, une [Ca²⁺]_i trop élevée peut être délétère pour la cellule, notamment en activant la voie de l'apoptose *via* les calpaïnes. Il existe donc différents systèmes tampons et d'extrusion du Ca²⁺ permettant un retour rapide à la concentration basale et ainsi la relaxation musculaire.

a) *La calséquestrine, tampon calcique du réticulum sarcoplasmique*

La calséquestrine, déjà présentée plus haut pour ses capacités à moduler l'activité de RYR1, est le principal tampon Ca^{2+} du RS, et permet par là-même également de réguler l'activité du couplage EC en fixant le Ca^{2+} luminal. En microscopie électronique, les polymères de calséquestrine apparaissent en forme de rubans ancrés dans la membrane des citernes terminales du RS, à proximité des pieds jonctionnels (Perni et al., 2013). La principale fonction de la calséquestrine est d'augmenter la capacité de stockage du Ca^{2+} dans le RS, en fixant une multitude d'ions Ca^{2+} . Dans des conditions expérimentales mimant les concentrations salines intracellulaires, la calséquestrine présente une grande capacité à fixer le Ca^{2+} , avec une affinité modérée (constante de dissociation ; $K_d = 800 \mu\text{M}$) (Ostwald et MacLennan, 1974). Plus précisément, entre 18 et 50 sites de fixation du Ca^{2+} par monomère ont été estimés (pour revue, voir Beard et al., 2004). Un modèle proposé par Wang et al. (1998) basé sur la structure de la calséquestrine résolue par cristallographie suggère différentes conformations de la protéine selon la concentration luminale de Ca^{2+} :

1. A faible concentration ($10 \mu\text{M}$), les monomères compacts de calséquestrine se dimérisent dans la lumière du RS par leur partie C-terminale (configuration « dos-à-dos »), et forment une poche chargée négativement pouvant lier le Ca^{2+} .
2. Entre $10 \mu\text{M}$ et 1mM de Ca^{2+} luminal, les polymères se forment en se liant par leur partie N-terminale (configuration « face à face »).
3. Entre 1mM et 10mM , les polymères de calséquestrine interagissent avec la triadine et la junctine via leur extrémité C-terminale. La calséquestrine serait donc sous cette forme polymérisée à concentration physiologique ($\sim 1 \text{mM}$ Ca^{2+} luminal).
4. Au-delà de 10mM , les polymères de calséquestrine se dissocient de la triadine et de la junctine.

L'étude de la variation de $[\text{Ca}^{2+}]$ dans les vésicules de RS en réponse à la polylysine, un déclencheur du relargage calcique, indique que le changement de conformation de RYR1 au cours du couplage EC serait transmis à la calséquestrine, provoquant sa dissociation avec le Ca^{2+} . Une très grande quantité de Ca^{2+} libre serait ainsi disponible à proximité du pore de RYR1 et serait libérée massivement dans le cytosol (Ikemoto et al., 1991).

b) *Les tampons calciques du cytoplasme*

Nous nous focaliserons uniquement dans cette partie sur les principaux tampons calciques parfaitement identifiés : la troponine C, la parvalbumine et la calmoduline. Par ailleurs, certaines

études suggèrent l'existence de transferts locaux de Ca^{2+} entre le RS et la mitochondrie, et leur implication dans la régulation des transitoires calciques (Shkryl et Shirokova, 2006; Yi et al., 2011). Cependant, en raison du faible nombre d'investigations et des incertitudes liées à cette question, ces données ne seront pas rapportées ici. En comparaison, il faut noter que le rôle de la mitochondrie dans la régulation de l'homéostasie calcique est beaucoup plus documenté dans le muscle cardiaque (pour revue, voir Eisner et al., 2013).

La troponine C

La troponine C (TnC) est une sous unité de la troponine, et joue un rôle majeur dans la régulation de la contraction musculaire en fixant le Ca^{2+} cytoplasmique. Cette sous unité, en forme d'haltère, se compose de deux domaines globulaires aux extrémités N- et C-terminales, reliés entre eux par une hélice α centrale. En particulier, chaque domaine globulaire présente deux sites de liaison du Ca^{2+} en forme de motifs « main EF ». Les sites I et II, présents sur le domaine globulaire N-terminal, fixent le Ca^{2+} avec une faible affinité ($K_d = 3 \mu\text{M}$), tandis que les sites III et IV du domaine globulaire C-terminal ont une forte affinité pour le Ca^{2+} ($K_d = 0,05 \mu\text{M}$), et lient également le Mg^{2+} de façon compétitive (pour revue, voir Gomes et al., 2002). Lors de l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique déclenchée par une dépolarisation membranaire, la liaison de deux ions Ca^{2+} sur les sites I et II de la TnC induirait un changement de conformation du domaine globulaire N-terminal. Au-delà de son rôle dans la contraction, la troponine C représente un système tampon majeur vis-à-vis du calcium cytosolique.

La parvalbumine

La parvalbumine (PV) est une petite protéine de 12 kDa de structure proche de la calmoduline et de la troponine C. Deux isoformes α et β sont exprimées chez le mammifère, dans le muscle adulte et embryonnaire respectivement (Föhr et al., 1993). La PV possède deux motifs « main EF » permettant la fixation du calcium avec une grande affinité ($K_d = 0,004 \mu\text{M}$). Comme pour les sites calciques de haute affinité de la troponine C, ces motifs fixent également les ions Mg^{2+} ($K_d = 91 \mu\text{M}$). A une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de repos de 100 nM, les sites de fixation sont majoritairement occupés par le Mg^{2+} . Lors du relargage calcique par le RS, le Ca^{2+} remplace le Mg^{2+} sur les motifs « main EF », mais la PV n'entrerait pas en compétition avec les sites de basse affinité de la TnC pour le Ca^{2+} en raison de ses cinétiques lentes de fixation/dissociation (pour revue, voir Berchtold et al., 2000). Plusieurs études ont montré une corrélation directe entre le niveau d'expression de la PV et la vitesse de relaxation avec par ailleurs une expression plus importante dans les fibres de type IIb (Heizmann et al., 1982; Hou et al., 1991). L'implication fonctionnelle de la PV dans la relaxation des fibres musculaires rapides de mammifères a été démontrée dans les fibres musculaires d'un modèle murin déficient en PV. En effet,

l'absence de PV provoque une baisse de la vitesse de relaxation lors d'une stimulation courte (20 ms) ou d'une stimulation téτανique (Raymackers et al., 2000; Schwaller et al., 1999).

La calmoduline

Cette protéine ubiquitaire de 17 kDa est proche structurellement de la TnC et de la PV et possède également 4 motifs « main EF » permettant la fixation du Ca^{2+} . Du fait de son faible niveau d'expression dans le muscle squelettique par rapport à la TnC et à la PV, la calmoduline (CaM) représente un tampon calcique mineur. En revanche, la CaM interagit avec RYR1 et régule l'activité du canal de manière dépendante du Ca^{2+} : à faible concentration, la CaM est libre et se comporte comme un agoniste de RYR1 tandis qu'à fortes concentrations, le complexe Ca^{2+} /CaM inhibe l'activité du canal (pour revue, voir Van Petegem, 2015).

c) Les systèmes d'extrusion du sarcolemme

Le sarcolemme contient deux systèmes d'extrusion du Ca^{2+} : l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) de faible affinité pour le Ca^{2+} mais de haute capacité de transport ; et la pompe Ca^{2+} -ATPase (PMCA) avec les propriétés inverses.

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) utilise le gradient électrochimique du Ca^{2+} et du Na^+ pour permettre l'échange d'un ion Ca^{2+} dans un sens, contre 3 Na^+ dans le sens opposé. En conditions physiologiques, NCX fonctionne dans le sens d'une entrée de Na^+ et d'une extrusion de Ca^{2+} , cependant ce sens peut être inversé transitoirement lors d'une dépolarisation membranaire (Lytton, 2007). Il existe chez le mammifère trois isoformes de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1, NCX2 et NCX3) codées par des gènes distincts. NCX1 est ubiquitaire et majoritairement présent dans le cœur, le cerveau et les reins tandis que NCX2 et NCX3 sont sélectivement exprimés dans le muscle squelettique et le cerveau, respectivement (Brini et Carafoli, 2011). Contrairement au muscle cardiaque, le rôle physiologique de NCX dans la fibre musculaire squelettique a été peu caractérisé et son implication dans l'extrusion du Ca^{2+} au cours d'une contraction simple serait mineure en comparaison de l'activité de recapture de la SERCA. Cependant, une contribution notable de NCX a été reportée dans la fibre musculaire de souris en présence d'une forte $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pouvant être provoquée lors d'une activité musculaire intense (Balnave et Allen, 1998). De plus, l'ablation génétique de NCX3 chez la souris a révélé des altérations de l'homéostasie calcique ainsi qu'une nécrose des fibres musculaires, témoignant de l'importance de cette isoforme dans le muscle squelettique (Sokolow et al., 2004).

		Muscle squelettique				Muscle cardiaque		Muscle lisse	Autres cellules
		Contraction rapide		Contraction lente		Foetal	Adulte		
Gène	Isoforme	Foetal	Adulte	Foetal	Adulte			Foetal	Adulte
SERCA1	SERCA 1a	-	+++++	-	-	-	-	-	-
	SERCA 1b	+++	-	-	-	-	-	-	-
SERCA2	SERCA 2a	+	-	+	+++	+	++++	+	-
	SERCA 2b	+	+	+	+	+	+	+	+
SERCA3	SERCA 3a	-	-	-	-	-	-	-	+
	SERCA 3b	-	-	-	-	-	-	-	+
	SERCA 3c	-	-	-	-	-	-	-	+

Figure 11. Gènes codant pour la SERCA et expression tissulaire des différentes isoformes.

D'après Periasamy et Kalyanasundaram (2007).

La pompe PMCA

La pompe PMCA (pour plasma membrane Ca²⁺ ATPase) permet l'export du Ca²⁺ contre l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Sa structure, proche de la SERCA, fait intervenir 10 segments transmembranaires, 2 grandes boucles cytosoliques ainsi qu'une queue C-terminale comprenant un site de régulation par la CaM. La liaison de la CaM à la pompe PMCA augmente son affinité pour le Ca²⁺. Chez l'Homme, quatre gènes codent pour les différentes isoformes PMCA1-4. En particulier, PMCA1 est l'isoforme majoritaire du muscle squelettique, PMCA3 n'étant exprimée que transitoirement durant la période embryonnaire. Au repos, la PMCA joue un rôle dans le maintien de la [Ca²⁺]_i, cependant ses sites de haute affinité pour le Ca²⁺ sont rapidement saturés au cours d'un exercice intense (pour revue, voir Cali et al., 2017).

d) La recapture du Ca²⁺ dans le RS

La recapture du Ca²⁺ dans le RS constitue la dernière étape du couplage EC, et joue un rôle crucial dans la relaxation musculaire. Spécifiquement, ce mécanisme fait intervenir une pompe Ca²⁺-ATPase de 110 kDa présente dans la membrane du RS jonctionnel, la SERCA (pour sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase). La SERCA est codée par trois gènes différents *SERCA1*, *SERCA2* et *SERCA3* mais on dénombre une dizaine d'isoformes, résultant principalement d'un épissage alternatif au niveau de la terminaison carboxyle des transcrits. Les isoformes de SERCA sont différenciellement exprimées en fonction du tissu et du stade de développement. Ainsi, SERCA1a et SERCA2a sont les isoformes prédominantes dans les muscles squelettiques adultes à contraction rapide et lente, respectivement (Figure 11) (Periasamy et Kalyanasundaram, 2007). La SERCA a une structure proche de la PMCA avec 10 segments transmembranaires (M1-M10) ainsi que deux boucles cytoplasmiques comportant les domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP. La SERCA utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter le Ca²⁺ dans la lumière du RS, avec une stœchiométrie d'une molécule d'ATP pour deux ions Ca²⁺. En particulier, la vitesse de relaxation de la fibre musculaire est conditionnée par la vitesse de repompage du Ca²⁺ par la SERCA, estimée plus grande d'un facteur 2,5 dans les fibres rapides que dans les fibres lentes (Salviati et al., 1984). L'activité de la SERCA peut être inhibée par deux agents pharmacologiques classiquement utilisés en laboratoire : l'acide cyclopiazonique (CPA) et la thapsigargine (Tadini-Buoninsegni et al., 2018).

2.7. Voie d'influx calcique activée par la déplétion des stocks intracellulaires (SOCE)

En dépit du contrôle très précis de l'homéostasie calcique exercé par les différents tampons calciques intracellulaires et de l'efficacité de repompage de la SERCA, il a été suggéré qu'un exercice prolongé puisse amoindrir les stocks calciques du RS et ainsi compromettre la contraction musculaire. En 2004, les travaux des chercheurs Kurebayashi et Ogawa ont mis en évidence l'existence d'une voie d'entrée capacitive de Ca^{2+} dans le muscle squelettique, activée par la déplétion des stocks calciques du RS, et nommée SOCE (pour store-operated Ca²⁺ entry). Depuis, plusieurs études ont conduit à l'identification de deux partenaires protéiques, STIM1 (Stromal Interaction Molecule) (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005) et ORAI1 (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006), impliqués dans cette voie. STIM1 est présent dans la membrane du RS et joue un rôle de senseur calcique. Plus précisément, il a été suggéré qu'une diminution des stocks calciques du RS provoquait l'oligomérisation de STIM1 et une interaction subséquente avec ORAI1, un canal calcique présent dans la membrane du sarcolemme (Prakriya et Lewis, 2015). Cependant l'existence physiologique d'une déplétion aussi conséquente que celle provoquée en conditions expérimentales reste controversée. En effet, une étude menée en conditions de potentiel imposé sur la fibre musculaire isolée de souris n'a montré aucune variation de la conductance membranaire en réponse à des stimulations répétées provoquant une déplétion partielle du RS, ni même à une déplétion totale induite par le CPA (Allard et al., 2006).

Gène	Protéine	Locus	transmission
<i>MTM1</i>	Myotubularine	Xq28	XL
<i>DNM2</i>	Dynamine 2	19p13.2	AD
<i>RYR1</i>	Récepteur de la ryanodine de type 1	19q13.2	AR
<i>TTN</i>	Titine	TTN	AR
<i>BIN1</i>	Amphiphysine 2	2q14.3	principalement AR
<i>CCDC78</i>	Coiled-coil domain-containing protein 78	16p13.3	AR
<i>SPEG</i>	Striated muscle preferentially expressed protein kinase	2q25	AR

Figure 12. Gènes associés à la myopathie centronucléaire.

Selon le gène muté, la transmission des mutations peut être liée à l’X (XL), autosomique dominante (AD) ou autosomique récessive (AR).

D’après Sewry et Wallgren-Pettersson, 2017.

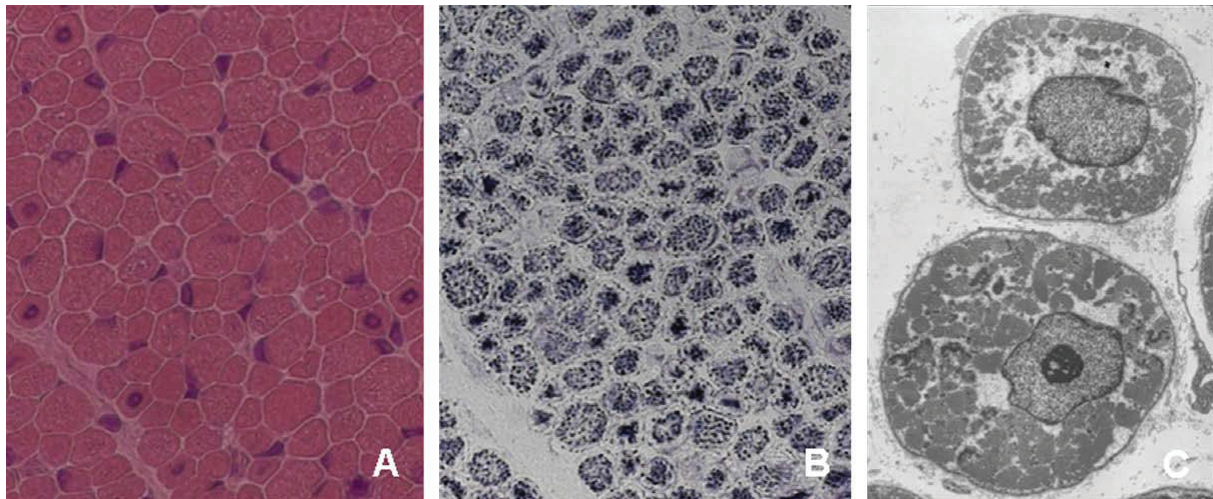
Chapitre 2. La myopathie centronucléaire

La myopathie centronucléaire (CNM) est le terme général désignant un groupe de maladies congénitales caractérisées par une faiblesse musculaire plus ou moins sévère associée à une localisation anormale des noyaux en position centrale dans les fibres musculaires de patients. On distingue trois classes de CNM : la CNM autosomique dominante (AD-CNM), la CNM autosomique récessive (AR-CNM) et la CNM récessive liée à l’X (XL-CNM), également appelée myopathie myotubulaire (Figure 12).

I. La myopathie centronucléaire liée à l’X

a) *Les symptômes cliniques et histologiques*

La myopathie myotubulaire (MIM 310400) est due à des mutations dans le gène codant pour la myotubularine (MTM1), situé sur le chromosome X en position q28 (Laporte et al., 1996; Buj-Bello et al., 1999) (Figure 12). Il s’agit de la forme la plus sévère de CNM, affectant 1 garçon sur 50 000, et dont les premiers symptômes se déclarent durant la période périnatale avec un hydramnios (excès de liquide dans la cavité amniotique) et une réduction des mouvements actifs fœtaux. A la naissance, les nouveaux nés présentent une hypotonie, une faiblesse musculaire très sévère ainsi qu’une détresse respiratoire, nécessitant habituellement le recours à une ventilation mécanique (Jungbluth et al., 2018). Il a été décrit dans de nombreuses études que plus de 50 % des enfants atteints ont une espérance de vie inférieure à 1 an, en raison essentiellement de complications respiratoires (van Wijngaarden et al., 1969; Buj-Bello et al., 1999; Herman et al., 1999). Une récente étude menée en Amérique du Nord sur une cohorte de 50 patients indique cependant un taux de mortalité plus faible, avec 12 cas de décès survenant en moyenne à l’âge de 6 ans (Amburgey et al., 2017). Les auteurs ont toutefois soulevé comme limite à leur étude la sous-estimation des cas de mortalité néonatale liée à l’absence de consentement de certains parents à participer à l’étude. Dans cette étude, les auteurs font état de la dépendance de plus de 80 % des patients à une assistance respiratoire, motrice, ou encore nutritionnelle, témoignant de la sévérité de la myopathie myotubulaire. Un ptôsis associé à une ophtalmoplégie externe (paralysie d’un muscle moteur de l’œil) ainsi qu’une macrosomie sont des signes cliniques classiques des formes sévères de myopathie myotubulaire (Herman et al., 1999). Plus de 200 mutations distribuées de manière uniforme dans le gène *MTM1* ont été reportées et causent pour la plupart une forme tronquée et une perte de



D



Figure 13. Caractéristiques histologiques de la myopathie centronucléaire liée à l’X (XL-CNM) et représentation des domaines de MTM1.

A et B/ Coupes transversales de muscle de patient atteint d’une forme néonatale de la XL-CNM, montrant de nombreuses fibres avec des noyaux centraux, semblables à des myotubes (A, coloration à l’hématoxyline et à l’éosine). La région centrale des fibres apparaît sombre en coloration oxydative, et est surmontée en périphérie d’une auréole pâle (B, coloration NADH-TR). D’après Romero, 2010.

C/ Cliché de microscopie électronique d’une section transversale montrant deux fibres avec des noyaux centraux, entourés d’agrégats de mitochondries et de glycogène et d’une région dépourvue de myofibrilles. D’après Romero, 2010.

D/ Représentation des différents domaines de MTM1 de mammifère. De l’extrémité N-terminale à C-terminale, MTM1 se compose d’un domaine PH-GRAM de liaison aux PtdInsPs, d’un domaine PTP (ou phosphatase) actif, d’un domaine coiled-coil impliqué dans l’interaction avec d’autres protéines et d’un domaine PDZ. D’après Beggs et al., 2010.

fonction de la protéine, conduisant à un phénotype sévère (Laporte et al., 2000). Les mutations faux-sens en revanche sont associées à des formes plus modérées de la maladie (McEntagart et al., 2002; Biancalana et al., 2003).

D'un point de vue histologique, un marquage à la myosine ATPase révèle une prédominance de fibres de type I. Les fibres musculaires de patients arborent un aspect plus rond et une ressemblance avec les myotubes fœtaux en raison de la présence de noyaux strictement centralisés. En coloration à la succinate déshydrogénase (SDH) et à la nicotinamide adénine dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR), une région centrale à forte activité enzymatique oxydative est observée, et est surmontée en périphérie d'une auréole pâle (Figure 13). En microscopie électronique, la région centrale apparaît dépourvue de myofibrilles et présente des agrégats de mitochondries et de glycogène. Enfin, des accumulations de DHPR α 1S, de RYR1 et de desmine dans la région centrale des fibres ont été mises en évidence par la technique d'immunohistochimie (IHC) (Laporte et al., 2001; Romero et Bitoun, 2011). De manière intéressante, des altérations atypiques ont été identifiées dans 4 à 20 % des fibres musculaires de patients atteints d'une forme modérée de XL-CNM, dites en forme de « collier » en raison de l'accumulation sous-sarcolemmale de myofibrilles, mitochondries, de RS et de granules de glycogène (Bevilacqua et al., 2009).

b) La myotubularine (MTM1)

La myotubularine (MTM1) appartient à une famille de phosphatases de type « myotubularines reliées à une myopathie » (MTMR : MyoTubularin and Myopathy Related), impliquées dans le métabolisme des PtdInsPs et par ailleurs très conservées chez les eucaryotes. Chez l'Homme, 14 membres ont été identifiés (Figure 14), parmi lesquels les myotubularines 3-phosphatases MTM1, MTMR1, 2, 3, 4, 6, 7 et 8 déphosphorylent le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P₂, deux espèces présentes dans les endosomes précoces et tardifs et impliquées dans l'endocytose et le trafic membranaire (Gillooly et al., 2000). En revanche les autres membres MTMR5, 9, 10, 11, 12, 13 n'ont pas d'activité enzymatique mais régulent indirectement le métabolisme des PtdInsPs en s'hétérodimérisant avec leurs homologues actifs (pour plus de détails, voir le *Chapitre 3. Phosphoinositides*). Un 14^{ème} membre MTMR14 (également appelé JUMPY) a été identifié et possède une activité PtdInsP 3-phosphatase avec la même spécificité de substrats que MTM1 (Tosch et al., 2006). Cependant cette protéine présente une structure et une phylogénie éloignées des autres membres et pour cette raison n'appartient pas à la famille des MTMRs. De manière intéressante, des mutations dans le gène *MTMR14* ont été identifiées chez deux patients atteints de CNM (Tosch et al., 2006). La fonction physiologique de MTMR14 et son implication pathologique dans la CNM ont été étudiées grâce à des

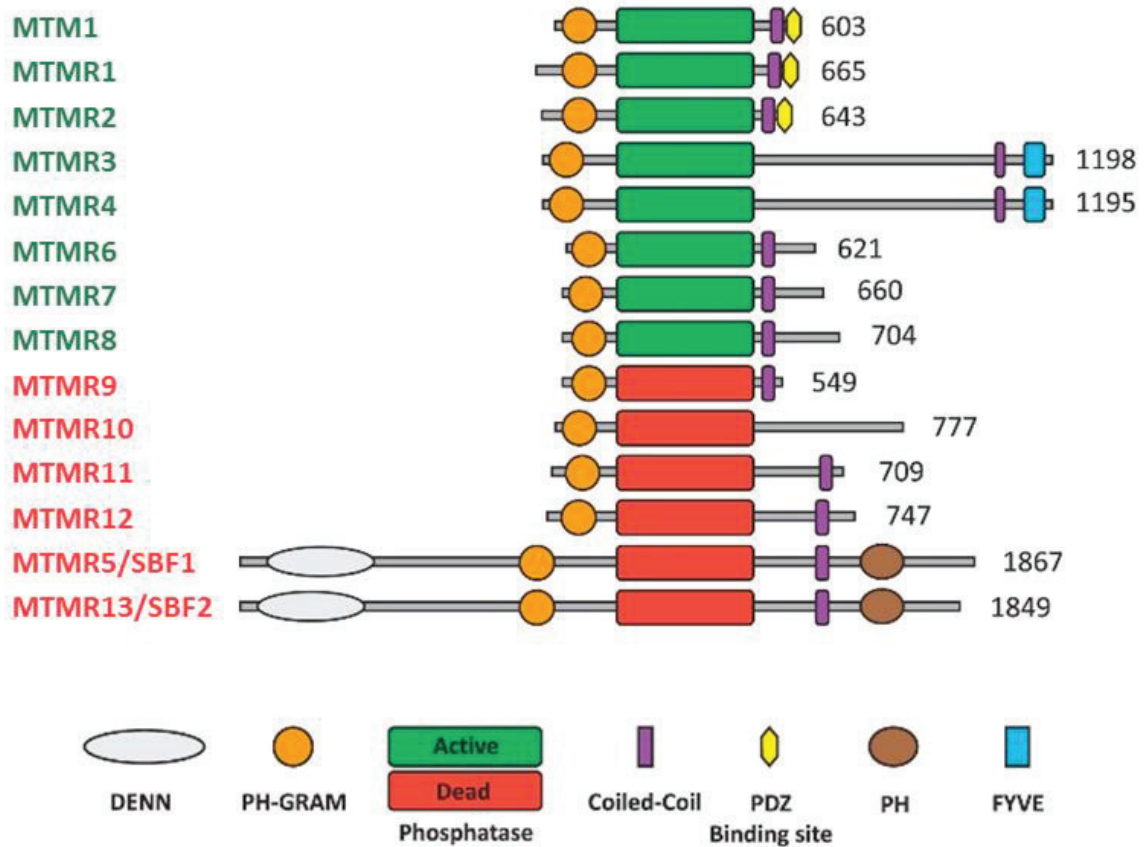


Figure 14. La famille des myotubularines.

Représentation des 14 membres de la famille des myotubularines, possédant tous un domaine PH-GRAM et un domaine catalytique « PTP » actif ou inactif. La présence d'un domaine DENN, CC (coiled-coiled), PDZ, PH et FYVE est variable d'un membre à l'autre. Pour chaque membre, la taille (en acides aminés) de l'isoforme le plus caractérisé dans la littérature est indiquée à droite.

D'après Raess et al., 2017a.

modèles animaux déficients pour la phosphatase. Ces résultats sont présentés dans le *Chapitre 3 : Phosphoinositides*.

La structure de MTM1 fait intervenir un domaine de liaison aux PtdInsPs appelé PH-GRAM (pour Pleckstrin Homology - Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activator and Mytotubularins), un domaine PTP contenant le motif catalytique actif C(X)₅R, un domaine « coiled-coil » (CC) impliqué dans l'homo/hétérodimérisation avec MTMR10 ou MTMR12 et enfin un domaine PDZ permettant les interactions protéine-protéine (Figure 13) (pour revue, voir Raess et al., 2017a) .

La fonction cellulaire de MTM1 dans la régulation du métabolisme des phosphoinositides a été très étudiée dans des modèles d'expression hétérologue ou encore chez la levure, qui n'exprime qu'un seul homologue de la famille des MTMRs, Ymr1p (Laporte et al., 1998). Ainsi le PtdIns(3)P a été la première espèce identifiée en tant que substrat physiologique de MTM1 *in vitro* et *in vivo* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et dans les cellules embryonnaires humaines du rein 293 (HEK293) (Blondeau et al., 2000; Taylor et al., 2000; Parrish et al., 2004). L'expression hétérologue de MTM1 dans les cellules COS-1 et HeLa indique une localisation subcellulaire cytoplasmique et au niveau de projections membranaires, et s'accompagne d'une réduction du marquage du PtdIns(3)P endosomal (Blondeau et al., 2000; Kim et al., 2002). De plus, l'expression d'une forme phosphatase inactive de MTM1 dans une lignée cellulaire C2C12 induit une augmentation des taux intracellulaires de PtdIns(3)P (Chaussade et al., 2003). Cependant, aucune altération de la localisation du PtdIns(3)P endosomal n'a été observée dans les myoblastes de patients XL-CNM (Tronchère et al., 2004). Les auteurs de cette étude ont par ailleurs identifié un autre substrat physiologique de MTM1, le PtdIns(3,5)P₂. De manière intéressante, une étude *in vitro* a montré que parmi les différentes espèces de PtdInsPs, le PtdIns(3,5)P₂ possède la plus grande affinité de liaison avec le domaine GRAM de MTM1, et suggère un rôle physiologique de MTM1 dans le trafic endosomal et dans la morphologie des vacuoles, médié par la régulation des taux de PtdIns(3,5)P₂ (Tsujiita et al., 2004).

c) Etude des mécanismes physiopathologiques de la XL-CNM

Malgré son expression ubiquitaire (Laporte et al., 1998), l'absence de MTM1 affecte principalement la fonction musculaire squelettique chez les patients XL-CNM. Ceci suggère que MTM1 joue un rôle spécifique dans le muscle squelettique et qu'aucun autre membre de la famille des MTMRs ne peut compenser son absence. La souris déficiente en myotubularine (*Mtm1 knock-out*, KO) générée en 2002 par A. Buj-Bello et son équipe reproduit les symptômes cliniques et histopathologiques de la maladie humaine et constitue ainsi un modèle de référence pour l'étude de la fonction primaire de MTM1 et des mécanismes à l'origine de la XL-CNM. En effet chez la souris,

l'absence constitutive de MTM1 se caractérise par une faiblesse musculaire évidente dès 3-4 semaines après la naissance et qui progresse ensuite rapidement pour conduire à la mort des mutants, lesquels survivent rarement au-delà de 7 semaines (Buj-Bello et al., 2002). L'absence de MTM1 se caractérise par la présence de noyaux centraux dont la proportion augmente avec la progression de la maladie, et d'une hypotrophie des fibres, plus prononcée dans les fibres de type I. Ce modèle a notamment permis d'identifier un défaut du maintien de la structure musculaire, remettant en cause l'hypothèse de l'époque selon laquelle l'aspect des fibres, semblable à des myotubes fœtaux, était dû à une altération de la myogenèse. En accord avec un rôle critique dans la maintenance de la fibre musculaire, l'ablation génétique conditionnelle de *Mtm1* dans le muscle squelettique de souris adulte (mKO) provoque le phénotype associé à la myopathie myotubulaire (Joubert et al., 2013). De plus, l'ablation générale et tissu-spécifique de *Mtm1* a confirmé que le muscle squelettique est le principal tissu affecté dans la XL-CNM (Buj-Bello et al., 2002). Un modèle de la maladie a été généré chez le poisson zèbre par la technologie des oligonucléotides morpholinos (MO) et conduit à une réduction de la synthèse de *Mtm1*, associée chez l'embryon à une altération sévère de la fonction motrice, à une atrophie des fibres musculaires et à la présence de grands noyaux anormalement positionnés (Dowling et al., 2009). Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les formes modérées de la XL-CNM, une souris *knock-in* (KI) portant la mutation ponctuelle c.205C>T dans le gène *Mtm1* a été conçue par Pierson et son équipe (2012). Cette mutation est suspectée provoquer le remplacement d'une arginine par une cystéine (p.R69C) dans le domaine PH-GRAM de MTM1 et ainsi conduire à une plus faible affinité de liaison avec le $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$. A l'instar de la souris *Mtm1* KO, l'examen histologique révèle de nombreuses fibres hypotrophiques avec des noyaux centraux. Cependant, contrairement à la sévérité du phénotype lié à l'absence de MTM1, la souris *Mtm1* p.R69C développe une faiblesse musculaire relativement stable et modérée à partir deux mois et présente une médiane de survie de 66 semaines, mimant le phénotype des cas les moins sévères de la XL-CNM (Pierson et al., 2012). Il faut noter que ces différents modèles murins et de poisson zèbre ont en commun des taux élevés de $\text{PtdIns}(3)\text{P}$, confirmant la fonction de phosphoinositide 3-phosphatase de MTM1 chez le vertébré (Dowling et al., 2009; Pierson et al., 2012; Amoasii et al., 2012).

D'après les marquages immuno-histochimiques réalisés dans les fibres musculaires de souris et de poisson zèbre, MTM1 apparaît localisée à la triade, au niveau des tubules T (Buj-Bello et al., 2008; Dowling et al., 2009). Cependant une localisation de MTM1 au niveau des citernes terminales du RS a également été reportée avec la méthode d'immuno-microscopie électronique à l'or colloïdal (Amoasii et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont notamment proposé un modèle selon lequel MTM1 contrôlerait la courbure de la membrane du RS en modulant le taux de $\text{PtdIns}(3)\text{P}$.

De manière intéressante, des altérations structurales ont été décrites chez la souris *Mtm1* KO ainsi que chez le modèle de poisson zèbre *Mtm1* MO. Celles-ci se caractérisent par une dilatation du RS et des tubules T, une orientation longitudinale des tubules plus importante et enfin une désorganisation ainsi qu'une réduction du nombre de triades (Al-Qusairi et al., 2009; Dowling et al., 2009). Ces altérations structurales s'accompagnent d'une variation de l'expression des protéines associées à la triade, et en particulier de RYR1 et de la sous-unité $\alpha 1S$ du DHPR qui sont diminuées respectivement de 66 % et de 30 %, tandis que l'expression de la sous-unité $\beta 1$ du DHPR est augmentée d'un facteur 5 chez la souris *Mtm1* KO âgée de 5 semaines (Al-Qusairi et al., 2009). Les auteurs de cette étude ont également mesuré, en conditions de potentiel imposé, le courant calcique (ICa) à travers le DHPR ainsi que les variations transitoires de Ca^{2+} intracellulaire dues à l'activation de RYR1 et ont montré que l'amplitude de ces deux paramètres était fortement réduite dans les fibres musculaires déficientes en MTM1. L'ensemble de ces observations indique que MTM1 est impliquée dans l'organisation des tubules T et de la triade dans le muscle squelettique, et qu'en son absence le défaut du couplage EC semble jouer un rôle majeur dans la faiblesse musculaire associée à la XL-CNM. Dans ce contexte, une partie de mon projet de thèse visait à caractériser les propriétés complètes de l'homéostasie calcique et du couplage EC dans les fibres musculaires de souris *Mtm1* KO, et à évaluer l'implication possible du métabolisme des PtdInsPs dans les mécanismes physiopathologiques de la XL-CNM. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication et sont présentés dans la section 1 de la partie *Résultats* (Kutchukian et al., 2016).

Cependant, la myotubularine pourrait assurer des fonctions supplémentaires dans le muscle squelettique, contribuant à d'autres mécanismes physiopathologiques. En effet, une altération de la transmission au niveau de la JNM a été reportée chez quatre patients atteints de CNM dont un porte une mutation dans le gène *MTM1* (Robb et al., 2011). De plus, deux études menées chez l'embryon de poisson zèbre *Mtm1* MO ainsi que chez les modèles murins *Mtm1* KO et *Mtm1* p.R69C montrent un défaut de transmission associé à des altérations structurales de la JNM (Robb et al., 2011; Dowling et al., 2012), probablement causées par un défaut du trafic endosomal des récepteurs à l'Ach (Dowling et al., 2012). Ces travaux révèlent également l'efficacité de traitements à l'édrophonium et à la pyridostigmine, deux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, sur la fonction motrice des embryons de poisson zèbre et de la souris *Mtm1* p.R69C.

En 2008, l'injection intramusculaire d'un vecteur viral adéno-associé (AAV) exprimant le gène *Mtm1* chez la souris *Mtm1* KO corrige le phénotype de la myopathie myotubulaire, incluant le positionnement des noyaux et des mitochondries ainsi que la fonction musculaire (Buj-Bello et al., 2008). De manière intéressante, la réexpression d'une myotubularine mutante inactive chez la souris *Mtm1* KO corrige également ces défauts, suggérant l'existence d'un autre mécanisme, indépendant

de l'activité phosphatase de MTM1, dans le phénotype pathologique de la XL-CNM (Amoasii et al., 2012).

L'implication de MTM1 dans la physiologie musculaire squelettique a notamment été explorée à travers l'identification de ses partenaires moléculaires. En particulier, une approche de double hybride a mis en évidence une interaction directe entre MTM1 et la desmine, la protéine des filaments intermédiaires (FI) dans les muscles striés et lisses (Hnia et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs ont montré l'implication du complexe MTM1-desmine dans la régulation de la dynamique et de la fonction mitochondriale du muscle squelettique. De manière intéressante, des analyses immunocytochimiques ont révélé une altération du réseau de desmine sur des biopsies de patients (Romero et Bitoun, 2011). De plus, la présence anormale de mitochondries dans la région périnucléaire a été observée dans les fibres de poisson zèbre *Mtm1* MO ainsi que sur des biopsies de patients et confirme un lien entre MTM1 et l'homéostasie mitochondriale (Dowling et al., 2009; Romero et Bitoun, 2011).

II. La myopathie centronucléaire autosomique dominante

a) *Les symptômes cliniques et histologiques*

La myopathie centronucléaire autosomique dominante (AD-CNM) est une myopathie congénitale causée par des mutations dans le gène *DNM2* (Figure 12), codant pour la dynamine 2, une GTPase impliquée dans l'endocytose et le trafic membranaire (Bitoun et al., 2005). Classiquement, l'AD-CNM associée à *DNM2* cause une faiblesse musculaire de sévérité variable et une atteinte oculaire se caractérisant par un ptosis et une ophtalmoparésie. La faiblesse musculaire se manifeste tardivement, souvent entre la fin de l'enfance et l'adolescence, et montre une évolution lente et progressive. Les fonctions cardiaque et respiratoire ne semblent en revanche pas affectées (Bitoun et al., 2005; Fischer et al., 2006; Jeub et al., 2008; Jungbluth et al., 2018). Quelques cas sévères avec des manifestations néonatales ont également été reportés et présentent des symptômes incluant une atteinte distale, une contracture des tendons d'Achille, des myalgies et/ou une fatigue à l'effort ainsi qu'une cataracte (Bitoun et al., 2007; Jungbluth et al., 2007; Romero et Bitoun, 2011). Les biopsies de patients atteints de l'AD-CNM montrent une hétérogénéité de la taille des fibres, une hypotrophie des fibres de type I, des noyaux centraux ainsi que la présence très caractéristique d'éléments sarcoplasmiques rayonnant à partir du centre de la fibre (Figure 15 A-C) (Romero, 2010). En microscopie électronique, on observe classiquement une diminution progressive du diamètre des myofibrilles de la périphérie vers le centre de la fibre. De plus, la présence de mitochondries, de

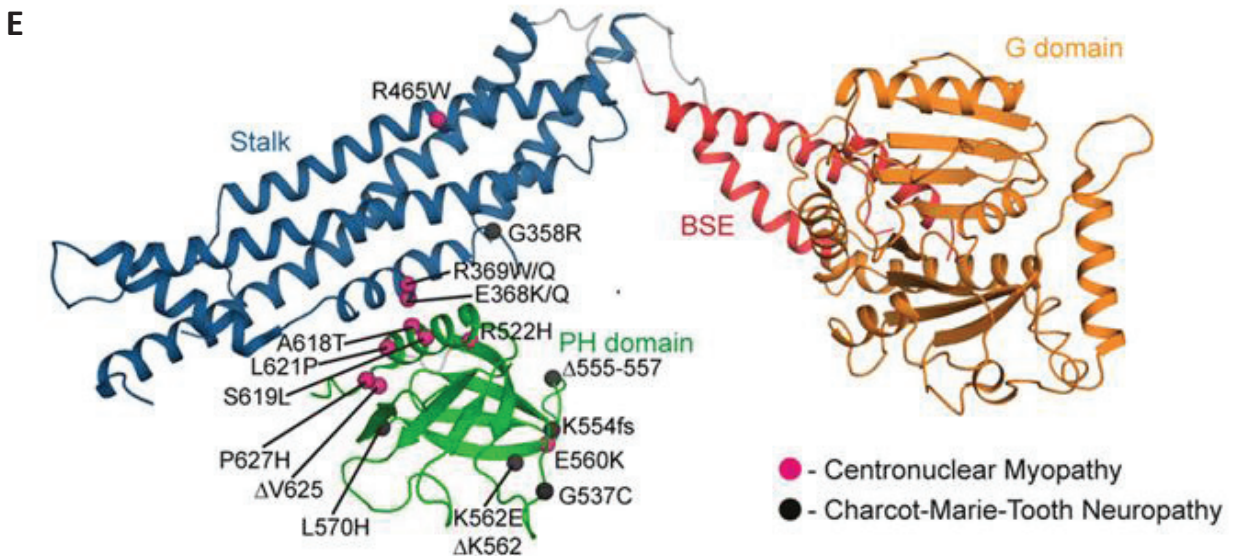
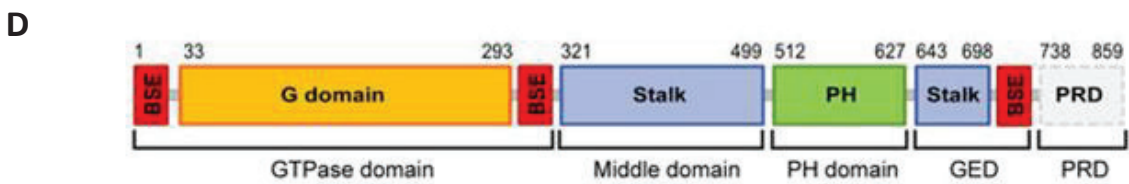
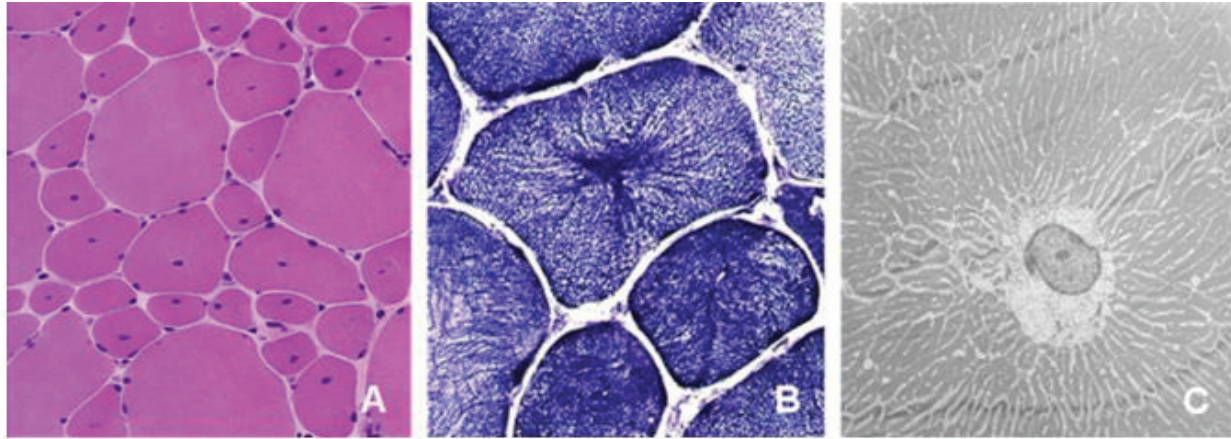


Figure 15. Histologie de la myopathie centronucléaire autosomique dominante (AD-CNM) et représentation des domaines et des mutations pathologiques de DNM2.

A, B et C/ Coupes transversales musculaires montrant des fibres atrophiées avec des noyaux centraux (A, coloration à l'hématoxyline et à l'éosine) et la présence très caractéristique d'éléments sarcoplasmiques rayonnant à partir du centre de la fibre (B, coloration NADH-TR). (C) Cliché de microscopie électronique montrant une fibre musculaire avec un noyau central autour duquel rayonnent des éléments sarcoplasmiques. D'après Romero, 2010.

D et E/ Représentation des différents domaines (D) et de la structure tridimensionnelle d'un monomère de dynamine (E). Les mutations associées à la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth et à l'AD-CNM sont représentées par les points noirs et roses, respectivement. D'après Reubold et al., 2015.

réticulum endoplasmique rugueux, de Golgi ainsi que de particules de glycogènes a été identifiée dans les espaces internucléaires. Enfin, les analyses immuno-histochimiques révèlent un marquage cytosolique diffus de la sous unité $\alpha 1S$ du DHPR et de RYR1. De même, la desmine apparait diffuse dans le cytosol et s'accumule au centre des fibres (Romero et Bitoun, 2011).

Récemment, des mutations dans le gène *BIN1* ont été associées à l'AD-CNM (Böhm et al., 2014). Chez ces patients, la faiblesse musculaire s'est déclarée à l'âge adulte et touche les muscles proximaux et distaux. En revanche, ces patients ne présentent pas de faiblesse faciale ni d'atteinte oculaire et respiratoire. L'analyse fonctionnelle de ces mutations a révélé une forte altération de la fonction de BIN1 dans la courbure membranaire (Böhm et al., 2014).

b) La dynamine (DNM2)

La dynamine est une GTPase de 98 kDa, impliquée dans la formation de vésicules et dans la fission membranaire lors de l'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine. Il existe chez le mammifère 3 isoformes de dynamine codées par les gènes *DNM1*, *DNM2* et *DNM3*. Plus précisément, la dynamine 2 (DNM2), issue du gène *DNM2* présent sur le locus 19p13.2, a une expression ubiquitaire tandis que DNM1 est retrouvée dans le cerveau et DNM3 dans le cerveau, les testicules et les poumons (Cao et al., 1998). La structure de DNM2 fait intervenir un domaine G responsable de l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) à son extrémité N-terminale, connecté au reste de la protéine via une région flexible appelée « neck » ou « BSE » (Bundle Signaling Element) (Figure 15D). Dans la partie centrale, la région « Stalk » est impliquée dans l'auto-assemblage de DNM2 et comprend un domaine intermédiaire « middle » et un domaine « GED » (GTPase Effector Domain). On retrouve également un domaine « pleckstrin homology » (PH) qui interagit avec le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane plasmique, et enfin un domaine « PRD » (Prolin Rich Domain) (Reubold et al., 2015). Ce dernier permet notamment la liaison et le recrutement d'autres protéines telles que l'amphiphysine 2 (BIN1) (Grabs et al., 1997). Les mutations responsables de l'AD-CNM sont localisées dans les domaines Stalk middle et Stalk GED ainsi que dans le domaine PH (Figure 15E). En particulier, les mutations dans la région codant pour ce dernier sont principalement associées aux formes sévères néonatales de l'AD-CNM (Böhm et al., 2012). Par ailleurs, d'autres mutations dans le domaine PH de DNM2 ont été associées à la neuropathie axonale périphérique Charcot-Marie-Tooth (Züchner et al., 2005; Fabrizi et al., 2007).

Initialement, la dynamine a été identifiée chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) comme étant la protéine déficiente chez les mutants *shibire* (Kosaka et Ikeda, 1983; Van der Blik et Meyerowitz, 1991). A température restrictive, ces mutants deviennent paralysés en raison de l'arrêt

du recyclage des vésicules synaptiques par endocytose, bloquant ainsi la libération de neurotransmetteurs. Chez les mutants *shibire*, l'observation des terminaisons présynaptiques en microscopie électronique révèle une accumulation de pseudo-vésicules à la membrane, dont le « cou » est recouvert d'un matériel dense formant une hélice cylindrique (Kosaka et Ikeda, 1983; Koenig et Ikeda, 1989). Plus tard, ces structures ont été identifiées par immunomarquage comme étant composées d'oligomères de dynamine (Takei et al., 1995). On sait aujourd'hui que la dynamine s'auto-assemble en polymères en forme d'hélices pour exercer une activité de tubulation membranaire (Sweitzer et Hinshaw, 1998; Takei et al., 1999), et que cette dernière est facilitée *in vitro* en présence de microtubules ou encore de vésicules lipidiques contenant du PtdIns(4,5) P_2 (Lin et al., 1997; Warnock et al., 1997). De plus, l'incubation de vésicules synaptiques avec du GTP γ S, un analogue non hydrolysable du GTP, favorise l'élongation des pseudo-vésicules en tubules (Takei et al., 1995), tandis que l'hydrolyse du GTP provoque la constriction des polymères et la fission membranaire (Sweitzer et Hinshaw, 1998). Par ailleurs, une régulation positive de l'activité GTPase a été montrée lorsque la dynamine est sous forme polymérisée ou encore associée aux lipides (Warnock et al., 1996; Smirnova et al., 1999). Des études de cryo-microscopie électronique ont révélé une disposition antiparallèle des dimères de dynamine, dont l'interaction est médiée par les domaines Stalks, et avec une orientation respective des domaines GTPase et PH vers l'extérieur de l'hélice et vers la membrane (Zhang et Hinshaw, 2001). De récentes données structurales et de simulations de dynamiques moléculaires indiquent qu'en l'absence de nucleotides, la dynamine adopte une conformation « fermée » auto-inhibitrice médiée par des interactions entre le domaine PH et les domaines Stalk et GTPase (Faelber et al., 2011; Reubold et al., 2015). Ainsi il a été postulé que le domaine PH joue un rôle répresseur de l'activité GTPase, et que la liaison du domaine PH à la membrane lèverait cette inhibition, permettant la polymérisation de la dynamine et activant l'hydrolyse du GTP. Contrairement à la dynamine sauvage, la dynamine mutante déléetée de son domaine PRD conserve une activité de constriction membranaire en présence de GTP γ S (Zhang et Hinshaw, 2001), suggérant un rôle auto-inhibiteur du domaine PRD sur l'activité GTPase. De manière intéressante, le domaine PRD interagit avec BIN1, et il a été suggéré que la liaison de ces deux partenaires *in vivo* induise un changement de conformation de la dynamine et lève l'auto-inhibition exercée par le PRD.

c) Etudes des mécanismes physiopathologiques de l'AD-CNM

Les propriétés biochimiques et fonctionnelles de DNM2 étudiées *in vitro* et dans des lignées cellulaires ont révélé un rôle majeur de cet isoforme dans les mécanismes d'endocytose médiée ou

non par la clathrine (Warnock et al., 1997; Henley et al., 1998). Une localisation de DNM2 au niveau du réseau trans-Golgien a été observée (Maier et al., 1996) et de plus, l'injection d'anticorps anti-DNM2 ou la surexpression de mutants DNM2 altèrent la formation de vésicules dans ce compartiment (Jones et al., 1998; Kreitzer et al., 2000). Ces données suggèrent l'implication de DNM2 dans le trafic membranaire intracellulaire. L'ablation génétique conditionnelle de *Dnm2* dans une lignée de fibroblastes provoque une réduction drastique de l'internalisation de la transferrine ainsi qu'une accumulation de clusters de pseudo-vésicules coiffées de clathrine à la membrane, confirmant l'implication majeure de DNM2 dans l'endocytose médiée par la clathrine (Liu et al., 2008).

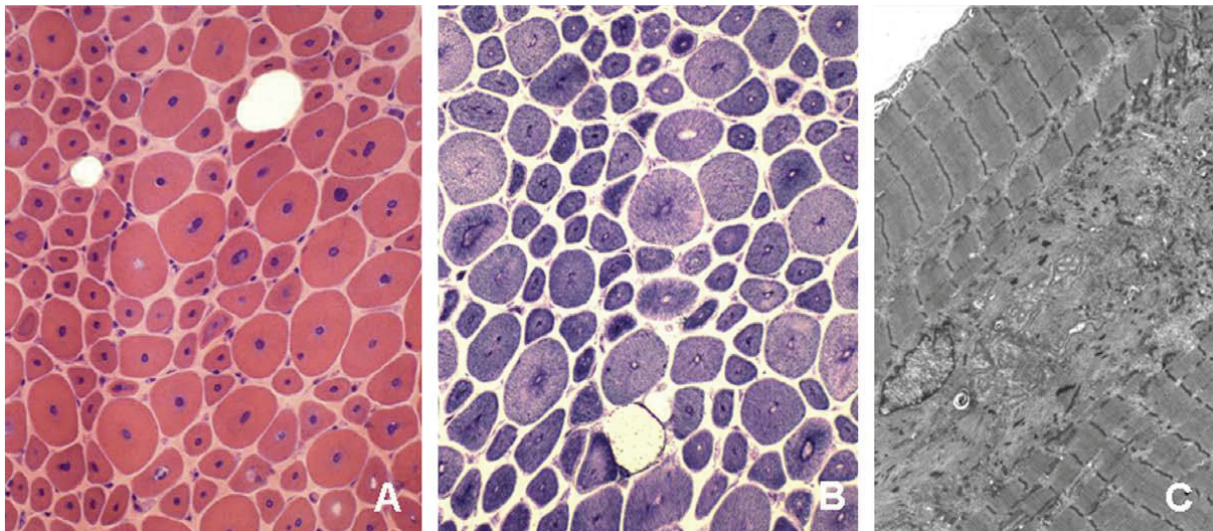
Malgré l'expression ubiquitaire de DNM2, le muscle squelettique est le principal tissu affecté par les mutations de DNM2 associées à l'AD-CNM. Ceci suggère que DNM2 exerce au moins une fonction spécifique dans le muscle squelettique, indépendante ou non de son activité ubiquitaire dans la fission membranaire. La majorité des mutations associées à l'AD-CNM sont des mutations faux-sens localisées dans le domaine Stalk (middle et GED) ainsi que le domaine PH. Certaines d'entre elles ont été caractérisées *in vitro* et ont montré une augmentation de l'activité GTPase ainsi qu'une plus grande stabilité des polymères de DNM2 (Kenniston et Lemmon, 2010; Wang et al., 2010; James et al., 2014; Chin et al., 2015). De manière intéressante, la plupart de ces mutations sont localisées à l'interface (ou dans un environnement proche) entre les domaines PH et Stalk et pourraient altérer l'auto-inhibition exercée par le domaine PH sur l'activité GTPase.

Afin d'évaluer les conséquences physiologiques de ces mutations, l'endocytose médiée par la clathrine a été analysée dans les fibroblastes d'un patient porteur de la mutation la plus fréquente de l'AD-CNM (p.R465W) ainsi que dans des cellules COS7 surexprimant différents mutants de DNM2. Les résultats de cette étude ont montré une altération de ce mécanisme associée à l'ensemble des mutants (Bitoun et al., 2009). La création en 2010 d'un modèle murin *knock-in* portant la mutation p.R465W localisée dans le domaine middle de DNM2 (KI-*Dnm2*^{R465W}) a permis l'étude *in vivo* des mécanismes physiopathologiques de l'AD-CNM (Durieux et al., 2010). A l'état homozygote, la mutation provoque la mort des souris peu de temps après la naissance, probablement en raison d'une altération de l'endocytose dépendante de la clathrine et de l'autophagie (Durieux et al., 2010, 2012). En revanche, les souris hétérozygotes (HTZ) ont une survie comparable à celle des souris sauvages, mais développent une faiblesse musculaire progressive à l'âge de 3 semaines. Survient ensuite une atrophie musculaire après deux mois, laquelle s'accompagne d'altérations histologiques du réseau de RS et des mitochondries, semblables à celles reportées sur les biopsies de patients. D'après les immuno-marquages réalisés sur les fibres musculaires isolées de souris, DNM2 apparaît localisée à la bande I, au niveau de la ligne Z où elle colocalise avec l' α -actinine (Durieux et al., 2010;

Cowling et al., 2011). De manière intéressante, une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} ainsi que du contenu calcique du RS ont été reportées dans les fibres musculaires de souris HTZ KI-*Dnm2*^{R465W} (Durieux et al., 2010; Fraysse et al., 2016), suggérant qu'un défaut de l'homéostasie calcique puisse contribuer à la faiblesse musculaire associée à l'AD-CNM.

L'injection intramusculaire d'un vecteur AAV exprimant la DNM2 humaine avec la mutation p.R465W chez la souris adulte provoque une perte de force musculaire associée à une atrophie des fibres (Cowling et al., 2011). Contrairement à la souris KI-*Dnm2*^{R465W} qui ne présente qu'une légère désorganisation des tubules T (Durieux et al., 2010), les analyses de microscopie électronique ont révélé chez ce modèle des altérations structurales triadiques affectant la morphologie des tubules T et du RS (Cowling et al., 2011). En accord avec un rôle possible de DNM2 dans la stabilisation et la morphologie des tubules T, l'expression ectopique dans les muscles de *Drosophila melanogaster* de DNM2 portant l'une des mutations R465W, A618T ou S619L a été associée à une fragmentation des tubules T. De manière intéressante, le même résultat a été obtenu avec une forte expression de DNM2 sauvage, suggérant un effet gain de fonction des mutations associées à l'AD-CNM (Chin et al., 2015). Chez la larve de poisson zèbre, l'expression du mutant DNM2-S619L provoque des altérations comparables au niveau des tubules T, par ailleurs associées à un défaut du couplage EC (Gibbs et al., 2014). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent une fonction spécifique de DNM2 dans le muscle squelettique, associée à la formation et la maintenance des structures triadiques. Mon travail de thèse s'est également intéressé à caractériser les propriétés du couplage EC et de la signalisation calcique dans les fibres musculaires du modèle murin HTZ KI-*Dnm2*^{R465W}. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication et sont présentés dans la section 2 de la partie *Résultats* (Kutchukian et al., 2017).

Enfin, les mécanismes pathologiques de certaines mutations associées à l'AD-CNM ont été étudiés à travers l'implication de DNM2 dans la régulation de la dynamique de l'actine. En effet, des interactions entre DNM2 et des protéines associées à l'actine telles que la cortactine et l'Abp1 (Actin Binding Protein 1) ont été décrites (Kessels et al., 2001; Schafer et al., 2002) et permettraient notamment le remodelage des filaments d'actine médié par l'activité GTPase de DNM2 (Mooren et al., 2009). De plus, le traitement de myoblastes RCMH avec le dynasore, un inhibiteur de l'activité GTPase, bloque la formation de nouveaux filaments d'actine (González-Jamett et al., 2017). De manière intéressante, des altérations comparables ainsi qu'un défaut du transport de GLUT4 ont été observés dans des myoblastes transfectés avec différents mutants de DNM2 associés à l'AD-CNM (K44A, R369W, R465W) ainsi que dans les fibres musculaires de la souris HTZ KI-*Dnm2*^{R465W} (González-Jamett et al., 2017). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent un rôle critique de DNM2 dans la régulation du trafic membranaire intracellulaire médié par l'actine. De plus, l'altération de



D

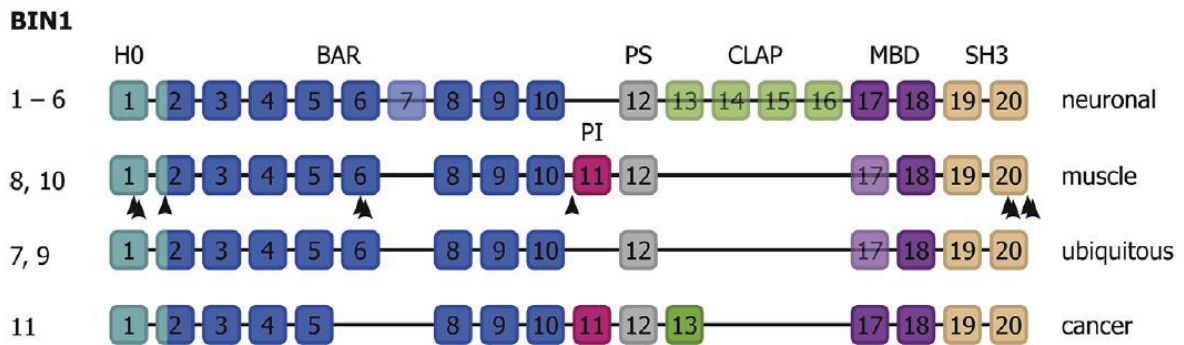


Figure 16. Histologie de la myopathie centronucléaire autosomique récessive (AR-CNM) associée à BIN1 et représentation des domaines et des mutations pathologiques de BIN1.

A, B et C/ Coupes transversales musculaires montrant (A et B) une prolifération du tissu conjonctif endomysial ainsi qu'un grand nombre de fibres arrondies avec des noyaux centraux, parfois accumulés (A, coloration à l'hématoxyline et à l'éosine). Une région claire bordée d'un liseré sombre apparaît en position centrale et correspond à l'emplacement des noyaux (B, coloration NADH-TR). (C) Cliché de microscopie électronique d'une section longitudinale montrant un matériel amorphe au centre des fibres, constitué de noyaux, de mitochondries, d'éléments sarco-tubulaires et de particules de glycogène. D'après Romero, 2010.

D/ Représentation des différentes isoformes de BIN1, de leurs domaines et de leur expression tissulaire. Les exons, numérotés de 1 à 20, apparaissent en semi-transparent lorsqu'ils sont épissés alternativement au sein d'un même tissu. Les pointes de flèches indiquent la position des mutations associées à la CNM. D'après Hohendahl et al., 2016.

cette fonction pourrait participer aux mécanismes physiopathologiques de l'AD-CNM, notamment en affectant la biogénèse et la maintenance des tubules T.

III. La myopathie centronucléaire autosomique récessive

a) *Les symptômes cliniques et histologiques*

Chez l'Homme, des mutations autosomiques récessives dans les gènes *RYR1* (Jungbluth et al., 2007), *BIN1*, *TTN*, *CCD78* et *SPEG* sont associées à la myopathie centronucléaire (AR-CNM ; MIM 255200) (Figure 12). L'AR-CNM est la forme la plus rare des CNM et se déclare généralement dans l'enfance. Classiquement, les patients atteints d'AR-CNM présentent un phénotype modéré à sévère caractérisé par une faiblesse musculaire progressive à prédominance proximale et/ou distale. Une ophtalmoparésie est fréquemment reportée, excepté pour les cas associés à des mutations dans les gènes *TTN*, *CCD78* et *SPEG* (Jungbluth et al., 2018). Une atteinte de la fonction cardiaque a été décrite dans les cas d'AR-CNM associées à *SPEG* et *TTN* (Ceyhan-Birsoy et al., 2013; Agrawal et al., 2014). En particulier, les mutations dans le gène *BIN1*, identifiées grâce à une approche de gènes candidats (Nicot et al., 2007) causent un phénotype de sévérité variable, souvent associé à une amyotrophie, une faiblesse musculaire généralisée, un ptosis et une diplégie faciale (Romero et Bitoun, 2011).

Les rares biopsies de patients atteints d'AR-CNM associée à *BIN1* montrent des noyaux centralisés, souvent accumulés et alignés au milieu de la fibre (Figure 16 A-C). Une forte prédominance des fibres de type I ainsi qu'une augmentation du tissu conjonctif endomysial sont classiquement observées. En coloration NADH-TR, une région claire apparaît en position centrale et correspond aux noyaux. Enfin, les données de microscopie électronique révèlent un matériel amorphe au centre des fibres, constitué de noyaux, de mitochondries, d'éléments sarco-tubulaires et de particules de glycogène (Romero, 2010; Sewry et Wallgren-Pettersson, 2017). De manière intéressante, les marquages immuno-histochimiques révèlent une accumulation centrale du DHPR, de *RYR1*, de la desmine et de la cavéoline 3 (Romero, 2010).

b) *L'amphiphysine 2 (BIN1)*

BIN1 (pour bridging integrator 1) est une protéine impliquée dans l'invagination tubulaire des membranes et dans le trafic membranaire. Sa séquence est proche de l'amphiphysine 1, une

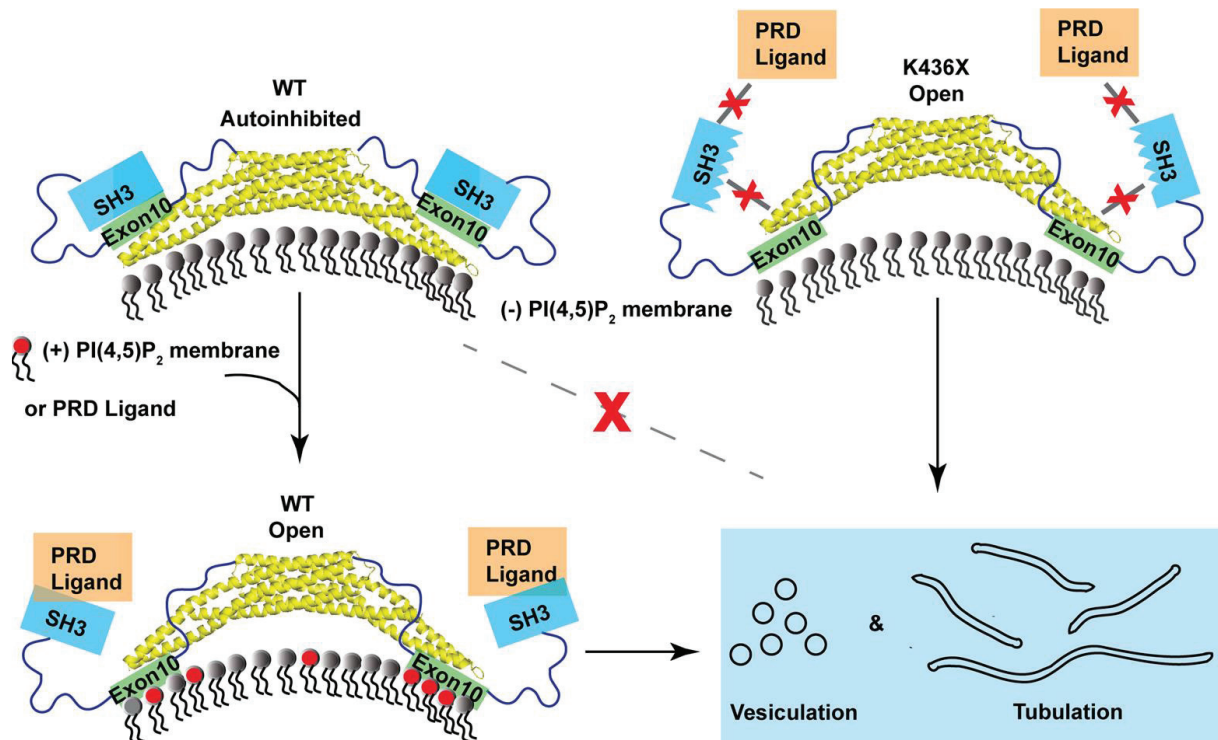


Figure 17. Modèle de l'effet de la composition membranaire en PtdIns(4,5)P₂ ou de l'interaction avec des ligands protéiques sur l'activité de BIN1, proposé par Wu et Baumgart.

En l'absence de PtdIns(4,5)P₂ à la membrane, BIN1 adopte une conformation auto-inhibitrice dans laquelle le domaine SH3 interagit avec le domaine PI (exon 10). La liaison de BIN1 au PtdIns(4,2)P₂ *via* le domaine PI ou à une protéine contenant un domaine PRD (telle que la dynamine) *via* le domaine SH3 induit un changement de conformation activant la fonction de tubulation membranaire de BIN1.

D'après Wu et Baumgart, 2014.

Nb. Depuis la découverte d'un nouvel exon dans le domaine BAR (exon 7), l'exon 10 représenté ici correspond aujourd'hui à l'exon 11.

protéine impliquée dans l'endocytose médiée par la clathrine, et pour cette raison prend également le nom d'amphiphysine 2. Chez l'Homme, le gène *BIN1* est situé sur le chromosome 2q14 (Negorev et al., 1996) et possède 20 exons dont l'épissage alternatif génère 11 isoformes (Hohendahl et al., 2016), principalement exprimées dans le cerveau et dans le muscle squelettique, au niveau des tubules T (Butler et al., 1997).

La structure de BIN1 fait intervenir un domaine BAR (BIN1/Amphiphysin/Rvs167) capable de s'assembler en un homodimère en forme de croissant. Sa surface concave est chargée positivement et interagit avec les lipides chargés négativement présents dans les membranes (Peter et al., 2004). Ainsi, via des interactions électrostatiques, le domaine BAR joue un rôle de senseur et d'inducteur de la courbure membranaire (Frost et al., 2009). Son extrémité N-terminale s'insère dans la membrane où elle forme une hélice α amphipathique au sein de laquelle les résidus hydrophiles font face aux résidus hydrophobes (Löw et al., 2008). De même qu'un domaine BAR, toutes les isoformes de BIN1 possèdent un domaine MBD de liaison au facteur de transcription oncogène c-Myc, suivi d'un domaine SH3 en position C-terminale permettant l'interaction avec d'autres protéines *via* leur domaine PRD, telle que la dynamine (Grabs et al., 1997) (Figure 16 D). La variabilité entre les différentes isoformes de BIN1 est conférée par sa région centrale. En effet, les isoformes neuronales (1 à 6) possèdent un domaine de liaison à la clathrine et à l'AP-2 (CLAP). Ce domaine, codé par les exons 13 à 16, permet leur adressage aux pseudo-vésicules coiffées de clathrine et ainsi de jouer un rôle dans l'endocytose. Ce domaine est absent chez les isoformes musculaires (8 et 10), qui expriment à la place un domaine « PI » de liaison aux PtdInsPs (Lee et al., 2002) codé par l'exon 11. Contrairement à l'isoforme 1, la surexpression de l'isoforme 8 dans différents types cellulaires induit la formation de tubules membranaires, suggérant un rôle tissu-spécifique de BIN1 dans la biogénèse des tubules T (Lee et al., 2002; Nicot et al., 2007). En particulier, il a été suggéré que l'adressage de BIN1 au tubule T soit médié par des interactions entre le domaine PI et le PtdIns(4,5) P_2 (Lee et al., 2002) et que, par ailleurs, la capacité du domaine BAR à regrouper le PtdIns(4,5) P_2 à la membrane facilite le recrutement de la dynamine (Picas et al., 2014). En plus du PtdIns(4,5) P_2 , des interactions entre le domaine PI et le domaine SH3 de BIN1 ont été mises en évidence, et réguleraient également le recrutement de la dynamine (Kojima et al., 2004). En 2014, Wu et Baumgart ont montré une inhibition de l'activité de BIN1 en l'absence de PtdIns(4,5) P_2 à la membrane, réversible après l'ajout d'un analogue soluble du PtdIns(4,5) P_2 ou de peptides PRD. Ainsi, les auteurs ont proposé un modèle selon lequel la liaison de BIN1 au PtdIns(4,5) P_2 *via* le domaine PI ou à la dynamine *via* le domaine SH3 induirait un changement de conformation levant l'auto-inhibition exercée par l'interaction entre ces domaines (Figure 17) (Wu et Baumgart, 2014).

Les mutations dans le gène *BIN1* associées à l'AR-CNM sont localisées dans le domaine BAR et son hélice amphipathique (N-BAR), dans le domaine PI ainsi que dans le domaine SH3 (Nicot et al., 2007; Claeys et al., 2010; Böhm et al., 2010, 2013, 2014) (Figure 16 D).

Les analyses fonctionnelles de mutations dans le domaine N-BAR de BIN1 dans des myotubes C2C12 et des cellules COS-1 ont révélé une altération notable de l'activité de tubulation de BIN1 (Nicot et al., 2007; Wu et al., 2014). En particulier, il a été suggéré que les mutations situées dans la région codant pour l'hélice N-terminale amphipathique affectent son activité de tubulation en réduisant la polarité de l'hélice et donc la liaison de BIN1 aux lipides chargés négativement de la membrane (pour revue, voir Hohendahl et al., 2016). Les mutations reportées dans l'exon 11 conduisent à l'absence du domaine PI et ont été associées à une altération de l'organisation des tubules T chez les patients et à un défaut de tubulation dans les myotubes en culture (Böhm et al., 2013; Wu et Baumgart, 2014). Dans leur revue, Hohendahl et al. (2016) se basent sur le modèle proposé par Wu et Baumgart (2014) et formulent la double hypothèse selon laquelle l'absence du domaine PI (1) impacterait le recrutement de BIN1 à la membrane et donc l'empêcherait d'exercer son activité et (2) altérerait l'interaction auto-inhibitrice conduisant à une dérégulation de la tubulation/vésiculation membranaire. Enfin l'étude d'une mutation causant la troncature partielle du domaine SH3 a montré *in vitro* une réduction du recrutement de la dynamine par le mutant BIN1 (Nicot et al., 2007), suggérant que le mécanisme pathologique de cette mutation interfère avec le rôle de DNM2 dans la biogénèse et dans la maintenance des tubules T, et avec l'auto-régulation de BIN1 par le domaine SH3.

En 2001, un modèle de *Drosophila* a été généré par délétion du seul gène codant pour l'amphiphysine (*Amph*) (Razaq et al., 2001). De manière intéressante, les drosophiles sont viables et ne présentent pas de défauts de l'endocytose, mais sont incapables de voler. Les analyses ultrastructurales ont alors révélé une sévère désorganisation de la triade, suggérant un rôle critique de l'amphiphysine dans la biogénèse des tubules T. Bien que l'ablation génétique de *Bin1* soit létale chez la souris (Muller et al., 2003), l'étude du rôle de BIN1 dans la fibre musculaire adulte a été rendue possible grâce à la technologie des « short hairpin (sh) RNA », de petites séquences d'ARN induisant l'extinction de l'expression d'un gène par ARN interférence. En effet, l'électroporation *in vivo* dans le muscle *FDB* de souris d'un shRNA dirigé contre *Bin1* a révélé des altérations structurales des tubules T (Tjondrokoesoemo et al., 2011). Ces altérations s'accompagnent d'un défaut du couplage EC caractérisé par une réduction de l'amplitude du courant calcique à travers le DHPR et des transitoires calciques du RS, suggérant un rôle critique de BIN1 dans la maintenance des tubules T et dans l'homéostasie calcique dans la fibre musculaire squelettique adulte. En accord avec cette hypothèse, l'absence de *bin1* chez un modèle poisson zèbre de l'AR-CNM généré par la technologie

des oligonucléotides morpholinos (MO) provoque une désorganisation triadique associée à une altération du couplage EC (Smith et al., 2014). La surexpression de BIN1 portant l'une des mutations associées à l'AR-CNM (p.K35N ou p.K75*) chez les larves *bin1* MO n'induit aucune amélioration de l'ultrastructure, contrairement aux isoformes sauvages 8 et 9 de BIN1. En particulier, ces deux isoformes se distinguent par la présence d'un domaine PI chez l'isoforme 8, absent chez l'isoforme 9. Le fait que le phénotype des larves *bin1* MO soit amélioré dans les deux conditions suggère que le rôle critique de BIN1 dans la biogénèse des tubules T est indépendant de son domaine PI (Smith et al., 2014).

c) *SPEG*

En 2014, la protéine SPEG a été identifiée comme un partenaire protéique de MTM1 grâce à un cribble de double hybride chez la levure (Agrawal et al., 2014). Les analyses immuno-histochimiques ont par ailleurs confirmé la présence de SPEG dans le muscle squelettique et révélé une localisation triadique, probablement à la membrane du RS. Parallèlement, les auteurs de cette étude ont découvert des mutations dans le gène *SPEG* causant une forme sévère et infantile de la CNM, associée à une cardiomyopathie (Agrawal et al., 2014). Les deux isoformes SPEG α et SPEG β proviennent du même gène et sont exprimées dans le cœur et dans le muscle squelettique (Hsieh et al., 2000). Plus précisément, leur expression est régulée au cours du développement : SPEG α est majoritairement présente durant la différenciation du muscle squelettique tandis que les deux isoformes SPEG α et SPEG β sont exprimées dans les cardiomyocytes durant la période néonatale. Bien qu'une activité sérine/thréonine kinase ait été identifiée (Hsieh et al., 2000), la fonction physiologique de SPEG est très peu connue. Très récemment, un modèle murin déficient en *Speg* (*Speg* KO) dans le muscle strié a été généré (Huntoon et al., 2018). L'ablation génétique post-natale de *Speg* provoque chez les souris une faiblesse musculaire et conduit à la mort de tous les individus avant 3 mois. Les analyses histologiques ont révélé des fibres hypotrophiques et de taille variable, ainsi qu'une réduction du nombre de triades. De manière intéressante, des tests *in situ* ont révélé une forte réduction de la contraction et de la force musculaire chez les souris *Speg* KO. J'ai notamment pris part à cette étude durant ma thèse et les travaux menés en collaboration au sein de mon équipe ont montré une altération du courant calcique à travers le DHPR ainsi qu'une réduction des transitoires calciques du RS. Ces altérations du couplage EC jouent probablement un rôle majeur dans la faiblesse musculaire des souris *Speg* KO (Huntoon et al., 2018).

IV. Les approches thérapeutiques

A ce jour, il n'existe aucun traitement disponible pour soigner la XL-CNM. Cependant le développement de différentes stratégies depuis quelques années, et notamment dans le domaine de la thérapie génique, a conduit en Septembre 2017 au premier essai clinique chez l'Homme, dont les premiers résultats viennent d'être publiés.

a) La thérapie génique : de la preuve de concept à l'essai clinique

En 2008, la première preuve de concept thérapeutique d'un transfert de gène a été apportée par A. Buj-Bello et son équipe. Dans cette étude, l'injection intramusculaire unique chez la souris *Mtm1* KO d'un vecteur AAV exprimant la myotubularine (AAV2/1-CMV-Mtm1) a montré une nette amélioration du phénotype et de la fonction musculaire (Buj-Bello et al., 2008). Dans une autre étude, l'administration systémique d'un vecteur AAV8 exprimant *Mtm1* sous le contrôle d'un promoteur musculaire chez la souris *Mtm1* KO a confirmé l'efficacité de ce traitement à long terme, même lorsque l'injection était réalisée à un stade avancé de la pathologie (Childers et al., 2014). En effet, l'administration du vecteur réalisée à 3 semaines ou à 5 semaines a montré une restauration du phénotype musculaire et une amélioration substantielle de la survie des souris *Mtm1* KO jusqu'à la fin de l'étude (6 mois post-injection). En 2010, A. Beggs et son équipe ont découvert un mutant naturel de la myotubularine chez le Labrador Retrievers présentant des caractéristiques cliniques et pathologiques similaires à celles des patients XL-CNM. Plus précisément, ces chiens développent une faiblesse musculaire généralisée et progressive à l'âge de 7 semaines, conduisant à la mort entre 3 et 6 mois. Les analyses histologiques révèlent une grande variabilité de la taille des myofibres, la présence de noyaux centraux et des accumulations mitochondriales en périphérie des fibres. De manière intéressante, une orientation anormale ainsi qu'une réduction du nombre de triades ont été observées. Chez ces chiens, le séquençage du gène *MTM1* a permis d'identifier une mutation faux sens p.N155K, conduisant à une réduction de la protéine dans la cellule (Beggs et al., 2010). Ainsi ces chiens malades, nommés XLMTM, représentent un excellent modèle animal supérieur de la myopathie myotubulaire pour la recherche pré-clinique mais aussi pour étudier les doses et les effets d'un traitement. En effet, le poids des chiens XLMTM peut s'apparenter à celui des enfants malades et leur espérance de vie plus longue que celle des rongeurs permet une étude à long terme.

A l'instar de la souris *Mtm1* KO, l'administration intravasculaire d'un vecteur AAV8 exprimant le gène de la myotubularine chez le chien XLMTM s'est révélée non toxique et spectaculairement efficace sur la force musculaire et sur la fonction respiratoire (Childers et al., 2014). De plus, l'analyse

des biopsies a montré une amélioration des paramètres histologiques et de la structure triadique, associée à une augmentation de l'expression de MTM1 dans le muscle squelettique. Le suivi de ces animaux a par ailleurs été assuré et de récentes données indiquent leur survie quatre ans après le traitement (Elverman et al., 2017).

Ces résultats très encourageants ont conduit en Septembre 2017 au premier essai clinique chez plusieurs enfants atteints de XL-CNM. Ce dernier est mené aux Etats-Unis par la société de biotechnologie Audentes Therapeutics, en collaboration étroite avec le Généthon, l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, le Boston Children's Hospital et la University of Washington.

b) La réduction de DNM2

Dans une étude de 2011, Cowling et son équipe ont montré que l'injection intramusculaire d'un vecteur AAV exprimant la DNM2 p.R465W induisait un phénotype similaire à celui de la CNM (Cowling et al., 2011). De plus, la surexpression de la DNM2 sauvage provoque également une perte de force musculaire ainsi que de légères altérations structurales (Cowling et al., 2011), suggérant l'importance d'une régulation fine du niveau et/ou de l'activité de DNM2 dans le muscle squelettique. De manière intéressante, une augmentation de l'expression de DNM2 a été observée sur des biopsies de patients atteints de XL-CNM ainsi que dans les muscles de souris *Mtm1* KO (Cowling et al., 2014). L'ensemble de ces observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle MTM1 agirait comme un régulateur négatif de l'activité de DNM2 dans le muscle squelettique, et qu'une perte de fonction de MTM1 ou un gain de fonction de DNM2 causeraient le phénotype de la XL-CNM. Pour tester cette hypothèse, Cowling et al. (2014) ont généré la souris *Mtm1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-}, déficiente en myotubularine et hétérozygote pour DNM2, et ont montré une nette amélioration du phénotype *Mtm1* KO. En effet, les souris *Mtm1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} ont une espérance de vie similaire à celle des souris sauvages et ne présentent pas d'atrophie musculaire. De plus, les analyses histologiques et structurales n'ont pas révélé de défauts comparables à ceux observés dans les muscles *Mtm1* KO. Dans cette même étude, les auteurs ont également généré un modèle conditionnel dans lequel la délétion hétérozygote de *Dnm2* dans le muscle squelettique de la souris *Mtm1* KO était induite chez l'embryon ou 3 semaines après la naissance (Cowling et al., 2014). De manière intéressante, l'espérance de vie et la masse musculaire des souris *Mtm1* KO ont été augmentées dans ces deux conditions, confirmant l'efficacité d'une stratégie visant à réduire l'expression de DNM2 sur la progression de la pathologie et des altérations associées, même après l'apparition des premiers symptômes. Afin de développer une approche thérapeutique, cette équipe a récemment testé

l'injection systémique ou intramusculaire d'oligonucléotides antisens dirigés contre *Dnm2* chez la souris *Mtm1* KO (Tasfaout et al., 2017). Cette stratégie s'est révélée extrêmement efficace sur la survie, la force musculaire, la masse et l'ultrastructure des fibres musculaires de souris *Mtm1* KO, même à un stade avancé de la pathologie.

c) La surexpression de MTMR2

Dans une récente étude, deux isoformes ubiquitaires MTMR2-L et MTMR2-S (pour long et court, respectivement) ont été identifiées chez la souris (Raess et al., 2017b). En particulier, l'isoforme MTMR2-S montre une activité similaire à celle de MTM1 chez la levure. De manière intéressante, une réduction des taux de MTMR2 et en particulier de l'isoforme courte a été mesurée dans le muscle squelettique de souris *Mtm1* KO et sur des biopsies de patients XL-CNM. Ainsi les auteurs de cette étude ont fait l'hypothèse selon laquelle l'absence de compensation de MTM1 dans le muscle squelettique XL-CNM par la MTMR2 endogène était due à la réduction de son expression. En accord avec cette hypothèse, la surexpression de MTMR2-S ou MTMR2-L chez la souris *Mtm1* KO normalise les taux de PtdIns(3)P et améliore les caractéristiques fonctionnelles et structurales du phénotype XL-CNM, avec de meilleurs résultats obtenus avec l'isoforme courte. Ainsi, MTMR2 représente une cible thérapeutique de la XL-CNM, et des stratégies visant à augmenter son expression via un épissage alternatif de *MTMR2* ou une expression exogène pourraient s'avérer efficaces dans le traitement de la pathologie.

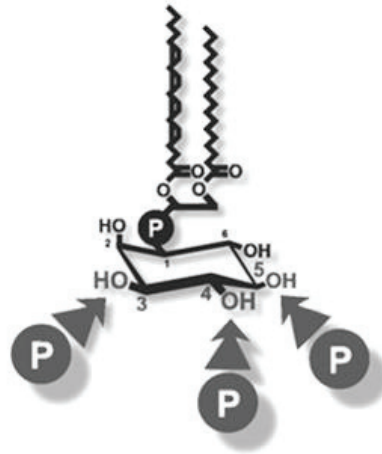
d) La thérapie enzymatique de substitution

Dans une étude parue en 2013, l'administration d'une myotubularine fonctionnelle dans le muscle squelettique a été testée chez la souris *Mtm1* KO (Lawlor et al., 2013). Pour mettre en place une telle stratégie, les auteurs ont injecté dans le muscle squelettique des souris *Mtm1* KO une myotubularine recombinante fusionnée à un fragment d'anticorps 3E10Fv (3E10Fv-MTM1), capable de pénétrer à l'intérieur des fibres. Les souris traitées ont montré une amélioration de leur locomotion, associée à une amélioration de la force de contraction musculaire *in situ*. De manière intéressante, les muscles ayant reçu le traitement 3E10Fv-MTM1 ont montré une augmentation du nombre de tubules T et de triades. L'amélioration de la fonction musculaire pourrait être due à une plus grande efficacité du couplage EC, supporté par les structures triadiques. Ainsi cette étude fournit la preuve de concept de l'efficacité d'une thérapie enzymatique de substitution chez le modèle murin *Mtm1* KO.

e) *L'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase*

MTM1 est une PtdIns 3-phosphatase dont les substrats sont le PtdIns(3)*P* et le PtdIns(3,5)*P*₂. Dans le muscle squelettique, la phosphorylation du phosphatidylinositol par la PtdIns 3-kinase de classe IIB (PI3K2B) et de classe III génère du PtdIns(3)*P*. De manière intéressante, l'absence de MTM1 a été associée à une augmentation du PtdIns(3)*P* dans les muscles de différents modèles de la XL-CNM (Dowling et al., 2012; Pierson et al., 2012; Amoasii et al., 2013). Afin de tester le rôle pathologique d'une accumulation de PtdIns(3)*P* dans la XL-CNM, une récente étude a développé une souris déficiente en MTM1 et en PI3K2B (Sabha et al., 2016). Ces souris montrent une normalisation des taux de PtdIns(3)*P* associée à une nette amélioration de la survie par rapport aux souris *Mtm1* KO, ainsi qu'une restauration de la structure et de la fonction musculaire. Par ailleurs, les auteurs de cette étude ont également montré une restauration du phénotype lorsque l'ablation génétique conditionnelle de la PI3K2B était déclenchée à un stade avancé de la pathologie. Durant mon travail de thèse, j'ai testé la possibilité que l'accumulation des substrats de MTM1 soit délétère pour la fonction du couplage EC. Pour le vérifier, j'ai évalué les propriétés du couplage EC et des transitoires calciques *in vitro* sur des fibres musculaires isolées de souris *Mtm1* KO traitées à la wortmannine, un pan-inhibiteur de l'activité PtdIns 3-kinase. Dans un deuxième temps, j'ai également testé l'effet de l'inhibition pharmacologique de l'activité PtdIns 3-kinase *in vivo*, sur la survie des souris *Mtm1* KO. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication (Kutchukian et al., 2016) et seront présentés dans la section 2 de la partie *Résultats*.

A



B

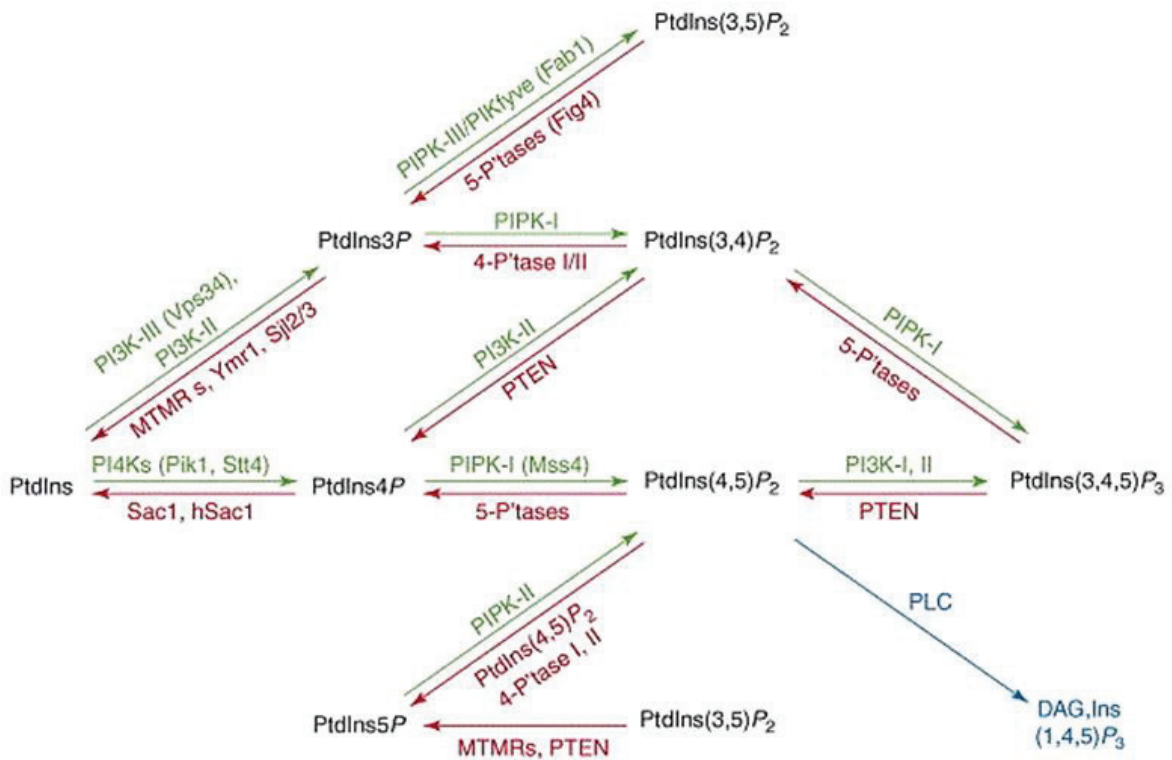


Figure 18. La famille des phosphoinositides (PtdInsPs).

A/ Schéma représentant un phosphatidylinositol (PtdIns), avec ses deux chaînes d'acides gras (diacylglycérol ; DAG) reliées au cycle *myo*-inositol par une liaison phosphodiester. Les flèches indiquent les groupes hydroxyles (-OH) en position D3, D4 et D5 du cycle inositol pouvant être phosphorylés/déphosphorylés par les kinases et phosphatases. D'après Hammond et Balla, 2015.

B/ Réactions métaboliques générant les 7 espèces de PtdInsPs à partir du PtdIns. Les réactions catalysées par les kinases et les phosphatases sont représentées par les flèches vertes et rouges, respectivement. La phospholipase C (PLC) dégrade le PtdIns(4,5)P₂ en DAG et en inositol triphosphate (Ins(1,4,5)P₃). D'après Robinson et Dixon, 2006.

Chapitre 3. Phosphoinositides

Ces vingt dernières années ont connu un intérêt croissant pour les phosphatidylinositols-phosphate (phosphoinositides, PtdInsPs) et leur implication dans divers processus cellulaires, incluant le trafic membranaire, l'ancrage de protéines, le transport de vésicules ou encore la régulation de canaux ioniques, a fait l'objet d'un nombre colossal d'études (pour revues, voir Balla, 2013; Hammond et Balla, 2015). Etant donné l'étendue de la littérature sur ce sujet, ce chapitre sera essentiellement consacré aux principaux PtdInsPs connus pour être impliqués dans la régulation du couplage EC et de l'homéostasie calcique.

I. La famille des PtdInsPs

a) *Structure et espèces*

Les PtdInsPs sont de petites molécules composées de deux chaînes d'acides gras (diacylglycérol, DAG) permettant leur insertion dans les membranes et d'une tête polaire constituée d'un cycle inositol (Figure 18 A). Dans la membrane du réticulum endoplasmique, la liaison du DAG au cycle *myo*-inositol se fait au niveau de son premier groupe hydroxyle *via* une liaison phosphodiester, et cet assemblage forme le phosphatidylinositol (PtdIns). Cinq autres groupes hydroxyles (numérotés 2 à 6) sont présents sur le cycle *myo*-inositol et leur phosphorylation/déphosphorylation aux positions 3, 4 et 5 génère un total de sept espèces inter-convertibles de PtdInsPs (Figure 18B) (McCrea et De Camilli, 2009). Ainsi selon le nombre de sites phosphorylés, ces différentes espèces de PtdInsPs sont réparties en trois classes :

- Les PtdInsPs monophosphates : le PtdIns(3)P, le PtdIns(4)P et le PtdIns(5)P
- Les PtdInsPs biphosphates : le PtdIns(3,5)P₂, le PtdIns(4,5)P₂ et le PtdIns(3,4)P₂
- Le PtdInsP triphosphate PtdIns(3,4,5)P₃

Dans les cellules neuronales de souris en culture, le PtdIns constitue 5 à 10 % de la composition totale des membranes en phospholipides. Bien que dans une moindre proportion, le PtdIns(4)P et le PtdIns(4,5)P₂ sont les PtdInsPs majoritaires et représentent chacun environ 10 % du taux de PtdIns, soit entre 0,5 et 1 % des phospholipides totaux (Wenk et al., 2003). La proportion des autres espèces de PtdInsPs est encore plus faible et représenterait moins de 1% des PtdInsPs totaux. Néanmoins, ces estimations peuvent varier selon le tissu et le type cellulaire (voir Lemmon, 2008; Balla, 2013a).

Bien que minoritaires dans la composition des membranes, les PtdInsPs sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires et voies de signalisation. Plus précisément, ils

Nom des domaines	Espèces de phosphoinositides
Pleckstrin homology (PH)	PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns4 <i>P</i> , PtdIns(3,4,5) P_3 , PtdIns(3,4) P_2
FYVE	PtdIns(3) <i>P</i>
Phox homology (PX)	PtdIns(3) <i>P</i>
ENTH (epsin NH ₂ -terminal homology)	PtdIns(4,5) P_2
ANTH (AP180 NH ₂ -terminal homology)	PtdIns(4,5) P_2
FERM (4.1-ezrin-radexin-moesin)	PtdIns(4,5) P_2
PTB	PtdIns(4,5) P_2
GLUE	PtdIns(3,4,5) P_3
Eps15 homology (EHD)	PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns4 <i>P</i>
BAR (Bin–Amphiphysin–Rvs)	PtdIns(4,5) P_2
PDZ	PtdIns(4,5) P_2

Figure 19. Les domaines de liaison aux phosphoinositides (PtdInsPs).

D'après Balla, 2013.

peuvent contrôler l'interface membrane/cytosol, soit en interagissant, *via* leur tête polaire, avec les domaines cytosoliques de protéines membranaires (canaux ioniques et transporteurs), soit en recrutant diverses protéines et molécules de signalisation à la face cytosolique des membranes (Di Paolo et De Camilli, 2006). Spécifiquement, ces interactions sont de nature électrostatique et sont médiées au niveau de domaines protéiques tels que les domaines PH (Pleckstrin Homology), PX (Phox Homology), FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) ou encore le domaine BAR (Hammond et Balla, 2015) (Figure 19).

Le taux et la localisation subcellulaire des PtdInsPs sont finement régulés par des kinases et phosphatases qui ajoutent ou clivent respectivement des groupes phosphate sur le cycle inositol, et dont la distribution est spécifique à chaque compartiment cellulaire. Ainsi, les faces cytosoliques des différentes membranes intracellulaires détiennent une composition spécifique en PtdInsPs (Figure 20). Depuis quelques années, le clonage des domaines protéiques de liaison aux PtdInsPs a permis le développement de sondes fluorescentes spécifiques de ces différentes espèces et ainsi de déterminer leur localisation subcellulaire (Hammond et Balla, 2015). Plus précisément, le PtdIns(4,5)P₂, le PtdIns(3,4,5)P₃, le PtdIns(3,4)P₂ et le PtdIns(4)P sont présents au niveau de la membrane plasmique. Le PtdIns(4)P est principalement retrouvé dans l'appareil de Golgi, tandis que le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P₂ sont présents respectivement à la membrane des endosomes précoces et tardifs.

b) Phosphatases et kinases

MTM1 et la famille des myotubularines reliées à une myopathie (MTMRs)

La myotubularine (MTM1) est une phosphoinositide 3-phosphatase déphosphorylant le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P₂ (Blondeau et al., 2000; Tronchère et al., 2004) et des mutations dans le gène *MTM1* sont associées à la myopathie centronucléaire liée à l'X (XL-CNM). La première indication de l'implication du métabolisme des PtdInsPs dans la régulation du couplage EC a été apportée par Al-Qusairi et al. (2009). Dans leur étude, les auteurs ont montré que les fibres musculaires squelettiques de souris déficientes en MTM1 présentaient une altération du couplage EC caractérisée par une désorganisation des tubules T associée à une réduction de l'efflux calcique du RS. La fonction de MTM1 dans le muscle squelettique ainsi que les mécanismes physiopathologiques de la XL-CNM sont traités dans le *Chapitre 2*.

MTM1 appartient par ailleurs à une famille de 14 membres (myotubularines reliées à une myopathie ; MTMRs) (Figure 14) parmi lesquels 8 ont une activité phosphoinositide 3-phosphatase et

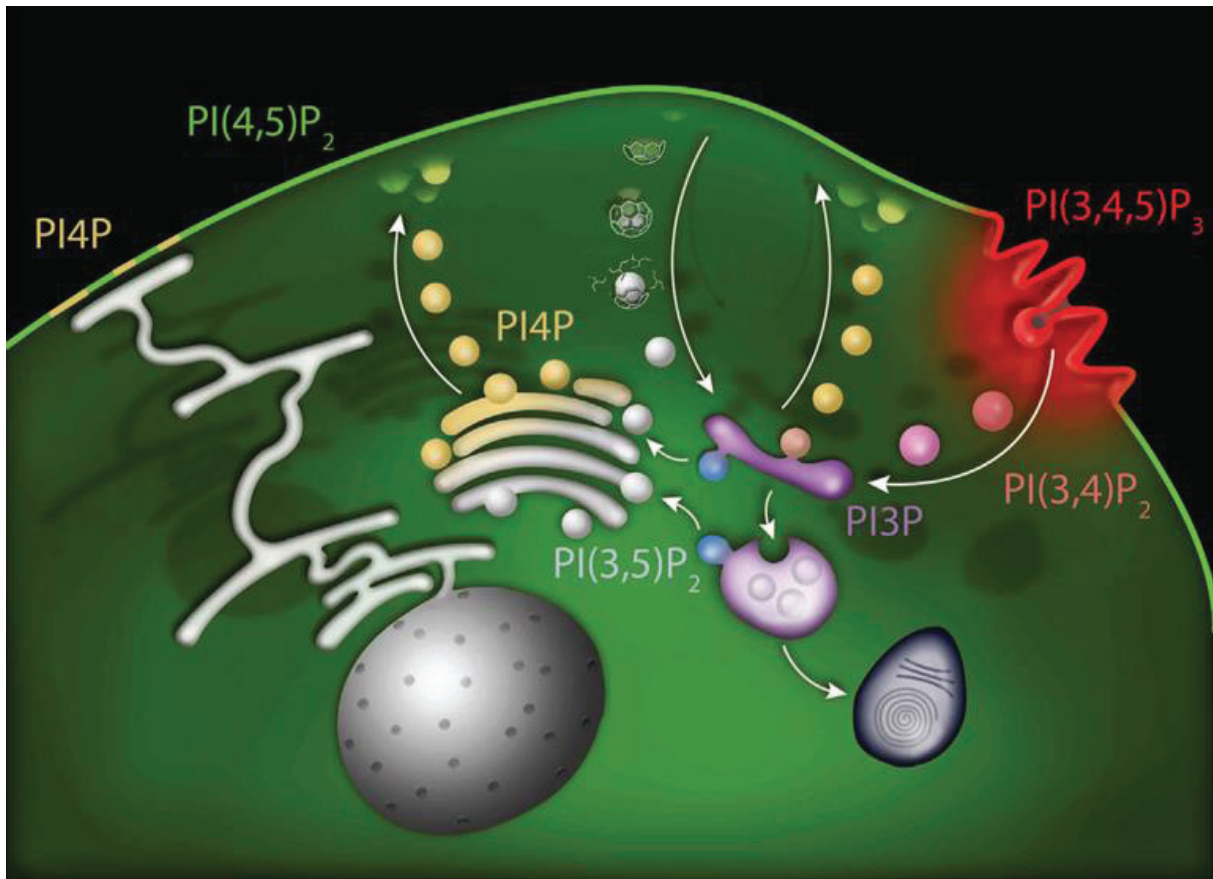


Figure 20. La localisation subcellulaire des différentes espèces de PtdInsPs.

Le PtdIns(4,5) P_2 , le PtdIns(3,4,5) P_3 , le PtdIns(3,4) P_2 et le PtdIns(4) P sont présents au niveau de la membrane plasmique. Le PtdIns(4) P est principalement retrouvé dans l'appareil de Golgi, tandis que le PtdIns(3) P et le PtdIns(3,5) P_2 sont présents respectivement à la membrane des endosomes précoces et tardifs.

D'après Idevall-Hagren et De Camilli, 2015.

partagent un motif catalytique C(X)₅R. En revanche les 6 autres membres sont inactifs mais auraient la capacité de réguler indirectement le métabolisme des PtdInsPs en s'hétérodimérisant avec leurs homologues actifs (Robinson et Dixon, 2006). En effet, quelques études suggèrent que la spécificité de substrats, la localisation subcellulaire ainsi que l'activité enzymatique des myotubularines 3-phosphatases peuvent être modulées par la liaison avec certains de leurs homologues inactifs (Kim et al., 2003; Mochizuki et Majerus, 2003; Berger et al., 2006; Zou et al., 2012; Gupta et al., 2013). En particulier, la phosphatase inactive MTMR12 a été identifiée comme interagissant avec MTM1 (Nandurkar et al., 2003). Dans cette étude, la co-expression de MTM1 et MTMR12 dans des cellules COS-7 a révélé la capacité de MTMR12 à relocaliser son homologue actif de la membrane vers le cytosol, régulant ainsi son activité. L'absence de Ymr1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou l'extinction de l'expression de MTM-6 et MTM-9 chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, conduisent à une accumulation aberrante de PtdIns(3)P associée à des altérations du trafic endosomal, suggérant un rôle de la famille des MTMRs dans la régulation de la voie de l'endocytose (Dang et al., 2004; Parrish et al., 2004).

Chez l'Homme, des mutations dans les gènes codant pour la phosphatase active MTMR2 et la phosphatase inactive MTMR13 (ou SBF2) sont associées respectivement à la neuropathie de Charcot Marie Tooth de type 4B1 (CMT4B1) et de type 4B2 (CMT4B2) (Bolino et al., 2000; Azzedine et al., 2003; Senderek et al., 2003). Ces deux pathologies provoquent un phénotype très proche et se caractérisent par une démyélinisation des nerfs périphériques conduisant à une atrophie musculaire et à une faiblesse des muscles distaux. L'expression de différents mutants de MTMR2 associés à la CMT4B1 dans le système *Escherichia coli* a révélé une forte altération de l'activité PtdInsP 3-phosphatase (Berger et al., 2002). De manière intéressante, une interaction entre MTMR2 et MTMR13 a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*, et favorise par ailleurs l'activité PtdInsP 3-phosphatase de MTMR2 (Berger et al., 2006). L'implication de ces deux partenaires dans une pathologie similaire souligne l'importance physiologique de l'hétérodimérisation entre les MTMRs. Des études menées sur différents modèles murins déficients en MTMR2 ou MTMR13, constitutifs ou dans les cellules de Schwann, soulignent l'importance du complexe MTMR2/MTMR13 dans la fonction de myélinisation des cellules de Schwann et dans la physiopathologie de la CMT4B1 et CMT4B2 (Bolino et al., 2004; Bolis et al., 2005; Robinson et al., 2008).

En 2006, des mutations dans le gène *MTMR14* ont été identifiées chez deux patients atteints de CNM (Tosch et al., 2006). Bien qu'éloignées phylogénétiquement, MTMR14 (également appelée JUMPY) et MTM1 possèdent une activité phosphatase et une spécificité de substrats très proches (Tosch et al., 2006; Shen et al., 2009). Afin de déterminer la fonction physiologique de MTMR14, différents modèles animaux transgéniques ont été générés. La souris déficiente en MTMR14,

également appelée MIP^{-/-} (pour *muscle-specific inositol phosphatase*) en raison de sa forte expression dans le cœur et dans le muscle squelettique, a été générée par Shen et al. (2009). De manière surprenante, les souris MIP^{-/-} présentent un développement normal et un phénotype proche de leurs congénères sauvages, au repos. En revanche, des protocoles d'exercice intense révèlent une plus grande fatigabilité et, à long terme, une faiblesse musculaire des souris MIP^{-/-} (Shen et al., 2009). De manière intéressante, les auteurs de cette étude ont mis en évidence une fuite de Ca²⁺ du RS dans les fibres musculaires MIP^{-/-}, probablement causée par l'accumulation des substrats de MTMR14. Pour le tester, des préparations de RYR1 en bicouche lipidique ont été exposées à différentes espèces de PtdInsPs et ont montré que le PtdIns(3,5)P₂ et le PtdIns(3,4)P₂ sont capables d'interagir avec et d'activer les canaux calciques RYR1 (Shen et al., 2009). Ces données suggèrent que l'altération de l'homéostasie calcique des fibres musculaires squelettiques MIP^{-/-} est sans doute causée par l'accumulation des substrats de MTMR14, et que ce mécanisme pourrait jouer un rôle critique dans la faiblesse musculaire de la CNM associée aux variants de MTMR14. Une altération de la fonction musculaire associée à un défaut du couplage EC ont également été reportés dans les fibres musculaires squelettiques du modèle de poisson zèbre sous-exprimant MTMR14 (Dowling et al., 2010). Cependant, des analyses de microscopie électronique n'ont révélé aucune altération structurale dans les fibres musculaires de ce modèle (Dowling et al., 2010), et seulement de légères altérations de la morphologie des tubules T ont été observées dans les fibres musculaires de souris MIP^{-/-} (Hnia et al., 2012). Ces résultats encouragent l'hypothèse selon laquelle l'altération du métabolisme des PtdInsPs joue un rôle critique dans le maintien de la fonction musculaire indépendamment de l'organisation structurale, à travers une régulation de la signalisation calcique et du couplage EC. De plus, MTMR14 apparaît localisée au niveau des autophagosomes précoces et jouerait un rôle inhibiteur de l'autophagie (Vergne et al., 2009). En effet, la surexpression de la forme sauvage de MTMR14 ou d'un variant associé à la CNM dont le site catalytique est inactif, provoquent respectivement une réduction et une augmentation de l'autophagie dans les myotubes C2C12. De manière intéressante, une augmentation du taux de LC3 II, un marqueur de l'autophagie, a été rapportée dans les fibres musculaires de souris MIP^{-/-} et de poisson zèbre MTMR14 MO (Dowling et al., 2010; Hnia et al., 2012). Ces résultats confirment le rôle de MTMR14 dans l'initiation de l'autophagie à travers la régulation des taux de PtdIns(3)P, et suggèrent une altération pathologique de ce mécanisme dans la CNM associée à des mutations de *MTMR14*.

PTEN

À l'instar de MTM1 et des MTMRs, PTEN (pour *phosphatase and tensin homolog*) appartient à la famille des PtdInsP 3-phosphatase. Plus spécifiquement, PTEN est hautement spécifique du

PtdIns(3,4,5) P_3 et pour cette raison, est considéré comme le premier antagoniste fonctionnel de la PtdIns 3-Kinase de classe I (Balla, 2013). Le PtdIns(3,4,5) P_3 est un activateur de la voie de signalisation AKT/mTOR contrôlant la croissance et le cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse, et dont une sur-activation est associée à différentes formes de cancers. Ainsi, en déphosphorylant le PtdIns(3,4,5) P_3 , PTEN joue un rôle critique de suppresseur de tumeurs. Par ailleurs, des mutations perte de fonction dans le gène *PTEN*, situé sur le chromosome 10, sont associées à de nombreux cancers, tels que le glioblastome, le mélanome, les cancers du poumon, du sein, du colon, du rein et de l'utérus (pour revue, voir Lee et al., 2018).

Les PtdInsP 5-phosphatases

Chez le mammifères, 10 homologues de PtdInsP 5-phosphatases ont été identifiés, et sont répartis en 3 types (II-IV), la phosphatase de type I n'agissant que sur l'Ins(1,4,5) P_3 et l'Ins(1,3,4,5) P_4 (Majerus et al., 1999). En bref, les PtdInsP 5-phosphatases de type II comprennent les synaptojanines (SYNJ), la phosphatase OCRL associée au syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe, la INPP5B (pour inositol polyphosphate-5-phosphatase), la INPP5J et la INPP5K ; SHIP1 et SHIP2 appartiennent aux PtdInsP 5-phosphatases de type III et la INPP5E est l'unique PtdInsP 5-phosphatase de type IV. Ces différentes enzymes appartiennent à la famille des endonucléases AP (pour apurinic/aprimidinic) et ont en commun un domaine catalytique hydrolysant le phosphate en position D5 des PtdIns(3,4,5) P_3 , PtdIns(4,5) P_2 et PtdIns(3,5) P_2 , avec toutefois une spécificité variable (Kisseleva et al., 2000; Schmid et al., 2004; Batty et al., 2007). De plus, la structure de ces différentes phosphatases fait intervenir des domaines additionnels qui déterminent une localisation subcellulaire ainsi que des partenaires protéiques spécifiques à chaque membre (pour revue, voir Balla, 2013).

En particulier, la PtdInsP 5-phosphatase de type II INPP5K possède une grande spécificité pour les espèces PtdIns(3,4,5) P_3 et PtdIns(4,5) P_2 *in vitro* et est fortement exprimée dans le muscle squelettique et les reins (Ijuin et al., 2000). Ainsi, elle est également appelée SKIP (pour skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase). Par ailleurs, un domaine SKICH a été identifié dans sa partie C-terminale, et permet sa translocation du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique suite à une stimulation au facteur de croissance épidermique (EGF) qui est un activateur de la PtdIns 3-kinase (Gurung et al., 2003). De manière intéressante, l'ablation génétique de SKIP chez la souris est létale à l'état homozygote, et provoque à l'état hétérozygote une plus grande sensibilité à l'insuline associée à une augmentation de l'activation d'AKT et du transport de glucose (Ijuin et al., 2008). Ces données suggèrent un rôle de SKIP dans la régulation de la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique, *via* l'hydrolyse du PtdIns(3,4,5) P_3 à la membrane plasmique

produit par la PtdIns 3-kinase. Plus récemment, des mutations dans le gène codant pour SKIP ont été associées à une dystrophie musculaire congénitale (Wiessner et al., 2017). Ces patients présentent une cataracte bilatérale ainsi qu'une faiblesse musculaire proximale dès la naissance, un retard de développement moteur et une perte de la marche à un stade tardif de la maladie. L'histologie de biopsies musculaires révèle une dystrophie. Dans cette étude les auteurs ont testé l'effet de ces mutations sur la localisation subcellulaire et l'activité phosphatase de SKIP envers le PtdIns(4,5) P_2 , et ont révélé une altération de ces deux paramètres chez tous les mutants (Wiessner et al., 2017). Si les mécanismes associés à ces mutations restent non élucidés, ces résultats révèlent pour la première fois l'importance d'une PtdInsP 5-phosphatase dans la fonction et la structure musculaire, et suggèrent une accumulation pathologique du PtdIns(4,5) P_2 à la membrane plasmique.

Les PtdInsP 4-phosphatases

Les PtdInsP 4-phosphatases sont des enzymes déphosphorylant le PtdIns(3,4) P_2 et le PtdIns(4,5) P_2 en position D4 du cycle inositol. En revanche le PtdIns(3,4,5) P_3 n'est pas hydrolysé par ces enzymes. En particulier, les PtdInsP 4-phosphatases sont réparties en deux catégories selon leur substrat : ainsi on distingue les INPP4A et B déphosphorylant le PtdIns(3,4) P_2 en PtdIns(3) P et les TMEM55A et B déphosphorylant le PtdIns(4,5) P_2 en PtdIns(5) P (Balla, 2013).

Le rôle des INPP4s a été principalement étudié à travers la régulation des taux de PtdIns(3,4) P_2 à la membrane plasmique, qui avec le PtdIns(3,4,5) P_3 , participe à l'activation de AKT et donc active la voie de la prolifération et la survie cellulaire (Ivetac et al., 2009; Rodgers et al., 2017). L'expression de TMEM55A et TMEM55B dans des cellules HeLa révèle une localisation subcellulaire de ces deux enzymes au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (Ungewickell et al., 2005). Si la fonction physiologique des TMEM55s reste obscure, de récentes études suggèrent que TMEM55A jouerait un rôle inhibiteur de la phagocytose (Morioka et al., 2018) tandis que TMEM55B serait impliquée dans la synthèse protéique via le recrutement de mTORC1 à la membrane des lysosomes (Hashimoto et al., 2018).

La phosphatase Sac1

La phosphatase Sac1, identifiée chez la levure ainsi que chez le mammifère, est une protéine membranaire intégrale, c'est-à-dire en interaction permanente avec une membrane, et est localisée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi (Xie et al., 1998; Nemoto et al., 2000). Par ailleurs, les Sac1 de mammifère et de levure possèdent un site catalytique C(X)₅R(T/S) leur conférant une spécificité pour tous les PtdIns monophosphates ainsi que pour le PtdIns(3,5) P_2

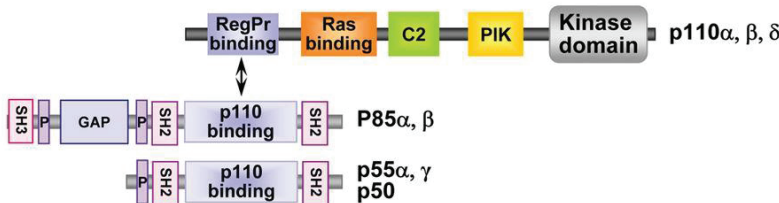
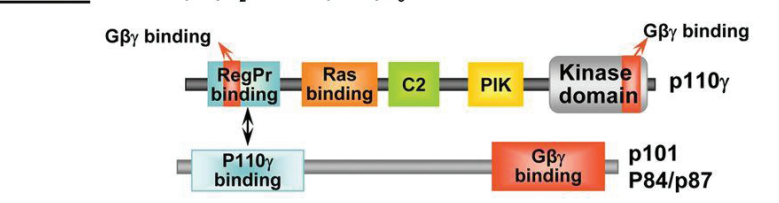

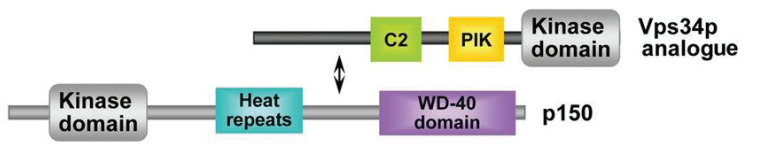
PI3K CLASSIFICATION	REGULATION
<p>Class IA $PI(4,5)P_2 \rightarrow PI(3,4,5)P_3$</p>  <p>RegPr binding, Ras binding, C2, PIK, Kinase domain, p110α, β, δ</p> <p>SH3, GAP, SH2, p110 binding, SH2, P85α, β</p> <p>SH2, p110 binding, SH2, p55α, γ, p50</p>	<p>Tyrosine kinases Ras G$\beta\gamma$ for p110β</p>
<p>Class IB $PI(4,5)P_2 \rightarrow PI(3,4,5)P_3$</p>  <p>G$\beta\gamma$ binding, RegPr binding, Ras binding, C2, PIK, Kinase domain, p110γ</p> <p>P110γ binding, G$\beta\gamma$ binding, p101, P84/p87</p>	<p>G$\beta\gamma$ Ras</p>
<p>Class II $PI(4)P \rightarrow PI(3,4)P_2$</p>  <p>Ras binding, C2, PIK, Kinase domain, PX, C2, PI3KC2α, β, γ</p>	<p>Tyrosine kinases Chemokines</p>
<p>Class III $PIP \rightarrow PI(3)P$</p>  <p>Kinase domain, Heat repeats, C2, PIK, Kinase domain, Vps34p analogue, p150</p> <p>WD-40 domain</p>	<p>Constitutive ?</p>

Figure 21. La famille des PtdInsP 3-kinases.

Représentation de la structure des différentes isoformes de PtdIns 3-kinases et de leur sous-unités régulatrices. La colonne de droite résume les protéines régulant l'activité des différentes classes de PtdIns 3-kinases.

D'après Fougerat et al., 2009.

(Nemoto et al., 2000). En conditions basales, Sac1 est majoritairement localisée à la membrane du RE, mais s'accumule à la membrane du Golgi dans les cellules quiescentes, probablement dans le but d'inhiber le trafic antérograde *via* l'hydrolyse du PtdIns(4)*P* (Blagoveshchenskaya et al., 2008). De manière intéressante, une récente étude a montré la présence de Sac1 dans les zones de contact entre la membrane plasmique et le RE (jonctions RE-MP) de cellules tsA201 (Dickson et al., 2016). Dans cette élégante étude, les auteurs ont montré que la formation de jonctions RE-MP était associée à une augmentation du taux de Sac1 et à une réduction de PtdIns(4)*P* et de PtdIns(4,5)*P*₂ dans ces régions, et qu'à l'inverse, la manipulation des stocks de PtdIns(4,5)*P*₂ à la membrane affectait la localisation de Sac1 aux jonctions RE-MP. Ces résultats suggèrent que, depuis la membrane du RE, Sac1 détecte et régule finement les taux de PtdIns(4,5)*P*₂ en hydrolysant son précurseur le PtdIns(4)*P* à la membrane plasmique.

Les PtdIns 3-Kinases

La famille des PtdIns 3-kinases compte 8 isoformes réparties en 3 classes fonctionnelles selon leur composition en domaines, leur spécificité de substrats et leur sous-unités régulatrices. Ainsi la classe I est constituée des isoformes de sous unités catalytiques p110 α , p110 β , p110 δ et p110 γ ; la classe II des isoformes PI3KC2 α , PI3KC2 β et PI3KC2 γ ; et enfin l'unique isoforme Vps34 constitue la classe III (Foster, 2003) (Figure 21).

➤ Les PtdIns 3-kinases de classe I

Des études *in vitro* ont montré la capacité des PtdIns 3-kinases de classe I à phosphoryler le PtdIns, le PtdIns(4)*P*, et le PtdIns(4,5)*P*₂ en position D3 du cycle inositol, cependant le PtdIns(4,5)*P*₂ apparaît être le principal substrat *in vivo*, conduisant à la production de PtdIns(3,4,5)*P*₃ à la membrane plasmique (Auger et al., 1989; Foster, 2003). Selon la sous-unité régulatrice avec laquelle ils s'hétérodimérisent, les membres de PtdIns 3-kinase de classe I sont répartis en deux sous-classes IA et IB. En bref, les isoformes p110 α , p110 β et p110 δ de la classe IA interagissent avec la sous-unité régulatrice p85, et sont principalement activées par la famille des récepteurs aux tyrosines kinases (RTK) et par les protéines RAS (Auger et al., 1989; Rodriguez-Viciana et al., 1994). L'isoforme p110 γ de la classe IB quant à elle interagit avec les sous-unités régulatrices p84 ou p101, et est activée par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) (Rommel et al., 2007). Une fois activées, les PtdIns 3-kinases de classe I produisent du PtdIns(3,4,5)*P*₃ à la membrane plasmique à partir du PtdIns(4,5)*P*₂, et PTEN catalyse la réaction inverse. L'accumulation de PtdIns(3,4,5)*P*₃ à la membrane permet alors le recrutement de AKT et PDK1, impliquées dans les voies de signalisation contrôlant le

cycle cellulaire, la survie, l'invasion, la croissance et l'angiogénèse (pour revue, voir Zhao et al., 2017). Ainsi, une fine régulation des taux de PtdIns(3,4,5) P_3 à la membrane est nécessaire, et un déséquilibre lié à une sur-activation des PtdIns 3-kinases de classe I ou à une inhibition de PTEN s'avère associé à de nombreuses formes de cancers (Fry, 2001), soulignant le rôle critique de ces enzymes dans la tumorigénèse.

➤ **Les PtdIns 3-kinases de classe II**

Des études *in vitro* ont montré que les trois isoformes de PtdIns 3-kinase de classe II (PI3KC2 α , PI3KC2 β , et PI3KC2 γ) sont capables de phosphoryler le PtdIns et le PtdIns(4) P mais pas le PtdIns(4,5) P_2 (Balla, 2013), cependant le rôle physiologique des PtdIns 3-kinases de classe II semble associé à la production de populations de PtdIns(3) P à des compartiments membranaires spécifiques (Maffucci et Falasca, 2014). En effet, selon une récente étude, la PI3KC2 α serait impliquée dans le trafic des cargos de recyclage, via la production d'une population de PtdIns(3) P à la membrane des endosomes précoces. Plus spécifiquement, cette population permettrait l'activation de la GTPase Rab11, puis le recrutement de MTM1. L'hydrolyse de ces PtdIns(3) P par MTM1 induirait alors la fission et le trafic des endosomes de recyclage (Campa et al., 2018). La production de PtdIns(3) P par la PI3KC2 β serait quant à elle impliquée dans la migration cellulaire, *via* l'activation de la GTPase Rac1 (Katso et al., 2006).

➤ **La PtdIns 3-kinase de classe III**

La PtdIns 3-kinase de classe III (ou VPS34) a initialement été clonée chez la levure *S. cerevisiae* (Schu et al., 1993) et a pour seul substrat le PtdIns, qu'elle phosphoryle en position D3 du cycle inositol pour produire du PtdIns(3) P (Stack et Emr, 1994). D'après de nombreux travaux, les VPS34 de levure et de mammifère (VPS34p et hVPS34 respectivement) sont impliquées dans le trafic des endosomes vers l'appareil de Golgi, dans l'endocytose ainsi que dans l'autophagie (pour revue, voir Balla, 2013). En particulier, hVPS34 s'associe avec une sérine kinase de 150 kDa (p150 ou hVPS15) ayant une activité régulatrice, et ce complexe génère du PtdIns(3) P à la membrane des endosomes précoces, où il interagit avec la GTPase Rab5 (Murray et al., 2002). L'activité du complexe hVPS34/hVPS15 dans l'autophagie est dépendante de son interaction avec la protéine Beclin-1 (l'orthologue mammifère de la protéine Atg6 chez la levure), qui permet le recrutement de régulateurs positifs (UVRAG, ATG14L) ou négatifs (Rubicon) de différentes étapes de la formation et de la maturation des autophagosomes (Matsunaga et al., 2009).

➤ **Les PtdIns 3-kinases dans le muscle squelettique**

La PI3KC2 β ainsi que la PtdIns 3-kinase de classe III (Vps34) sont fortement exprimées dans le muscle squelettique de souris, et sont considérées comme les sources principales de PtdIns(3)*P* (Reifler et al., 2014). La fonction de la PI3KC3 dans le muscle a été étudiée *in vivo* chez la souris grâce à la technologie Cre-lox. L'ablation génétique muscle spécifique de *Pik3c3* est viable, cependant les souris développent une dystrophie ainsi qu'une cardiomyopathie sévère, conduisant à la mort des individus au bout de deux mois (Reifler et al., 2014). Des analyses morphologiques et fonctionnelles ont révélé la présence de structures membranaires aberrantes, une expression anormale des gènes de l'autophagie ainsi qu'un défaut de la fonction lysosomale. Ces résultats mettent en évidence le rôle critique de la PI3KC3 dans la régulation de l'autophagie dans le muscle et dans l'intégrité de la structure musculaire. De manière intéressante, la souris déficiente en PI3KC2 β générée par Harada et al. (2005) est viable et fertile, et ne présente aucun phénotype particulier. De même, l'ablation génétique conditionnelle de *PIK3C2B* dans le muscle squelettique de souris ne provoque aucune altération de la fonction musculaire (Sabha et al., 2016). Etant donné qu'une accumulation de PtdIns(3)*P* a été reportée chez différents modèles de la XL-CNM (Dowling et al., 2012; Pierson et al., 2012; Amoasii et al., 2013), il était particulièrement intéressant de tester l'effet d'une réduction de sa production sur la fonction musculaire des souris *Mtm1* KO. Alors que l'ablation génétique de la *Pik3c3* empire le phénotype *Mtm1* KO, la déficience en PI3KC2 β restaure de manière spectaculaire la fonction musculaire et la survie des souris *Mtm1* KO (Sabha et al., 2016). Ces résultats suggèrent que MTM1 et la PI3KC2 β régulent une même population de PtdIns(3)*P* dans le muscle squelettique, et que l'accumulation de ces PtdInsPs liée à la déficience en MTM1 participe aux mécanismes pathologiques de la XL-CNM.

➤ **Les inhibiteurs de PtdIns 3-kinase**

Parmi les inhibiteurs pharmacologiques de PtdIns 3-kinase, la wortmannine et le LY294002 sont les molécules les plus utilisées en recherche, et permettent d'identifier l'implication d'une activité PtdIns 3-kinase dans un mécanisme cellulaire en agissant sur toutes les classes de manière non spécifique. Plus précisément, la wortmannine inhibe l'activité des PtdIns 3-kinases de classe I, de PI3KC2 β et PI3KC2 γ , et de la PtdIns 3-kinase de classe III avec une IC₅₀ (concentration causant 50 % d'inhibition) de l'ordre de 1-10 nM et l'isoforme de classe II PI3KC2 α avec une IC₅₀ de 400 nM. De même, le LY294002 inhibe toutes les classes avec une IC₅₀ de l'ordre de 1-50 μ M (Foster, 2003). Cependant l'utilisation de ces deux pan-inhibiteurs en recherche fondamentale et clinique est limitée respectivement par le fait qu'ils ne permettent pas de distinguer la fonction de chaque isoforme, et qu'ils présentent une certaine toxicité pour le foie (Ihle et al., 2004).

Ainsi depuis une dizaine d'années, les efforts conjugués de la recherche et de l'industrie pharmaceutique ont abouti au développement de nouvelles molécules spécifiques de certaines isoformes, telles que l'idelalisib, un inhibiteur de p110 δ (classe 1A) approuvé en Europe et aux USA dans le traitement contre le cancer. La 3-méthyladénine (3-MA) est une molécule classiquement utilisée comme inhibiteur de l'autophagie (Wu et al., 2010). Par ailleurs, à une concentration de 10 mM, la 3-MA inhibe l'activité PtdIns 3-kinase de classe I et de classe III, cependant des tests *in vitro* ont montré une plus grande spécificité pour la classe III avec une IC₅₀ d'environ 25 nM, contre 145-225 nM pour les isoformes p110 α et p110 β (Miller et al., 2010). Très récemment, un inhibiteur hautement spécifique de l'activité de p110 α a montré des résultats très prometteurs sur des patients atteints du syndrome de Cloves (Venot et al., 2018). Cette pathologie est due à des mutations mosaïques gain-de-fonction dans le gène *PIK3CA* et se caractérise par une croissance anarchique de certains organes voire certaines parties du corps. Dans leur étude, Venot et al. (2018) ont traité 19 patients avec la molécule BYL-719 (Novartis), encore en phase III d'essai clinique dans le cadre du cancer du sein, et ont montré une nette amélioration des symptômes chez tous les individus, sans effets secondaires notables.

c) *Les PtdInsPs de la membrane plasmique*

Le PtdIns(3,4,5)P₃

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le PtdIns(3,4,5)P₃ est produit à la membrane plasmique à partir du PtdIns(4,5)P₂, où il agit comme second messenger en recrutant de nombreux effecteurs cytosoliques contenant un domaine PH, tels que les sérine/thréonines kinases AKT/PDK1, et les protéines Rho, Rac, Btk et les GEFs (*guanidine nucleotide exchange factor*). Ainsi le recrutement de ces protéines à la membrane permet la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaires telles que l'inhibition de la mort cellulaire, la polymérisation de l'actine, la migration cellulaire et la sécrétion (voir Zhao et al., 2017).

Le PtdIns(4,5)P₂

Le PtdIns(4,5)P₂ est l'espèce majoritaire à la membrane plasmique, généré à partir du PtdIns(4)P grâce à la PtdIns(4)P 5-kinase. Le PtdIns(4,5)P₂ a été très étudié en tant que précurseur du PtdIns(3,4,5)P₃ et du second messenger Ins(1,4,5)P₃ (voir la section II de ce chapitre). Cependant, le PtdIns(4,5)P₂ est également impliqué dans de nombreux événements de remodelage membranaire incluant l'endocytose/l'exocytose, la phagocytose ou encore la migration cellulaire (pour revue, voir

Di Paolo et De Camilli, 2006). Par ailleurs le PtdIns(4,5) P_2 semble impliqué dans la biogénèse des tubules T, notamment en stabilisant l'ancrage de BIN1 à la membrane et en régulant positivement son activité de tubulation membranaire (Wu et Baumgart, 2014). Une récente étude a également démontré le rôle du PtdIns(4,5) P_2 dans la tubulation membranaire, à travers son interaction avec la dysferline (Hofhuis et al., 2017).

Par ailleurs, des interactions ont été identifiées entre le PtdIns(4,5) P_2 et les E-Syt (pour *Extended Synaptotagmin*) et sont impliquées dans la stabilisation des zones jonctionnelles entre la membrane plasmique et la membrane du RE. En effet, une étude a montré que les trois isoformes E-Syt1, E-Syt2 et E-Syt3 présentes chez le mammifère sont ancrées dans la membrane du RE et s'assemblent en hétéromères capables de contacter le PtdIns(4,5) P_2 de la membrane plasmique via leurs domaines C2 (Giordano et al., 2013). De plus, les auteurs de cette étude ont découvert une sensibilité de ce système au Ca^{2+} cytosolique, médiée par l'isoforme E-Syt1. De même, les junctophilines JP1 et JP2 présentes dans le muscle squelettique ancrent la membrane jonctionnelle du RS au PtdIns(4,5) P_2 de la membrane du tubule T *via* leurs motifs « MORN ». Ainsi ces protéines sont présumées favoriser l'interaction des partenaires du couplage EC *via* leur rôle dans la stabilisation de la triade. Dans ce contexte, on peut envisager qu'une réduction rapide du taux de PtdIns(4,5) P_2 à la membrane puisse moduler la fonction du couplage EC. Cette hypothèse a été testée durant mon travail de thèse et a fait l'objet d'une publication (Berthier et al., 2015).

Enfin, de nombreux travaux mettent en évidence un rôle du PtdIns(4,5) P_2 dans la régulation de protéines membranaires et en particulier de canaux ioniques (pour revue voir Hille et al., 2015). Cette dernière implication sera détaillée dans la section II de ce chapitre.

d) Le PtdIns(3,5) P_2 et le PtdIns(3) P

Les substrats des MTMRs PtdIns(3,5) P_2 et PtdIns(3) P sont présents à la membrane des endosomes précoces et tardifs, où ils permettent le recrutement d'effecteurs protéiques impliqués dans le trafic vésiculaire, *via* leur domaine PH, FYVE ou PX. Plus précisément, la localisation du PtdIns(3) P a été identifiée au niveau des endosomes précoces, où des protéines possédant un domaine FYVE telles que EEA1 et Hrs sont recrutées (Gillooly et al., 2000). Les effecteurs du PtdIns(3) P sont notamment impliqués dans le tri de protéines, dans le transport membranaire et dans la maturation endolysosomale. Le PtdIns(3,5) P_2 quant à lui est généré par la PtdIns 5-kinase PIKfyve à partir du PtdIns(3) P . L'utilisation d'une sonde fluorescente possédant un domaine ML1N, isolé à partir des canaux TRPML1 (pour *transient receptor potential Mucolipin 1*) a permis de localiser le PtdIns(3,5) P_2 au niveau des endosomes tardifs (Li et al., 2013). Le PtdIns(3,5) P_2 interagit avec les

TRPML1, des canaux cationiques localisés au niveau des endolysosomes (Balla, 2013), cependant le rôle physiologique du PtdIns(3,5) P_2 dans les cellules de mammifères et les conséquences d'une modulation de l'activité de MTMRs sur ce substrat restent énigmatiques.

Il est intéressant de noter que MTM1 régule les populations de PtdIns(3) P produits par les PtdIns 3-kinases de classe III et de classe II. Plus spécifiquement, une étude a mis en évidence que le PtdIns(3) P produit par la Pi3K68D, l'orthologue de la PtdIns 3-kinase de classe II chez la drosophile, est directement hydrolysé par *mtm*, et que la co-régulation de cette population participe au trafic endolysosomal et aux dynamiques du cortex cellulaire (Velichkova et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré chez le nématode *C. elegans* que l'orthologue de PtdIns 3-kinase de classe II PIKI-1 et la VPS-34 produisent séquentiellement deux populations de PtdIns(3) P à la membrane des phagosomes, et que MTM-1 antagonise l'activité de ces kinases de manière coordonnée afin de réguler la maturation des phagosomes (Lu et al., 2012).

II. Régulation du couplage EC par les PtdInsPs

a) **Le rôle de l'inositol triphosphate (Ins(1,4,5) P_3)**

L'Ins(1,4,5) P_3 est produit à partir de l'hydrolyse du PtdIns(4,5) P_2 par la phospholipase C (PLC). La fixation de ce second messager sur ses récepteurs (IP₃Rs) présents à la membrane du RS induit un signal calcique cytosolique impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (voir Berridge, 2009). La régulation de l'homéostasie calcique musculaire et du couplage EC par les PtdInsPs a initialement été explorée sur des myotubes en culture à travers la perspective que l'Ins(1,4,5) P_3 puisse contribuer à la libération de Ca²⁺ par le RS (Estrada et al., 2000; Jaimovich et al., 2000; Estrada et al., 2003; Eltit et al., 2006). Cette hypothèse tend cependant à être réfutée dans le muscle squelettique adulte par de nombreuses études montrant d'une part que le taux d'IP₃Rs est trop faible et d'autre part que les cinétiques du signal calcique généré par l'Ins(1,4,5) P_3 sont trop lentes en comparaison avec celui des RYRs pour contribuer aux transitoires calciques lors du couplage EC. Ceci a été confirmé en 2012 par Blaauw et son équipe qui ont montré que le signal calcique généré dans les myotubes C2C12 en réponse à l'injection d'Ins(1,4,5) P_3 , à la photolyse d'Ins(1,4,5) P_3 cagée ou encore à l'activation de la voie purinergique, n'était pas reproduit dans les fibres musculaires squelettiques différenciées. Il est important de mentionner cependant que si le signal calcique généré par l'Ins(1,4,5) P_3 ne contribue pas aux transitoires calciques lors du couplage EC, il n'est pas exclu qu'il soit impliqué dans d'autres mécanismes physiologiques. En effet, des travaux suggèrent l'existence d'un mécanisme de couplage excitation-transcription dans les fibres adultes, dans lequel une fréquence de stimulations à 10-20 Hz

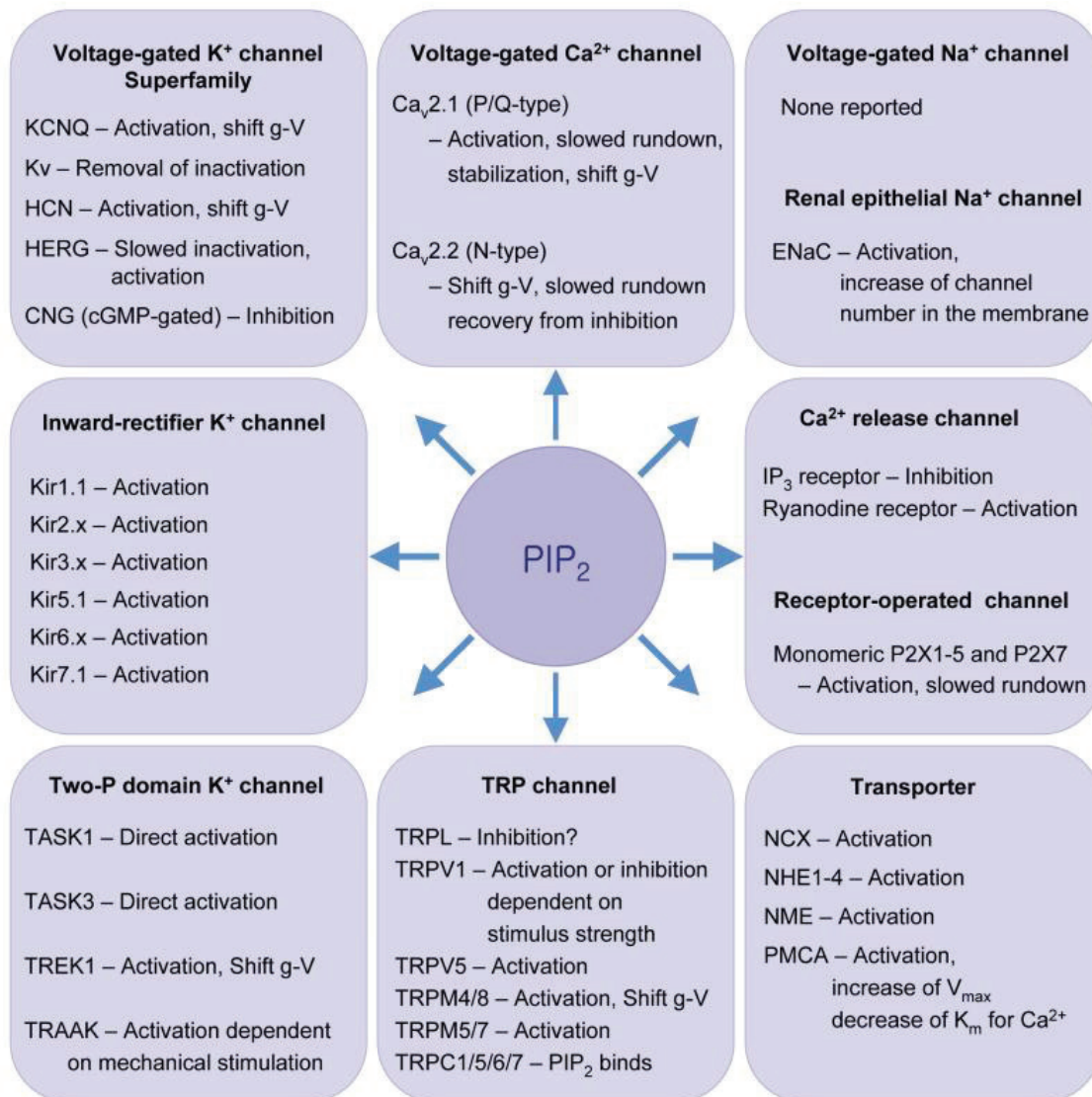


Figure 22. Canaux ioniques et transporteurs sensibles au PtdIns(4,5)P₂.

Les PtdInsPs régulent l'activité des canaux par activation (augmentation de la probabilité d'ouverture), par prévention du « rundown » (le rundown correspond à la réduction de la probabilité d'ouverture, souvent observée après excision de patch) ou par récupération du processus de désensibilisation. Shift g-V signifie que la dépendance au potentiel de la conductance est décalée par le PtdIns(4,5)P₂.

D'après Suh et Hille, 2008.

génère un transitoire calcique lent porté par les IP₃Rs, activant alors un programme de transcription déterminant le type de fibre (Casas et al., 2010; Jorquera et al., 2013). Une autre possibilité est que le signal calcique induit par l'Ins(1,4,5)P₃ puisse contribuer aux *sparks* calciques (voir Chapitre 1 – II - 2.3 - c). En effet, Tjondrokoesoemo et al. (2013) ont montré que les *sparks* déclenchés par chocs osmotiques étaient abolis en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de la PLC ou des IP₃Rs, et ont suggéré que dans ces conditions expérimentales, les *sparks* proviendraient de RYRs découplés activés par le signal calcique provenant des IP₃Rs voisins.

b) Canaux ioniques sensibles au PtdIns(4,5)P₂

La régulation des canaux ioniques par les PtdInsPs a principalement été étudiée au niveau de la membrane plasmique, notamment à l'aide de techniques d'électrophysiologie et d'imagerie de sondes fluorescentes et/ou visant à moduler rapidement les taux de PtdInsPs *via* la manipulation de phosphatases sensibles au potentiel (VSP ; *voltage sensing phosphatase*) par exemple. En particulier, de nombreuses études ont mis en évidence la capacité du PtdIns(4,5)P₂ à moduler l'activité de divers canaux ioniques présents à la membrane plasmique, incluant les canaux potassiques voltage-dépendants (K_V), rectifieurs entrants (Kir) et calcium-activés (K_{Ca}) ; les canaux calciques voltage-dépendants (Ca_v1.2 et Ca_v2.2) ; les canaux TRPs (pour *transient receptor potential*) ; les canaux purinergiques P2X ainsi que l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (pour revues, voir Suh et Hille, 2008; Logothetis et al., 2010; Hille et al., 2015) (Figure 22).

Dans la fibre musculaire squelettique, le sarcolemme et les tubules T sont riches en divers canaux et transporteurs potentiellement sensibles au PtdIns(4,5)P₂, tels que les canaux voltage-dépendants, rectifieurs entrants, les canaux potassiques Ca²⁺ activés et sensibles à l'ATP, les échangeurs Na⁺/Ca²⁺ et la PMCA. L'importance physiologique potentielle de la régulation de ces canaux et autres mécanismes de transport ionique de la membrane plasmique par le PtdIns(4,5)P₂ reste en large part inconnue. Par ailleurs, la possibilité d'une régulation directe du couplage EC par le PtdIns(4,5)P₂ a été testée dès les années 1990s par l'application de faibles concentrations de PtdIns(4,5)P₂ sur une préparation de vésicules membranaires de citernes terminales de RS et sur des RYRs incorporés en bicouche lipidique (Chu et Stefani, 1991). En effet, les auteurs de cette étude ont montré que la probabilité d'ouverture des RYRs est augmentée d'un facteur 2 à 12 en présence de 1 μM de PtdIns(4,5)P₂ du côté cytosolique, suggérant un rôle possible de modulateur direct du couplage EC. Cette possibilité a été étayée par d'autres travaux sur fibres musculaires pelées ainsi que sur vésicules fragmentées de RS. Plus précisément, Ogawa et Harafuji (1989) ont montré à l'aide d'une préparation de vésicules de citernes terminales de RS de grenouille taureau une augmentation dose

dépendante de la libération de Ca^{2+} par le RS en présence de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, alors que cet effet n'est pas observé en présence de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ ou d' $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. La même année, Kobayashi et son équipe ont montré que l'application de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ sur fibres musculaires pelées est capable de déclencher une contraction, alors que l' $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ reste sans effet (Kobayashi et al., 1989). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que la libération de Ca^{2+} par des vésicules de RS fragmentées en réponse à l'application de caféine est potentialisée en présence de faibles concentrations de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (10 μM), et qu'au-delà de 50 μM , le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ est suffisant pour déclencher des transitoires calciques. Dans une autre étude, Kobayashi et son équipe ont montré toutefois que l'efflux de Ca^{2+} par des vésicules de RS induit par de fortes concentrations de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (100 μM) n'est pas inhibé en présence de rouge de ruthénium et concluent que le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ active probablement des canaux calciques présents dans la membrane du RS, autres que RYR1 (Ohizumi et al., 1999). Dans l'ensemble, bien qu'une corrélation physiologique n'ait encore jamais été démontrée, ces résultats suggèrent que le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ puisse réguler la fonction des RYRs.

c) Régulation du couplage EC par les substrats de MTM1

La possibilité que le $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ et le $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ puissent réguler la fonction du couplage EC a été suggérée pour la première fois en 2009. En effet, cette année-là une étude a montré que les fibres musculaires de souris déficientes en MTM1 (*Mtm1* KO) présentaient une désorganisation des tubules T associée à une réduction de l'amplitude de l'efflux calcique, témoignant de l'importance cruciale de cette phosphatase dans la fonction du couplage EC du muscle adulte différencié (Al-Qusairi et al., 2009). Si la fonction exacte de MTM1 dans la régulation du couplage EC et de la signalisation calcique reste obscure, certains travaux suggèrent qu'une accumulation de $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ et de $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ puisse altérer la fonction du couplage EC dans les fibres *Mtm1* KO. Cette hypothèse est notamment supportée par les travaux de Shen et al. (2009) qui ont montré une perturbation du couplage EC dans les fibres musculaires du modèle murin déficient en MTMR14, une PtdInsP 3-phosphatase dont les substrats sont similaires à MTM1. De manière intéressante, la perfusion de $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ et de $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ dans des myotubes contrôles a révélé une altération de la signalisation calcique, et les auteurs ont par ailleurs montré que ces PtdInsPs avaient la capacité d'interagir directement et de réguler l'activité des RYR1 reconstitués en bicouches lipidiques (Shen et al., 2009). D'autre part, une étude menée au laboratoire a montré que l'accumulation (via micro-injection) de $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ ou de $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ dans des fibres musculaires contrôles conduisait à une diminution de l'amplitude maximale de libération de Ca^{2+} par le RS (Rodríguez et al., 2014). De

même, l'application de PtdIns(3)P, de PtdIns(3,5)P₂ ainsi que de PtdIns(5)P sur des fibres musculaires perméabilisées a révélé une réduction de la fréquence de *sparks* calciques, avec une absence totale de ces événements en présence de PtdIns(3,5)P₂ (Rodríguez et al., 2014).

La même année, Reifler et al. (2014) ont montré, à l'aide d'un modèle murin d'inactivation de la PtdIns-3 kinase de classe III, que l'absence de cette enzyme était responsable de l'apparition d'un phénotype de dystrophie musculaire. Ces résultats encouragent également l'hypothèse selon laquelle la modulation des taux de PtdIns(3)P et de PtdIns(3,5)P₂ joue un rôle critique dans le maintien de la fonction musculaire, à travers, au moins en partie, une régulation de la signalisation calcique et du couplage EC.

SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE

SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE

Les phosphoinositides (PtdInsPs) comptent sept espèces interconvertibles générées par des kinases et phosphatases, régulant leur taux et localisation sub-cellulaire. De récentes études soulignent l'implication des PtdInsPs dans différents processus cellulaires, dont le trafic membranaire et la régulation de canaux ioniques.

Le couplage excitation-contraction (EC) du muscle squelettique correspond à l'efflux de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (RS) suite à une dépolarisation de la membrane plasmique. La dépolarisation active les récepteurs des dihydropyridines (DHPR) présents dans les invaginations de la membrane plasmique (tubules - transverses, -T), provoquant l'activation des récepteurs à la ryanodine (RYRs) dans la membrane du RS. Ceci génère un efflux de Ca^{2+} vers le cytosol et donc une augmentation de Ca^{2+} (appelée transitoire calcique) qui déclenche la contraction.

L'implication des PtdInsPs dans la régulation du couplage EC et l'homéostasie calcique a été suggérée par Al-Qusairi et al., 2009, qui ont montré une altération de l'efflux de Ca^{2+} par le RS dans les fibres musculaires de souris déficientes en MTM1, une PtdInsP phosphatase déphosphorylant le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P₂.

Chez l'Homme, des mutations dans le gène *MTM1* causent la myopathie centronucléaire liée à l'X (ou myopathie myotubulaire), associée à une faiblesse musculaire fatale. De manière intéressante, une étude menée au laboratoire (Rodríguez et al., 2014) a montré qu'un excès de PtdIns(3)P et PtdIns(3,5)P₂ affecte l'homéostasie calcique dans des fibres musculaires normales, suggérant qu'une telle accumulation pourrait contribuer au défaut de couplage EC dans la myopathie myotubulaire.

Parmi les différents PtdInsPs, le PtdIns(4,5)P₂ réside principalement dans la membrane plasmique où il est connu pour réguler l'activité de canaux ioniques, en particulier des canaux calciques voltage-dépendants. Par ailleurs le PtdIns(4,5)P₂ peut être hydrolysé en Ins(1,4,5)P₃ et diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C (PLC). L'Ins(1,4,5)P₃ a la capacité de promouvoir la libération d'ions calcium des réserves du RS en interagissant avec le récepteur à l'Ins(1,4,5)P₃. Le PtdIns(4,5)P₂ représente ainsi un modulateur privilégié de l'homéostasie calcique cellulaire, et pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie calcique et le couplage EC du muscle squelettique.

Bien que le PtdIns(4,5)P₂ ne soit ni un substrat ni un produit de MTM1, des interactions potentielles existent entre MTM1 et les protéines DNM2 et BIN1, connues pour se lier et/ou interagir avec le PtdIns(4,5)P₂ dans la membrane des tubules T. De manière intéressante des mutations dans le gène codant pour *DNM2* sont également associées à la myopathie centronucléaire autosomique dominante (AD-CNM). L'ensemble de ces données met en évidence des liens étroits entre certains

PtdInsPs et les mécanismes de contrôle de la signalisation calcique musculaire avec des implications directes dans différentes myopathies centronucléaires.

Bien que l'implication de certains PtdInsPs dans la régulation de l'homéostasie calcique musculaire apparaisse donc de plus en plus probable, les mécanismes impliqués restent mal connus et controversés. Par ailleurs, si la thérapie génique a fourni récemment des preuves spectaculaires de son efficacité sur des modèles canins et murins de la myopathie myotubulaire (Childers et al., 2014), la possibilité que la modulation pharmacologique du métabolisme des PtdInsPs puisse aussi moduler l'homéostasie calcique et le couplage EC de manière à ouvrir une piste thérapeutique n'a jamais été testée.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a visé à comprendre les interactions fonctionnelles entre les PtdInsPs et l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique, avec un intérêt spécifique pour les implications pathologiques. L'étude du couplage EC et de l'homéostasie calcique s'est basée sur une combinaison d'électrophysiologie et de détection du calcium en microscopie confocale, sur fibres musculaires isolées de souris contrôles et transgéniques. Dans un premier temps, le rôle physiologique du PtdIns(4,5)P₂ dans la régulation du couplage EC dans le muscle squelettique a été étudié grâce à l'expression *in vivo* d'une PtdInsP-phosphatase dépendante du potentiel de membrane, la Ci-VSP. Mon deuxième objectif a été de réaliser une caractérisation détaillée des altérations de signalisation calcique au niveau cellulaire et sub-cellulaire dans les fibres musculaires du modèle murin de la myopathie myotubulaire (*Mtm1* KO) (Buj-Bello et al., 2002), et de tester l'effet de l'inhibition pharmacologique de la PtdInsP 3-kinase *in vitro* sur l'homéostasie calcique et *in vivo* sur la survie des souris. Enfin, mon troisième objectif a consisté à caractériser les propriétés du couplage EC et des signaux Ca²⁺ dans les fibres musculaires d'un modèle murin de l'AD-CNM (KI-Dnm2^{R465W}) (Durieux et al., 2010).

MATERIEL ET METHODES

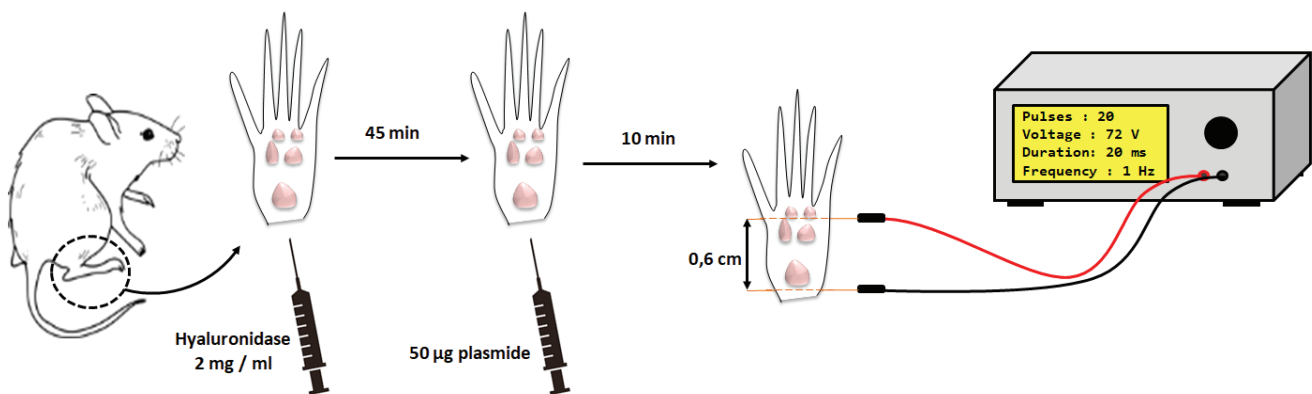


Figure 23. Schéma illustrant le protocole et le dispositif d'électroporation *in vivo*.

L'injection de hyaluronidase permet de dégrader le tissu conjonctif et de faciliter l'accès du plasmide aux fibres musculaires. Les courtes impulsions électriques provoquent des instabilités locales au niveau de la membrane des fibres musculaires, et ainsi la formation réversible de pores permettant l'entrée transitoire du plasmide dans la cellule.

MATERIEL ET METHODES

Durant mon travail de thèse, toutes les procédures et les expérimentations utilisant des animaux ont été réalisées dans le respect des lignes directives développées par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Université Claude Bernard Lyon 1, par le Ministère Français de l'Agriculture (décret 87/848) et par le groupe de travail relatif à la Directive Européenne 2010/63/EU, et sont conformes aux recommandations publiées dans *The Journal of Physiology and Experimental Physiology* (Grundy, 2015). Toutes les expérimentations ont été réalisées à température ambiante (20-22°C).

Les protocoles d'électroporation et de traitement pharmacologique des souris ont été approuvés par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Université Lyon 1 et par le Ministère en charge de l'enseignement supérieur et de la recherche (procédure APAFIS).

I. Modèles animaux et muscle utilisés

Des souris mâles de la souche OF1 (Oncins France 1), âgées de 4 à 6 semaines (Charles River Laboratory), ont été utilisées pour les protocoles relatifs à la *Section 1*. Des souris mâles sauvages (WT) et *Mtm1* KO (Buj-Bello et al., 2002) âgées de 23-25 jours ont été utilisées pour les expérimentations de la *Section 2*. Ces souris, de la lignée BS53d4 x xpas129, nous ont été fournies par le Dr Ana Buj-Bello (Généthon, Evry, France). Les expérimentations de la *Section 3* ont été réalisées sur des souris mâles sauvages et hétérozygotes KI-Dnm2^{R465W} (Durieux et al., 2010) de la lignée C57BL/6, âgées de 6 mois. Ces souris nous ont été fournies par le Dr Marc Bitoun (Institut de Myologie, Paris, France). Les muscles interosseux (IO) et *Flexor Digitorum Brevis (FDB)*, présents dans la plante des pattes arrière de souris, ont été prélevés pour l'ensemble de mes expérimentations sur fibre musculaire isolée.

II. Transfert de gènes *in vivo*

a) *La technique d'électroporation*

La transfection de plasmides a été réalisée par électroporation suivant une méthode identique à celle décrite par Lefebvre et al. (2011). En résumé, les souris ont d'abord été anesthésiées à l'isoflurane 3 % par inhalation à l'aide d'un évaporateur (Univentor 400 Anesthesia Unit; Univentor),

puis ont reçu une injection de 20 µL de hyaluronidase (2 mg/ mL NaCl 9 ‰) dans chaque patte arrière, afin de dégrader le tissu conjonctif et de faciliter l'accès du plasmide aux fibres musculaires.

Après 45 min d'incubation de l'enzyme et une seconde anesthésie, les souris ont reçu dans chaque patte une injection de 20 µL d'une solution saline NaCl 9 ‰ contenant 50 µg de plasmide. Les injections se font grâce à des seringues équipées d'aiguilles hypodermiques stériles (Terumo, Belgique).

Enfin, la concentration d'isoflurane a progressivement été portée à 4,5 % avant d'insérer dans la patte deux électrodes d'électroporation, espacées d'environ 0,6 cm. Ces électrodes correspondent à des aiguilles d'acupuncture plaquées-or (Millennia). L'électroporateur (BTX ECM 830 ; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) était réglé sur un programme de 20 pulses de 72 V (120V/cm), d'une durée de 20 ms avec une fréquence de 1 Hz (Figure 23). Les souris étaient ensuite installées dans la salle de quarantaine de l'animalerie du laboratoire et les muscles étaient prélevés après 7 à 10 jours d'expression.

b) Les plasmides utilisés

pIRES Ci-VSP GFP

Le plasmide d'expression de la VSP de *Ciona intestinalis* (Ci-VSP) (Murata et al., 2005) nous a été fourni gracieusement par le Pr. Y. Okamura (Osaka University, Suita, Japon). Ce plasmide, contenant la séquence cDNA de la Ci-VSP insérée dans le vecteur d'expression bicistronique p-IRES-EGFP, permet l'expression concomitante de la Ci-VSP et de l'EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*).

pEGFP-Dr-VSP

Le plasmide d'expression de la VSP de *Danio rerio* (Dr-VSP) (Hossain et al., 2008) nous a été fourni gracieusement par le Pr. Y. Okamura (Osaka University, Suita, Japon). Ce plasmide contient la séquence cDNA de la Dr-VSP étiquetée à la séquence de l'EGFP et permet l'expression de la protéine de fusion EGFP-Dr-VSP.

pmRFP-PLCδ1PH

Le plasmide d'expression contenant la séquence du domaine PH de la phospholipase C δ1 (PLCδ1 PH) étiquetée avec la mRFP (monomère Red Fluorescent Protein) nous a été fourni gracieusement par le Dr. T. Balla (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Protocole d'amplification

Afin d'amplifier ces plasmides, l'ADN plasmidique a été intégré dans des bactéries ultracompétentes XL10-Gold selon un protocole de transformation classique (Stratagene). Après une nuit d'incubation dans un milieu de sélection à la kanamycine, des colonies ont été prélevées puis mises à proliférer dans 4 mL de milieu LB liquide à 37°C la nuit suivante. Enfin, 500 µl de la solution bactérienne ont servi à ensemencer 500 mL de milieu LB liquide. Le culot bactérien obtenu à l'issue d'une nuit de prolifération a permis d'isoler les plasmides par utilisation d'un kit de biologie moléculaire (MegaPrep Endofree, Qiagen).

III. Prélèvement et digestion enzymatique des muscles IO et *FDB*

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale puis les muscles IO et *FDB* de chaque patte arrière ont été prélevés et incubés pendant 45 min à 1h à 37°C dans une solution de Tyrode contenant de la collagénase de type I à 2 mg/ml. Les muscles ont ensuite été stockés toute la nuit à 4°C dans une solution de Tyrode.

IV. Traitements pharmacologiques *in vitro*

Le traitement des fibres musculaires avec des inhibiteurs de PtdIns 3-kinase a été réalisé suivant trois stratégies : d'une part l'exposition brève (1 heure) de fibres musculaires à deux inhibiteurs non sélectifs vis-à-vis des différentes classes de PtdIns 3-kinase : la wortmannine (Sigma-Aldrich) et le 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride (LY294002 ; Echelon). Nous avons testé d'autre part si une exposition prolongée (> 12 heures) améliorerait l'effet de ces deux inhibiteurs. Enfin nous avons souhaité tester si l'exposition à la 3-méthyladénine (3-MA ; Sigma-Aldrich), un inhibiteur de l'activité PtdIns -3 kinase de classe III, était capable de reproduire l'effet des inhibiteurs non sélectifs.

Pour le traitement de courte durée aux inhibiteurs non sélectifs, les fibres musculaires isolées de *FDB* et d'IO de souris contrôles et *Mtm1* KO ont été incubées pendant une heure dans la solution externe d'expérimentation électrophysiologique contenant soit 0,1 µM wortmannine + 50 µM LY294002 dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO) à 0,5 %, soit du DMSO à 0,5 %. Pour le traitement long, les muscles IO ont été incubés dès la fin de la dissociation enzymatique jusqu'à l'expérimentation, soit une durée minimale de 12 heures, dans une solution de Tyrode contenant le traitement 0,1 µM wortmannine + 50 µM LY294002 dans du DMSO à 0,5 %, ou le traitement contrôle (0,5 % DMSO).

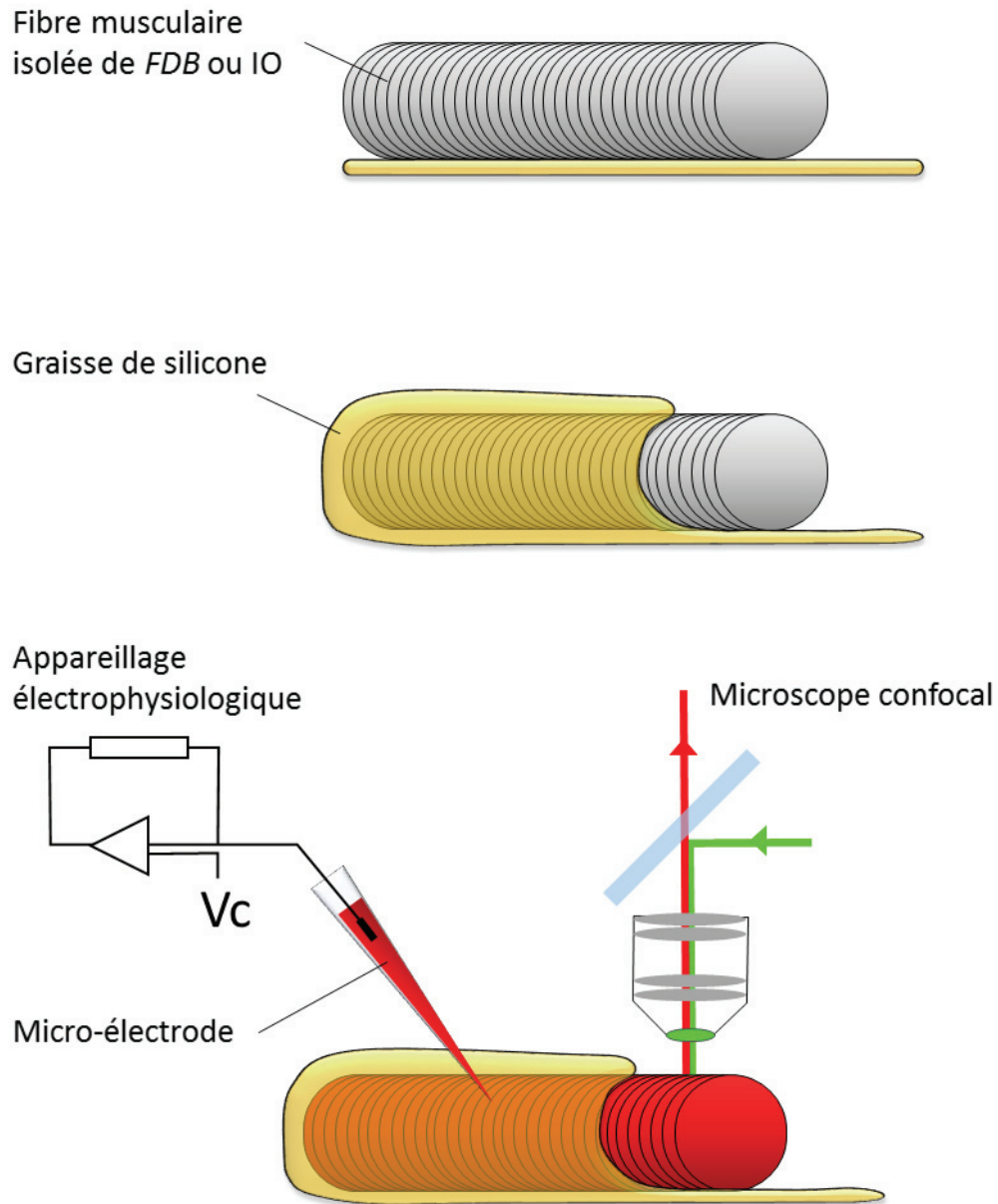


Figure 24. Schéma illustrant le silicone clamp et le dispositif expérimental permettant l'étude du couplage EC.

Après la digestion enzymatique des muscles IO et *FDB*, les fibres sont dissociées mécaniquement dans une chambre dont le fond est recouvert d'une couche de silicone. La fibre musculaire isolée est ensuite recouverte à 80 % de silicone, puis une micro-électrode est insérée dans la fibre, sous la couche de silicone. Elle contient la solution de dialyse comportant le milieu intracellulaire, un indicateur calcique fluorescent (rhod-2) et un chélateur calcique (EGTA). Les protocoles de *voltage clamp* sont démarrés après 30 minutes d'équilibration, et la fluorescence de l'indicateur calcique est enregistrée simultanément.

Pour l'inhibition sélective de l'activité PtdIns 3-kinase de classe III, les muscles FDB ont été incubés pendant une heure dans la solution externe d'expérimentation électrophysiologique contenant 1 mM de 3-MA et ce milieu a été maintenu pendant toute l'expérimentation. Le milieu interne dialysé était également complété de 3-MA à 1 mM dans cette série d'expérimentations.

V. Electrophysiologie

a) *La technique de Silicone Clamp*

La technique de *silicone clamp* est une technique particulière de *voltage clamp*, développée et utilisée en routine au laboratoire (Jacquemond, 1997; Collet et al., 2004) permettant de contrôler finement le potentiel de membrane de fibres musculaires isolées. En effet les fibres musculaires de *FDB* et d'*IO* de souris mesurent entre 0,3 et 1 mm de long et ont un diamètre compris entre 20 et 50 μm , ce qui rend difficile le contrôle uniforme du potentiel de membrane. Pour contourner ce problème, différentes techniques de *voltage clamp* ont été mises au point, telles que l'utilisation de deux micro-électrodes ou encore le montage d'une fibre disséquée dans un système de compartiments isolés électriquement (*vaseline-gap*). Cependant ces techniques présentent l'inconvénient d'être stressantes pour la fibre ou complexes à mettre en place. La technique de *silicone clamp* consiste à réduire artificiellement la taille de la fibre en la recouvrant partiellement avec une graisse de silicone (Figure 24). Ainsi l'application d'un potentiel et l'enregistrement des courants sont restreints à la région non recouverte de la fibre, et peuvent être réalisés avec une seule micro-électrode.

b) *Dispositif d'enregistrement*

Les muscles digérés ont été placés dans une chambre de culture dont le fond a été recouvert d'une fine couche de graisse silicone. La cuve est remplie avec un milieu de culture contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Les fibres musculaires ont alors été dissociées par trituration mécanique. La technique d'électrophysiologie appliquée aux fibres isolées s'appelle le *Silicone Clamp* (Jacquemond, 1997) en configuration de potentiel imposé : les fibres ont été recouvertes à $\sim 80\%$ par une couche de silicone, de manière à favoriser un contrôle de potentiel uniforme dans la partie non recouverte. Le milieu de culture a été remplacé par une solution externe dont la composition limite les flux de sodium, potassium et chlorure, augmentant ainsi la résistance de membrane et

favorisant également le contrôle du potentiel. L'extrémité d'une micro-pipette, étirée à partir d'un capillaire de verre, a ensuite été insérée dans la fibre, sous la couche de silicone. La micro-pipette était remplie d'une solution de composition proche du milieu intracellulaire comportant un marqueur fluorescent sensible au calcium, le rhod-2, ainsi que de l'EGTA qui est un chélateur calcique permettant d'éviter la contraction. La résistance de la micro-pipette était comprise entre 2 et 4 MΩ. Une période de 30 min est nécessaire à la dialyse intracellulaire de cette solution, pendant laquelle la cellule est maintenue à -80 mV. A la fin du temps de dialyse, une compensation analogique était ajustée afin de réduire la résistance série et ainsi permettre un meilleur contrôle du potentiel. La micro-pipette et l'électrode de référence dans le bain extracellulaire sont reliées à un amplificateur de patch-clamp RK400 (Bio-logic, France), connecté à un convertisseur AD/DA (Digidata 1440A, Molecular Devices, CA, USA) contrôlé par un ordinateur doté du logiciel pCLAMP (Molecular devices, CA, USA), permettant l'application de potentiels de commande et l'acquisition des signaux électrophysiologiques. La fréquence d'échantillonnage était réglée à 10 kHz durant l'acquisition.

c) Analyse des courants I_{Ca}

Les traces de courants calciques ont été analysées avec Origin 7/8 et Clampfit (pCLAMP 10, Molecular Devices, CA, USA). Brièvement, le courant de fond s'écoulant à travers la membrane avant la première stimulation a été moyenné et cette valeur a été soustraite à la totalité de la trace. Une impulsion hyperpolarisante de -20 mV (prépulse) était appliquée en début de chaque protocole dans le but de corriger la composante passive du courant à travers la membrane, dont l'évolution est linéaire en fonction du potentiel. Après soustraction de la fuite au courant calcique (I_{Ca}) enregistré pendant le pulse, l'amplitude maximale du courant entrant a été mesurée puis normalisée par rapport à la capacité membranaire. On parle alors de densité de courant, exprimée en A/F. En effet ce paramètre reflète la surface membranaire enregistrée et correspond à $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. La capacité membranaire était estimée à partir de l'intégrale du courant induit par la repolarisation en fin de prépulse. Enfin, la dépendance au potentiel moyenne de la densité de courant calcique a été ajustée avec l'équation suivante :

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

où $I(V)$ correspond à l'amplitude maximale de la densité de courant pour un potentiel donné (I), G_{\max} correspond à la conductance maximale, V_{rev} et $V_{0.5}$ correspondent respectivement aux potentiels d'inversion et de demi-activation, et k correspond à la pente.

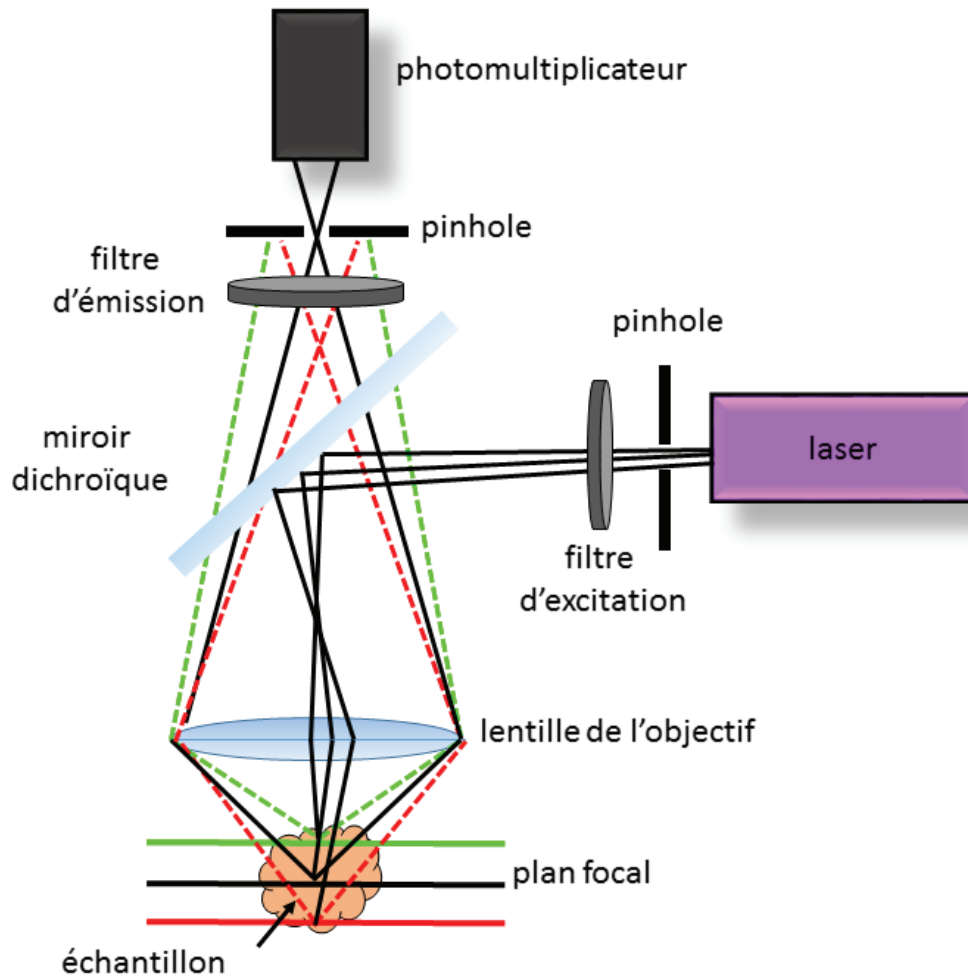


Figure 25. Schéma illustrant le principe du microscope confocal à balayage laser.

Le laser émet un faisceau lumineux monochromatique qui passe à travers un premier *pinhole* (« trou d'aiguille ») puis un filtre d'excitation avant d'être réfléti par le miroir dichroïque et condensé sur un point précis de l'échantillon par la lentille de l'objectif. La fluorescence émise par l'échantillon provient du plan focal et des régions adjacentes, et traverse le miroir dichroïque puis un filtre d'émission. La présence d'un deuxième *pinhole* dans le plan d'image intermédiaire élimine la fluorescence parasite, et seule la fluorescence provenant du plan focal est captée par le photomultiplicateur.

VI. Microscopie confocale à balayage laser

a) *Principe*

La microscopie confocale à balayage laser est une technique de microscopie optique dans laquelle le signal émis par des molécules fluorescentes est collecté dans un volume très restreint appelé « plan focal » (400 nm de profondeur), offrant ainsi une bien meilleure résolution que la microscopie conventionnelle à champ large.

Dans ce système, la source lumineuse d'excitation provient d'un laser (Hélium-Néon ou Argon) et est dirigée sur un point précis de l'échantillon (Figure 25). Plus précisément, à la sortie du laser le faisceau lumineux passe à travers un diaphragme appelé « pinhole » (trou d'aiguille) puis par un cristal AOTF (pour *acousto-optic tunable filter*) dont le rôle est de moduler l'intensité et/ou la longueur d'onde du signal d'excitation. Le signal filtré est ensuite reflété sur un miroir dichroïque puis la lentille de l'objectif condense le faisceau sur un point précis de l'échantillon. Les fluorophores du plan focal mais aussi des plans adjacents sont alors excités et émettent une fluorescence dans une gamme de longueurs d'onde supérieure à celle de l'excitation. Les photons émis par l'échantillon sont collectés par l'objectif, passent à travers le miroir dichroïque puis sont transmis vers un filtre d'émission. Le signal filtré est enfin capté par un photomultiplicateur (PMT) qui convertit les photons en électrons et est amplifié (gain) selon les paramètres de réglage. En amont du PMT, la présence d'un deuxième pinhole placé sur le plan d'image intermédiaire (d'où le terme confocal) permet d'éliminer la fluorescence parasite des plans adjacents et de ne sélectionner que celle provenant du plan focal, améliorant ainsi le ratio signal/bruit.

L'échantillon est balayé point par point dans le plan x,y grâce à deux miroirs motorisés placés dans le trajet optique du faisceau d'excitation. L'image confocale est donc une image de synthèse reconstituée point par point.

b) *Dispositif d'enregistrement et réglages*

Durant ma thèse, les images de fluorescence ont été acquises avec un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 5 Exciter (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) équipé d'un laser Argon multi-raies (458-488-514 nm), de deux lasers Hélium-Néon (543 et 633 nm) et d'un objectif à immersion à huile ($\times 63$, d'ouverture numérique 1,4). La puissance du laser ainsi que le gain ont été ajustés pour tous nos enregistrements afin d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit.

Les images ont été acquises en mode « balayage de ligne » ou en mode « XY ». Le mode balayage de ligne fournit une information dans l'espace (x) et dans le temps (t) puisque la même ligne est scannée de manière séquentielle, avec une vitesse maximale de 1,145 ms / ligne de 51 μm . Ce mode a donc été privilégié pour la détection et l'étude cinétique d'événements localisés et très courts tels que les *sparks* (fluo-4 AM) ou encore pour caractériser les propriétés spatio-temporelles des transitoires calciques (rhod-2). Plus en détail, pour la détection des transitoires calciques la fluorescence du rhod-2 a été mesurée le long d'une ligne orientée suivant l'axe longitudinal de la fibre et le début de l'enregistrement était synchronisé avec le déclenchement du protocole électrophysiologique par le logiciel Clampex (pCLAMP 10, Molecular Devices, CA, USA). Afin de limiter l'extinction de fluorescence des fluorochromes (*photobleaching*) ainsi que la phototoxicité, la position de cette ligne était systématiquement modifiée entre deux enregistrements.

Le mode « XY » a été utilisé pour l'acquisition d'images en deux dimensions (512×512 pixels), permettant ainsi la visualisation du réseau de tubules T (di-8-ANEPPS) ou de la distribution des sondes pIRES Ci-VSP GFP et pmRFP-PLC δ 1PH. Les images du di-8-ANEPPS ont été moyennées 4 fois afin de réduire le rapport signal/bruit. La détection de *sparks* calciques a été réalisée soit à partir de séquences de 30 images x,y consécutives non moyennées (989 ms par image), soit comme indiqué ci-dessus à partir d'images x,t .

c) *Les sondes calciques*

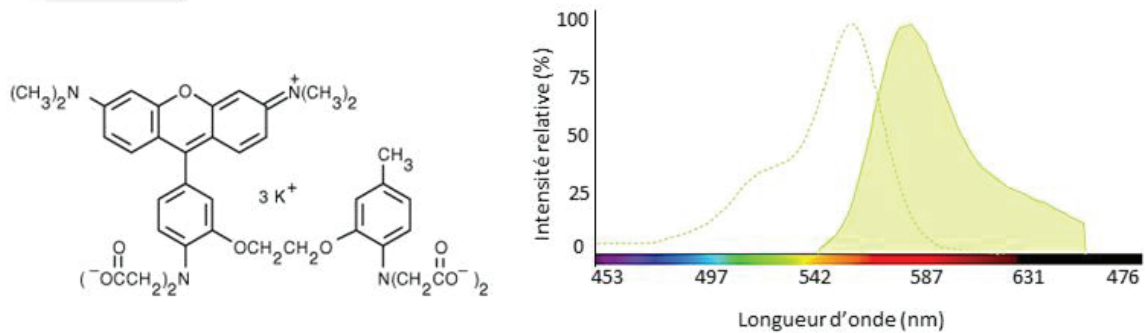
La détection de signaux calciques intracellulaires repose sur une large gamme d'indicateurs calciques, dont l'affinité pour le Ca^{2+} mais aussi les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont diverses. Ainsi les propriétés de chaque indicateur sont à prendre en compte en fonction de l'événement que l'on souhaite observer. En particulier, l'indicateur doit avoir une affinité proche du niveau de Ca^{2+} que l'on veut mesurer.

L'affinité d'un indicateur pour le Ca^{2+} peut se traduire par la constante de dissociation à l'équilibre (K_d) qui est caractéristique de sa sensibilité aux variations de Ca^{2+} :

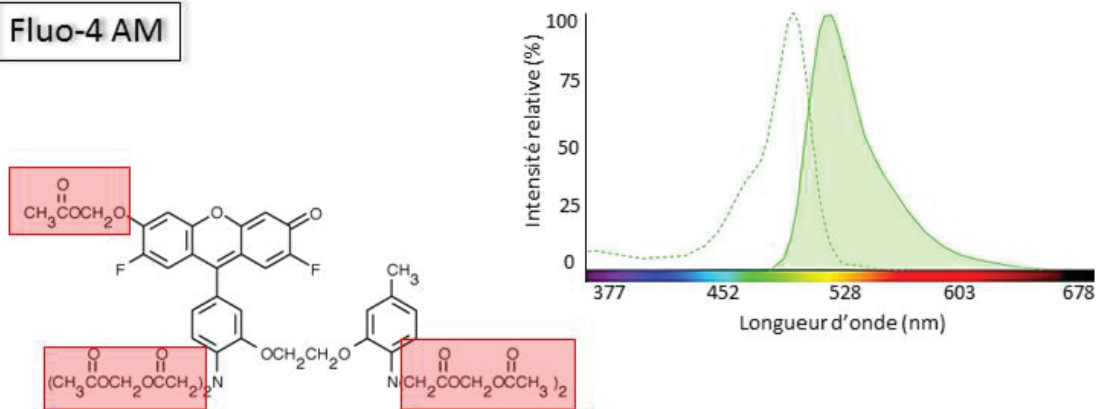
$$K_d = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \times [\text{Indicateur}]}{[\text{Ca-Indicateur}]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

Plus simplement le K_d se définit comme la concentration de Ca^{2+} pour laquelle 50 % des molécules d'indicateur sont occupées. Ainsi, plus le K_d d'un indicateur est grand, plus son affinité pour le Ca^{2+} est faible. Durant ma thèse j'ai utilisé le rhod-2 et le fluo-4 pour mesurer respectivement

Rhod-2



Fluo-4 AM



 Groupement acétoxyméthylester

Figure 26. Structures chimiques et spectres d'excitation et d'émission des indicateurs calciques rhod-2 et fluo-4 AM.

Les spectres d'excitation et d'émission sont représentés en pointillés et en trait plein respectivement. Le pic d'excitation du rhod-2 est à une longueur d'onde de 543 nm et son pic d'émission se situe vers 560 nm.

Le pic d'excitation du fluo-4 AM est à une longueur d'onde de 495 nm et son pic d'émission se situe vers 510 nm.

Les groupements acétoxyméthylester du fluo-4 AM permettent à la sonde de traverser spontanément les membranes. Dans le cytosol de la cellule, ils sont clivés par les estérases endogènes.

D'après <http://www.thermofisher.com>

les transitoires calciques déclenchés par des dépolarisations et la présence d'événements calciques élémentaires spontanés dans les fibres musculaires isolées.

Rhod-2 :

Le rhod-2 est un indicateur calcique fluorescent qui présente l'avantage d'être excité et d'émettre dans une gamme de longueurs d'onde visibles (Figure 26). Son intensité de fluorescence varie d'un facteur 100 entre la forme libre et complexée au Ca^{2+} offrant ainsi un bon rapport signal/bruit et son affinité est relativement faible pour le Ca^{2+} (K_d compris entre 1 et 2 μM , Escobar et al., 1997). Sa réponse est suffisamment rapide pour suivre avec fiabilité les cinétiques de variations de Ca^{2+} cytosoliques déclenchées dans des fibres musculaires en réponse à des dépolarisations imposées (voir Royer et al., 2008). Cependant, contrairement à des indicateurs ratiométriques, l'utilisation de cette sonde ne permet pas la quantification absolue de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Pour la quantification de l'amplitude des transitoires, la fluorescence F a été normalisée par la fluorescence basale F_0 avant stimulation et les variations de Ca^{2+} ont été calculées suivant l'équation décrite par Cheng et al. (1993) :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{K_d(F/F_0)}{(K_d/[\text{Ca}^{2+}]_{i \text{ rest}} + 1) - (F/F_0)}$$

Dans nos conditions expérimentales, le rhod-2 a été dialysé dans les fibres musculaires isolées pendant 30 min *via* la micro-pipette de *voltage-clamp*. Les images de la fluorescence du rhod-2 ont été obtenues avec une excitation à 543 nm (laser Hélium-Néon) tandis que la détection de fluorescence s'effectuait à des longueurs d'onde supérieures à 560 nm.

Fluo-4 AM :

Le fluo-4 est un indicateur calcique fluorescent présentant également un spectre d'excitation et d'émission dans les longueurs d'onde visibles et dont l'intensité de fluorescence varie aussi de plus de 100 fois lorsqu'il est complexé au Ca^{2+} . Le fluo-4 AM possède des groupements acétoxyméthylester (AM) (Figure 26) qui rendent la sonde inactive et lui confèrent la propriété d'être liposoluble et donc de traverser spontanément la membrane plasmique. Dans le cytosol de la cellule, ils sont clivés par les estérases endogènes et la sonde devient alors sensible au calcium, capable de le chélater. Le fluo-4 se lie au Ca^{2+} avec un K_d de 0,345 μM , ce qui le rend sensible à de faibles variations de Ca^{2+} proches de la concentration de repos. Ceci, associé à un très fort rendement de

fluorescence en fait un indicateur de choix pour la mesure d'événements calciques locaux comme les *sparks*.

Dans nos conditions expérimentales, le fluo-4 AM était stocké à 1 mM dans du DMSO. Les fibres musculaires isolées ont été incubées pendant 30 min dans une solution de Tyrode + 10 μM fluo-4 AM puis le milieu extracellulaire était rincé avant les enregistrements pour éliminer la sonde résiduelle. Les images de la fluorescence du fluo-4 ont été obtenues avec une excitation à 488 nm (laser Argon) tandis que la détection de fluorescence s'effectuait à des longueurs d'onde supérieures à 505 nm.

d) Marquage du réseau de tubules transverses

Durant mon travail de thèse, j'ai utilisé le di-8-ANEPPS pour analyser l'organisation structurale du système tubulaire transverse. En effet, le di-8-ANEPPS est une sonde qui fluoresce lorsqu'elle s'incorpore dans les environnements lipidiques comme les membranes biologiques, et permet ainsi d'étudier la densité des tubules T. Ses spectres d'excitation et d'émission sont larges, avec des pics à 470 nm et 588 nm respectivement dans la membrane du tubule T (DiFranco et al., 2005).

Le di-8-ANEPPS a de plus la propriété d'être potentiométrique, c'est-à-dire que sa fluorescence varie linéairement en fonction du potentiel de membrane. La variation relative de la fluorescence de la sonde a été mesurée au laboratoire dans la fibre isolée de *FDB* de souris et s'approche de 25% pour un ΔV de 100 mV (Berthier et al., 2015).

Dans nos conditions expérimentales, les fibres musculaires isolées de *FDB* de souris ont été incubées pendant 1 h dans une solution de Tyrode contenant 20 μM de di-8-ANEPPS. Les images de la fluorescence du di-8-ANEPPS ont été obtenues avec une excitation à 488 nm (laser Argon) tandis que l'émission de fluorescence était collectée à des longueurs d'onde supérieures à 505 nm.

VII. Analyses des images de fluorescence

Les analyses des images de fluorescence ont été réalisées avec les logiciels Image J (National Institutes of Health (NIH), USA) et Origin 7/8 (Originlab, Northampton, MA, USA).

a) Calcul du flux calcique

L'analyse de la variation de fluorescence du rhod-2 au cours du temps nous a permis d'estimer le flux calcique, qui correspond à la vitesse d'extrusion du Ca^{2+} du RS vers le cytoplasme.

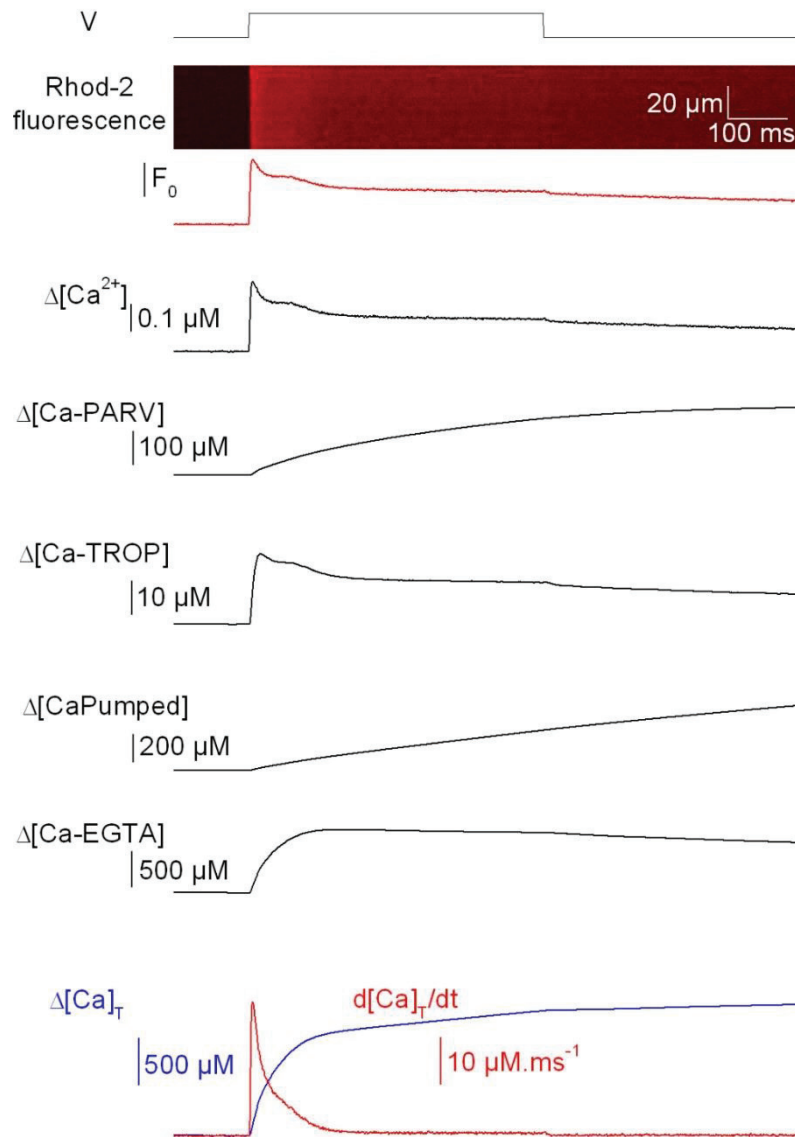


Figure 27. Calculs des variations de calcium au cours du temps à partir du signal de fluorescence du rhod-2.

Le signal du rhod-2 est moyenné le long de la ligne de scan puis normalisé par rapport à la fluorescence basale avant la dépolarisation (F/F_0). La variation de $[Ca^{2+}]$ libre au cours du temps ($\Delta[Ca^{2+}]$) est calculée à partir de ce signal avec une valeur de K_d du rhod-2 pour le Ca^{2+} de $1,2 \mu M$. Les traces suivantes illustrent la variation de la concentration de Ca^{2+} lié à ses différents sites intracellulaires : la parvalbumine, la troponine C et l'EGTA, qui représente le tampon majoritaire dans notre système. Ces variations sont calculées grâce aux valeurs des constantes de vitesse d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) ainsi que de la concentration de sites intracellulaires disponibles de chaque tampon. La recapture du Ca^{2+} par la SERCA est également estimée grâce à la valeur de sa constante de dissociation (K_d) et de sa vitesse de recapture maximale. La somme de ces variations correspond à la variation de $[Ca^{2+}]$ totale ($\Delta[Ca]_T$). Le flux de Ca^{2+} du RS vers le cytoplasme ($d[Ca]_T/dt$) est calculé à partir de la dérivée de $\Delta[Ca]_T$.

La fluorescence d'un indicateur dépend de plusieurs facteurs incluant l'intensité d'excitation, la concentration de l'indicateur et l'épaisseur de la préparation. Afin de s'affranchir de la variation de ces paramètres, la fluorescence du signal « F » est normalisée par la fluorescence basale « F₀ » avant la stimulation. La variation de [Ca²⁺] libre (dCa²⁺) est alors calculée à partir de F/F₀ suivant l'équation donnée plus haut. La variation de Ca²⁺ total (dCa_T) est ensuite estimée grâce à un modèle prenant en compte la redistribution du Ca²⁺ sur ses différents tampons intracellulaires et sa recapture par le RS (Collet et al., 2004) (Figure 27). Brièvement, ce modèle prend en compte :

- La fixation du Ca²⁺ et du Mg²⁺ à la parvalbumine (PV), avec une concentration totale de sites PV_{total} = 2 000 μM, une constante de vitesse d'association pour le Ca²⁺ (k_{on, CaPV}) = 0,125 μM⁻¹.ms⁻¹, une constante de vitesse de dissociation pour le Ca²⁺ (k_{off, CaPV}) = 0,0005 μM⁻¹.ms⁻¹, une constante de vitesse d'association pour le Mg²⁺ (k_{on, MgPV}) = 3,3.10⁻⁵ μM⁻¹.ms⁻¹ et une constante de vitesse de dissociation pour le Mg²⁺ (k_{off, MgPV}) = 3,003.10⁻³ μM⁻¹.ms⁻¹.
- La fixation du Ca²⁺ à la troponine C (TnC), avec une concentration totale de sites TN_{total} = 250 μM, une constante de vitesse d'association pour le Ca²⁺ (k_{on, CaTN}) = 57,5.10⁻³ μM⁻¹.ms⁻¹ et une constante de vitesse de dissociation pour le Ca²⁺ (k_{off, CaTN}) = 0,115 μM⁻¹.ms⁻¹.
- La fixation du Ca²⁺ sur l'EGTA, avec une constante de vitesse d'association pour le Ca²⁺ (k_{on, CaEGTA}) = 0,036 μM⁻¹.ms⁻¹ et une constante de vitesse de dissociation pour le Ca²⁺ (k_{off, CaEGTA}) = 0,056 μM⁻¹.ms⁻¹. La concentration totale de sites EGTA_{total} disponibles dans la cellule a été évaluée à 80 % de la concentration d'EGTA total libre dans la solution de dialyse intracellulaire, en estimant à 80 % le niveau d'équilibration de cette solution dans la fibre après 30 min de dialyse. Dans ces conditions, l'EGTA est le site majoritaire de fixation du Ca²⁺.
- La recapture du Ca²⁺ dans le RS, dont la vitesse est supposée proportionnelle à l'occupation relative des sites de la SERCA par le Ca²⁺ avec une constante de dissociation pour le Ca²⁺ (K_{d CaPump}) = 2 μM et une vitesse maximale de recapture estimée à 10 μM.ms⁻¹.

Pour finir, le flux de Ca²⁺ à travers le RS est estimé à partir du calcul de la dérivée au temps de la variation de Ca²⁺ total (d[Ca]_T/dt).

b) Calcul de la densité de tubules T

L'analyse de la densité de tubules T a été réalisée pour chaque fibre à partir de deux images de di-8-ANEPPS prises dans des régions distinctes. Pour chaque image, une sélection la plus large possible du réseau de tubules T et excluant le marquage sarcolemmal a été faite. Un seuillage automatique basé sur la méthode Otsu a été réalisé afin de générer une image binaire puis la fonction « skeletonize » du logiciel Image J a permis de délimiter le réseau de tubules T. Enfin, la

densité de tubules T a été déterminée pour chaque fibre en faisant le ratio de l'aire occupée par la sélection du réseau de tubules T sur l'aire totale de la région analysée.

c) Analyse des sparks

L'analyse des sparks calciques a été réalisée selon la méthode décrite par Csernoch et al. (2008). En bref, la sélection d'une région de la fibre pour l'analyse a été définie sur la première image x,y et appliquée au reste de la série. La fluorescence basale moyenne mesurée sur la première image a été soustraite à chaque pixel de chacune des 30 images de la série, puis les images ont été soumises à une méthode de traitement du signal (la méthode des ondelettes stationnaires) permettant de corriger le bruit de fond et de détecter les événements calciques élémentaires. L'amplitude et la largeur à mi-hauteur (FWHM ; *full width at half-maximum*) des sparks ont alors été calculées. Plus précisément, deux valeurs de FWHM ont été calculées, dans l'axe longitudinal et transversal de la fibre. Pour l'analyse des images en mode balayage de ligne, le signal de fluorescence a été normalisé par rapport à la fluorescence basale, puis l'utilisation d'un algorithme de détection d'événements (Szabó et al., 2010) a permis l'analyse automatique de l'amplitude (F/F_0), de la FWHM et de la durée des événements identifiés. Cette analyse a été réalisée dans le laboratoire du Pr. Csernoch (Université de Debrecen, Hongrie).

VIII. Solutions

a) Tyrode

La solution de Tyrode contient (en mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES. Le pH est ajusté à 7,2 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH).

b) Solution extracellulaire

La solution utilisée pour les enregistrements de *silicone-clamp* est une solution pauvre en chlore et dépourvue de Na⁺ et K⁺, et permet ainsi d'enregistrer uniquement les courants calciques. Elle se compose (en mM) de 140 tétraéthylammonium (TEA)-MeSO₃ ; 2,5 CaCl₂, 2 MgCl₂ ; 10 TEA-HEPES; 0,002 tétrodotoxine (TTX); 1 4-aminopyridine (4-AP). Le pH est ajusté à 7,2 avec de l'acide

méthanesulfonique (MeSO₃). Le TEA et la 4-AP agissent comme des bloqueurs des canaux potassiques. La TTX est un bloqueur sélectif des canaux sodiques.

c) Solution intracellulaire

La solution de dialyse mime le milieu intracellulaire. Sa composition de base est (en mM) 120 K-glutamate ; 5 Na₂-ATP ; 5 Na₂-phosphocreatine ; 5,5 MgCl₂ ; 5 glucose et 5 HEPES. Le pH est ajusté à 7,2 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH). Elle contient de plus l'indicateur calcique rhod-2 (0,1 mM) et 10 à 15 mM d'acide bis-(aminoéthyl)-glycoléther-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA). Comme mentionné précédemment, l'utilisation du chélateur calcique EGTA a pour but de bloquer la contraction et de simplifier l'estimation du flux calcique du RS. L'EGTA est saturé à 40 % avec du CaCl₂ de manière à maintenir une concentration en calcium libre proche de 100 nM.

IX. Traitement pharmacologique *in vivo*

Les solutions d'injections étaient préparées dans des conditions stériles. La wortmannine était dissoute dans du DMSO à 4 % dans une solution saline NaCl 9 ‰, avec une concentration finale de 200 µg/ml. La solution contrôle contenait du NaCl 9 ‰ avec du DMSO à 4 %. Le mode d'administration et la dose de wortmannine ont été déterminés selon les données de la littérature référant l'innocuité de cette drogue et les effets bénéfiques dans des conditions pathologiques chez la souris (Ohta et al., 2006; Teranishi et al., 2009).

L'étude pharmacologique *in vivo* a été réalisée sur 19 souris WT et 21 souris *Mtm1* KO, subdivisées en deux groupes recevant ou non le traitement à la wortmannine. Plus précisément, les souris traitées et non traitées étaient pesées trois fois par semaine à la suite de quoi elles recevaient respectivement une injection intra-péritonéale de wortmannine (à raison de 2 mg/kg) ou de solution contrôle. Une observation de routine était effectuée tous les jours. Une perte de poids supérieure à 15 % entre deux séances d'injection, des signes de souffrance de l'animal ou encore la perte totale de mobilité étaient utilisés comme critères d'euthanasie.

X. Analyse statistique

Les données ont été analysées avec le logiciel Origin (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA). Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes ± écart à la moyenne (S.E.M.) pour un nombre

n de fibres. La significativité a été déterminée en utilisant un test statistique « T » de Student, en configuration bilatérale et non appariée, et après vérification de la normalité de distribution avec un test de Shapiro-Wilk. Les différences entre deux échantillons sont considérées significatives pour $p \leq 0,05$. ($p \leq 0,05$ * ; $p \leq 0,01$ ** ; $p \leq 0,005$ ***).

RESULTATS

RESULTATS

Section 1.

EFFETS DE L'ACTIVATION D'UNE PHOSPHOINOSITIDE-PHOSPHATASE SUR LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Article 1 : Berthier, C., **Kutchukian, C.**, Bouvard, C., Okamura, Y., and Jacquemond, V. (2015). Depression of voltage-activated Ca^{2+} release in skeletal muscle by activation of a voltage-sensing phosphatase. *J. Gen. Physiol.* *145*, 315–330.

Cette étude s'est basée sur l'hypothèse selon laquelle le $PtdIns(4,5)P_2$ pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique et du couplage EC du muscle squelettique. Pour le tester, nous avons utilisé une stratégie visant à exprimer *in vivo*, dans les fibres musculaires squelettiques de souris adultes, une VSP (pour *voltage-sensing phosphatase*) capable de déphosphoryler le $PtdIns(4,5)P_2$ de manière dépendante du potentiel de membrane. Plus spécifiquement, la VSP, initialement clonée à partir de l'organisme marin *Ciona intestinalis* (Ci-VSP ; Murata et al., 2005) puis chez le poisson zèbre *Danio rerio* (Dr-VSP ; Hossain et al., 2008), possède un domaine senseur de potentiel dont le déplacement des charges intra-membranaires au cours d'une dépolarisation génère un changement de conformation de la protéine et active la phosphatase. Ainsi, nous avons utilisé cet extraordinaire outil moléculaire pour dépléter rapidement les stocks de $PtdIns(4,5)P_2$ à la membrane du sarcolemme et du tubule T en appliquant une forte dépolarisation, afin d'en déterminer les conséquences sur la fonction du couplage EC. En pratique, grâce à des techniques combinées d'imagerie confocale à balayage laser et d'électrophysiologie, nous avons mesuré l'efflux calcique du RS en réponse à des dépolarisations imposées de la membrane plasmique dans des fibres musculaires exprimant la Ci-VSP ou la Dr-VSP.

Expression de la Ci-VSP et de la Dr-VSP dans les fibres musculaires de souris

La Ci-VSP, insérée dans le vecteur d'expression bicistronique p-IRES-EGFP, et la Dr-VSP étiquetée à l'EGFP (EGFP-Dr-VSP) ont été exprimées dans des fibres musculaires squelettiques adultes de souris grâce à la technique d'électroporation *in vivo*. Comme attendu, l'EGFP a révélé une localisation homogène et diffuse de la fluorescence. En revanche, l'EGFP-Dr-VSP s'exprime dans l'ensemble de la fibre musculaire, et la fluorescence arbore un net aspect strié transversal. Le profil de fluorescence

de l'EGFP-Dr-VSP montre des double-pics successifs espacés d'environ 2 μm , correspondant à une expression triadique, vraisemblablement à la membrane des tubules T, comme nous avons pu le confirmer par des mesures de mouvements de charges intramembranaires.

Transitoires calciques déclenchés par une simple dépolarisation dans les fibres exprimant la VSP

En situation physiologique, les transitoires cytosoliques dus à l'efflux de Ca^{2+} du RS sont activés de manière maximale par des niveaux de dépolarisation membranaire beaucoup plus négatifs que ceux requis pour l'activation de la Ci-VSP ou de la Dr-VSP. Cette différence de sensibilité au potentiel nous a permis de comparer les propriétés des transitoires calciques déclenchés par des dépolarisations maintenues très positives activant la VSP (à +120 mV), aux propriétés des transitoires déclenchés par des dépolarisations maintenues plus faibles n'activant pas la VSP (à +20 mV). Les résultats montrent que, à la fois dans les fibres contrôles et dans les fibres exprimant la Ci-VSP, l'amplitude initiale des transitoires calciques (quelques millisecondes après le début de la dépolarisation) est identique pour des dépolarisations à +20 mV et à +120 mV, ce qui d'une part confirme l'activation maximale du couplage aux deux niveaux de dépolarisation et d'autre part ne suggère aucun effet rapide de l'activation de la VSP sur le couplage EC. En revanche et de manière très intéressante, l'amplitude tardive du transitoire calcique (quelques secondes après le début de la dépolarisation) est plus faible pendant la dépolarisation à +120 mV dans les fibres exprimant la Ci-VSP. Ainsi dans ces conditions, l'activation de la Ci-VSP, et donc la réduction des stocks de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane semble exercer un effet inhibiteur tardif sur l'efflux de Ca^{2+} du RS.

Efflux calciques en réponse à des trains de dépolarisations dans les fibres exprimant la Ci-VSP

Une dépolarisation maintenue de la membrane des fibres musculaires entraîne un processus d'inactivation du couplage EC qui progressivement réduit l'efflux calcique du RS et limite ainsi la possibilité d'étudier l'effet de la VSP sur le couplage au-delà de quelques centaines de millisecondes. Afin de se placer dans des conditions de forte déplétion des stocks de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane tout en conservant une activité d'efflux calcique du RS pendant une période prolongée, nous avons stimulé les fibres non plus par des dépolarisations maintenues de plusieurs secondes, mais par des trains de 20 dépolarisations successives de 200 ms. Plus précisément, les 10 premières dépolarisations étaient portées de -80 mV à +10 mV, suivies de 10 dépolarisations à +100 mV activant la VSP. De manière intéressante, alors que les fibres contrôles réagissent de la même manière aux dépolarisations à +10 et à +100 mV, nous montrons une réduction significative de l'amplitude des transitoires calciques lors des dépolarisations à +100 mV, dans les fibres exprimant la Ci-VSP. De plus, cet effet s'estompe lorsque les fibres sont de nouveau soumises uniquement à des

dépolarisations à +10 mV. Ces résultats suggèrent que la déplétion des stocks de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane induite par l'activation de la Ci-VSP exerce un effet inhibiteur sur la libération de Ca^{2+} par le RS, et que la reconstitution de ces stocks à l'arrêt de l'activation de la Ci-VSP permet la réversibilité de cet effet.

Efflux calcique en réponse à des trains de dépolarisations dans les fibres exprimant la Dr-VSP

L'objectif était ici de confirmer les résultats précédents en testant l'effet de l'activation de la Dr-VSP sur les propriétés de l'efflux calcique par le RS. Pour cela, les mêmes protocoles que ceux décrits précédemment ont été utilisés. Les transitoires calciques dans les fibres musculaires exprimant la Dr-VSP présentent également une réduction d'amplitude en réponse aux fortes dépolarisations mais de manière moins marquée qu'avec la Ci-VSP. Ceci résulte sans doute de la différence de sensibilité au potentiel entre ces deux VSPs. En effet, les données de la littérature et nos propres données (inclues en données supplémentaires) indiquent un décalage de l'activation de la Dr-VSP vers des potentiels plus positifs que ceux de la Ci-VSP (Hossain et al., 2008).

Courant calcique en réponse à de fortes dépolarisations dans les fibres exprimant la Ci-VSP

Afin de déterminer si l'effet de la déplétion du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ membranaire passe par une modulation de l'activité du DHPR, nous avons mesuré dans les fibres exprimant ou non la Ci-VSP le courant calcique à travers ce canal, et ce à différents temps suivant l'activation de la Ci-VSP (par une dépolarisation à +120 mV). Nos résultats n'ont révélé aucune différence d'amplitude du courant calcique entre les fibres contrôles et les fibres exprimant la Ci-VSP, démontrant que la fonction canal calcique du DHPR n'est pas sensible au niveau de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ membranaire.

Variations du taux de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane des fibres exprimant la Ci-VSP, en réponse à des dépolarisations

Afin de certifier la capacité de la Ci-VSP à dépléter les stocks de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ membranaire, nous avons co-exprimé la Ci-VSP ainsi que la sonde fluorescente mRFP-PLC δ 1PH, spécifique du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ dans les fibres musculaires. Les images confocales de la fluorescence du mRFP-PLC δ 1PH révèlent une distribution triadique de la sonde, en accord avec les données de la littérature indiquant une localisation du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane de surface et à la membrane du tubule T. De manière assez spectaculaire, l'activation de la Ci-VSP provoque une translocation de la sonde mRFP-PLC δ 1PH de la triade vers le cytosol. L'analyse des cinétiques de cette translocation indique d'une part que la déplétion des stocks de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ est d'autant plus rapide que la dépolarisation est élevée, et d'autre part que ce phénomène est lent par rapport aux cinétiques des transitoires

calciques, en accord donc avec l'effet inhibiteur tardif de l'activation de la Ci-VSP sur l'efflux calcique déclenché par des dépolarisations maintenues.

Conclusions

Le présent travail apporte des éléments nouveaux à la connaissance du rôle du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ dans la régulation de l'activité musculaire squelettique. Dans notre étude, nous avons tiré avantage de l'extraordinaire outil moléculaire que représentent les VSPs pour déterminer les conséquences d'une réduction rapide du taux de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ dans la membrane plasmique sur la fonction du couplage EC. Dans un premier temps nous avons montré que l'activation de la Ci-VSP, et donc la déplétion des stocks de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ affecte l'amplitude tardive mais pas le pic initial des transitoires calciques, suggérant qu'un délai est nécessaire entre l'activation de la phosphatase et la déphosphorylation d'une quantité suffisante de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ pour que les effets de la déplétion soient observables. Par ailleurs, la visualisation du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ grâce à la sonde fluorescente mRFP-PLC δ 1PH a révélé une translocation transitoire de la fluorescence dans le cytosol, d'autant plus rapide que la Ci-VSP est activée. L'ensemble des résultats révèle que le taux de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ est finement régulé dans la membrane tubulaire transverse des fibres musculaires squelettiques, et qu'une réduction drastique induite par l'activation de la Ci-VSP altère la fonction du couplage EC. La nature de la cible moléculaire du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ reste toutefois à déterminer. En effet, étant donné que l'activation de la VSP diminue le taux de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ dans la membrane du tubule T, une protéine du couplage présente dans ce compartiment membranaire semble à privilégier. Il pourrait s'agir du DHPR ou d'une protéine accessoire du couplage. Ce travail enfin pose la question de l'importance physiologique du mécanisme révélé et plus précisément de savoir s'il existe des situations physiologiques ou pathologiques pouvant conduire à une déplétion suffisante du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ pour affecter l'activité musculaire.

Depression of voltage-activated Ca^{2+} release in skeletal muscle by activation of a voltage-sensing phosphatase

Christine Berthier,¹ Candice Kutchukian,¹ Clément Bouvard,¹ Yasushi Okamura,² and Vincent Jacquemond¹

¹Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5534, Université Lyon 1, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, 69100 Villeurbanne, France

²Laboratory of Integrative Physiology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Phosphoinositides act as signaling molecules in numerous cellular transduction processes, and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) regulates the function of several types of plasma membrane ion channels. We investigated the potential role of $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ in Ca^{2+} homeostasis and excitation–contraction (E-C) coupling of mouse muscle fibers using in vivo expression of the voltage-sensing phosphatases (VSPs) *Ciona intestinalis* VSP (Ci-VSP) or *Danio rerio* VSP (Dr-VSP). Confocal images of enhanced green fluorescent protein–tagged Dr-VSP revealed a banded pattern consistent with VSP localization within the transverse tubule membrane. Rhod-2 Ca^{2+} transients generated by 0.5-s-long voltage-clamp depolarizing pulses sufficient to elicit Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR) but below the range at which VSPs are activated were unaffected by the presence of the VSPs. However, in Ci-VSP–expressing fibers challenged by 5-s-long depolarizing pulses, the Ca^{2+} level late in the pulse (3 s after initiation) was significantly lower at 120 mV than at 20 mV. Furthermore, Ci-VSP–expressing fibers showed a reversible depression of Ca^{2+} release during trains, with the peak Ca^{2+} transient being reduced by $\sim 30\%$ after the application of 10 200-ms-long pulses to 100 mV. A similar depression was observed in Dr-VSP–expressing fibers. Cav1.1 Ca^{2+} channel–mediated current was unaffected by Ci-VSP activation. In fibers expressing Ci-VSP and a pleckstrin homology domain fused with monomeric red fluorescent protein (PLC δ_1 PH-mRFP), depolarizing pulses elicited transient changes in mRFP fluorescence consistent with release of transverse tubule–bound PLC δ_1 PH domain into the cytosol; the voltage sensitivity of these changes was consistent with that of Ci-VSP activation, and recovery occurred with a time constant in the 10-s range. Our results indicate that the $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ level is tightly maintained in the transverse tubule membrane of the muscle fibers, and that VSP-induced depletion of $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ impairs voltage-activated Ca^{2+} release from the SR. Because Ca^{2+} release is thought to be independent from InsP_3 signaling, the effect likely results from an interaction between $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ and a protein partner of the E-C coupling machinery.

INTRODUCTION

Muscle contraction is initiated when action potentials fired at the end-plate of the muscle cells propagate throughout the transverse tubule system and reach a region called the triad where the transverse tubule membrane comes into close apposition with two terminal cisternae of SR. There, transverse tubule depolarization triggers a conformational change of the dihydropyridine receptor (DHPR; the Cav1.1 protein), which gates open the Ca^{2+} release channel (type I RyR [RyR1]) present in the adjacent SR membrane, through a protein–protein conformational coupling process: Ca^{2+} gets massively released from the SR into the cytosol, which increases the concentration of Ca–troponin C complex, triggering contraction (see Ríos et al., 1992; Schneider,

1994; Melzer et al., 1995). The process is rapidly and fully reversible so that upon membrane repolarization, muscle relaxation occurs driven by ATP-fuelled SR Ca^{2+} uptake. Although the remarkable reliability of the DHPR–RyR1 coupling keeps Ca^{2+} release under the strict control of the membrane potential, there are possibilities for modulation of this process by several candidate molecules and accessory proteins (Dulhunty, 2006; Treves et al., 2009). For many of them, the physiological relevance of this modulation at the intact cell level remains unclear. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) is known to play a critical role in a wide diversity of cellular functions by acting either as substrate of phospholipase C to produce inositol-trisphosphate ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$) and diacylglycerol, or by acting as a direct lipid messenger through interactions with specific

Correspondence to Vincent Jacquemond: vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr

Abbreviations used in this paper: Ci-VSP, *Ciona intestinalis* voltage-sensing phosphatase; DHPR, dihydropyridine receptor; Dr-VSP, *Danio rerio* voltage-sensing phosphatase; E-C, excitation–contraction; $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, inositol-trisphosphate; $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; VSP, voltage-sensing phosphatase.

© 2015 Berthier et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

motifs of proteins including several types of ion channels or by being the precursor of other phosphoinositide messengers with an analogous function.

In skeletal muscle, it has been generally agreed for ~20 years that there is little room for the prospect that Ins(1,4,5)P₃ plays a direct role in excitation–contraction (E-C) coupling, as recently revisited by Blaauw et al. (2012). It should be mentioned though that this does not exclude the potential for Ins(1,4,5)P₃ to be involved in Ca²⁺ signals with a physiological purpose other than contraction, either in a voltage-dependent (Casas et al., 2010; Jorquera et al., 2013) or voltage-independent manner (Tjondrokoesoemo et al., 2013). On the other hand, considering the growing number of proteins and specifically of voltage-dependent and voltage-independent ion channels that are sensitive to the PtdIns(4,5)P₂ level in the plasma membrane, it was of strong interest to investigate whether the function of the E-C coupling molecular machinery would be dependent on PtdIns(4,5)P₂ level. To this aim, we have expressed in vivo, in adult differentiated muscle fibers from mouse, a voltage-sensing phosphatase (VSP) that dephosphorylates PtdIns(4,5)P₂ upon strong membrane depolarization (Murata et al., 2005). VSP, first discovered in ascidian *Ciona intestinalis* and later on in zebrafish (*Danio rerio* VSP [Dr-VSP]; Hossain et al., 2008), appeared as the first identified members of nonchannel proteins whose activity is regulated by membrane potential. This tool offers the possibility to trigger a rapid depletion of the PtdIns(4,5)P₂ pool in the plasma membrane. We thus aimed at testing the consequences of triggering the VSP enzymatic activity on E-C coupling. Results demonstrate that activation of the phosphatase depresses voltage-activated Ca²⁺ release, revealing a role for PtdIns(4,5)P₂ in the proper E-C coupling function.

MATERIALS AND METHODS

All experiments and procedures were performed in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of University Lyon 1, of the French Ministry of Agriculture (87/848), and of the European Community (86/609/EEC).

In vivo transfection

Expression was achieved by in vivo plasmid injection followed by electroporation, as described previously (Legrand et al., 2008; Weiss et al., 2010). Plasmids encoding the following proteins were used: Dr-VSP N-terminally tagged with EGFP, Dr-VSP and *C. intestinalis* VSP (Ci-VSP) in a bicistronic p-IRES-EGFP expression vector, and mRFP-tagged PLCδ₁PH domain (provided by T. Balla, National Institutes of Health, Bethesda, MD). In brief, 6–16-wk-old Swiss OF1 male mice were used. Transfection was performed in the flexor digitorum brevis (fdb) and interosseus muscles of the animals. Mice were anaesthetized by isoflurane inhalation using a commercial delivery system (Univentor 400 Anesthesia Unit; Univentor). 20 μl of a solution containing 2 mg/ml hyaluronidase dissolved in sterile saline was then injected into the footpads of each hind paw. 1 h later, the mouse was re-anaesthetized by isoflurane inhalation. A total volume of 20 μl of a solution containing

50 μg of plasmid DNA diluted in NaCl 9‰ was then injected into the footpads of the animal. After the injection, two gold-plated stainless steel acupuncture needles connected to the electroporation apparatus were inserted under the skin, near the proximal and distal portion of the foot, respectively. The standard protocol that we used consisted in 20 pulses of 200-V/cm amplitude and 20-ms duration delivered at a frequency of 2 Hz by a square wave pulse generator (BTX ECM 830; Harvard Apparatus). Muscle fiber isolation and experimental observations and measurements were performed 7–10 d later.

Preparation of isolated muscle fibers

Single fibers were isolated from the fdb and interosseus muscles from mice using a previously described procedure (Jacquemond, 1997). In brief, mice were killed by cervical dislocation before removal of the muscles. Muscles were treated with collagenase (type 1; Sigma-Aldrich) for 60 min at 37°C. Single fibers were then obtained by triturating the muscles within the experimental chamber. They were dispersed on the glass bottom of a 50-mm-wide culture μ-dish (Biovalley). For intracellular Ca²⁺ measurements under voltage-clamp conditions, fibers were first partially insulated with silicone grease so that only a 50–100-μm-long portion of the fiber extremity was left out of the silicone, as described previously (Jacquemond, 1997). The Ca²⁺-sensitive fluorescent indicator rhod-2 was then introduced into the myoplasm by diffusion through the tip of the voltage-clamp pipette (see below). For all experimental situations, EGFP-negative (referred to as VSP-negative) fibers isolated from the same muscles were used as control. All experiments were performed at room temperature (20–22°C).

Electrophysiology

A patch-clamp amplifier (RK-400; Bio-Logic) was used in whole-cell voltage-clamp configuration. Command voltage-pulse generation was achieved with an analogue–digital converter (Digidata 1440A; Axon Instruments) controlled by pClamp 9 software (Axon Instruments). Fibers were bathed in the TEA-containing extracellular solution (see Solutions). Voltage clamp was performed with a micropipette filled with the rhod-2-containing intracellular-like solution (see Solutions). The tip of the micropipette was inserted through the silicone within the insulated part of the fiber and was crushed against the bottom of the chamber to ease intracellular equilibration. Analogue compensation was adjusted to further decrease the effective series resistance. Unless otherwise specified, membrane-depolarizing steps were applied from a holding command potential of –80 mV. For charge movement measurements, membrane current records were obtained in response to 100-ms-long depolarizing pulses of increasing amplitude from a holding potential of 0 mV. Removal of the linear leak and capacitive components of the current changes elicited by a depolarizing pulse was achieved using previously described procedures with record portions during pulses that were in some cases further corrected for sloping baseline (Collet et al., 2003; Pouvreau and Jacquemond 2005). Even with a depolarized holding potential, several fibers remained ineligible for charge movement analysis because of residual contaminating outward currents activated upon depolarization. When measuring Ca²⁺ transients in response to single depolarizing steps, a period of 30 s was allowed between two consecutive pulses. When the trains of 20 200-ms-long pulses (see Fig. 4) were applied, an interval of 1 min was allowed.

Confocal imaging

All experiments were conducted using a confocal microscope (LSM 5 Exciter; Carl Zeiss) equipped with a 63× oil-immersion objective (numerical aperture, 1.4). EGFP excitation was provided by the 488-nm line of an argon laser, and a 505-nm long-pass filter was used on the detection channel. For detection of either rhod-2 or PLCδ₁PH-mRFP fluorescence, excitation was

from the 543-nm line of a HeNe laser and fluorescence was collected above 560 nm. Intracellular Ca^{2+} -related rhod-2 fluorescence changes were imaged by using the line-scan mode (x,t) of the system with the line parallel to the longitudinal fiber axis. Images were taken with a scanning frequency of 1.15 ms per line. PLC δ_1 PH-mRFP fluorescence was detected either in (x,y) or (x,t) mode. For measurements of the changes in transverse tubule membrane voltage upon voltage-clamp depolarization, muscle fibers were incubated for 30 min in the presence of 10 μM di-8-aneppps before voltage clamp was achieved. Unless otherwise stated, di-8-aneppps fluorescence was measured with the line-scan mode of the confocal microscope (1.93 or 1.15 ms per line) using the same configuration as for rhod-2 and mRFP, but with the pinhole fully open. Image processing and analysis was performed using ImageJ (National Institutes of Health) and Origin (OriginLab Corporation) software.

[Ca^{2+}] and Ca^{2+} release calculation

Rhod-2 fluorescence changes were expressed as F/F_0 , where F_0 is the baseline fluorescence. No correction was made for the rhod-2-binding kinetics. Peak values for F/F_0 signals were measured as the first early peak of the transients. The Ca^{2+} release flux underlying the calculated global [Ca^{2+}] transients was estimated according to a previously described procedure (Collet et al., 2004; Pouvreau et al., 2006). Changes in [Ca^{2+}] were calculated from the rhod-2 signals using the previously described pseudo-ratio equation (Cheng et al., 1993) assuming a basal [Ca^{2+}] of 100 nM and a K_d of rhod-2 for Ca^{2+} of 1.2 μM . SR calcium release flux was then calculated from the time derivative of the total myoplasmic Ca^{2+} ($[\text{Ca}]_{\text{Tot}}$) obtained from the occupancy of intracellular calcium-binding sites. The model included troponin C-binding sites, parvalbumin-binding sites, and calcium transport across the SR membrane with the same parameters as used in Lefebvre et al. (2011, 2013). Ca^{2+} -binding sites on EGTA were included with a total site concentration of 6 mM, an "on" rate constant $k_{\text{on,EGTA}}$ of $0.056 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{ms}^{-1}$ and an "off" rate constant $k_{\text{off,EGTA}}$ of 0.002ms^{-1} .

Solutions

The extracellular solution used for whole-cell voltage clamp contained (mM): 140 TEA-methanesulfonate, 2.5 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 1 4-aminopyridine, 10 HEPES, and 0.002 tetrodotoxin. The intracellular-like solution for whole-cell voltage clamp contained (mM): 120 K-glutamate, 5 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 5 $\text{Na}_2\text{-phosphocreatine}$, 5.5 MgCl_2 , 10 EGTA, 4 CaCl_2 , 5 glucose, and 5 HEPES. All solutions were adjusted to pH 7.20.

Statistics

Least-squares fits were performed using a Marquardt–Levenberg algorithm routine included in Origin (OriginLab Corporation).

Data values are presented as means \pm SEM for n fibers. Statistical significance was determined using a Student's t test (*, $P \leq 0.05$).

Online supplemental material

Fig. S1 shows results from measurements of intramembrane charge movement in VSP-negative and VSP-positive fibers. Fig. S2 presents results from measurements of changes in transverse tubule membrane voltage using the dye di-8-aneppps. Fig. S3 shows the voltage-dependent properties of the DHPR Ca^{2+} current in VSP-negative and VSP-positive fibers. Results from measurements of intramembrane charge movement, of di-8-aneppps fluorescence, and of DHPR Ca^{2+} current are described in detail in the text accompanying Figs. S1, S2, and S3, respectively. Videos 1 and 2 show a sequence of confocal images of PLC δ_1 PH-mRFP fluorescence from two fibers also expressing Ci-VSP and depolarized by 5-s-long pulses. The online supplemental material is available at <http://www.jgp.org/cgi/content/full/jgp.201411309/DC1>.

RESULTS

Functional expression of Ci-VSP and Dr-VSP in mouse muscle fibers

Ci-VSP and Dr-VSP exhibit distinct voltage sensitivity and speed of activation, and their robustness of expression also appears to differ in cultured mammalian cells (Hossain et al., 2008). As these differences were expected to also occur in our system and to make one or the other more efficient in depleting plasma membrane $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, it was of specific interest to test their respective effect. Fig. 1 A shows a transmitted light image and corresponding confocal image of a portion of a muscle fiber transfected with Ci-VSP using the pIRES-EGFP plasmid. Fig. 1 B shows an analogous pair of images from a fiber expressing Dr-VSP N-terminally tagged with EGFP (EGFP–Dr-VSP). In all cases, expression of VSP proteins was well tolerated: there was no apparent consequence on fiber appearance and morphology. There was also no sign of alterations such as blebbing and membrane extensions, which might have been expected because phosphoinositides are involved in regulation of cell morphology and cytoskeleton (see, for instance, Yamaguchi et al., 2014). For the batches of VSP-negative and Ci-VSP-positive

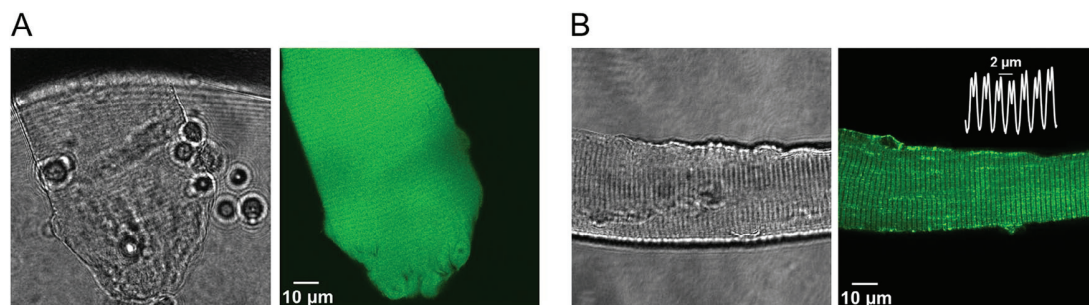


Figure 1. Expression of VSP in muscle fibers. Transmitted light images and corresponding confocal images of a portion of muscle fibers expressing Ci-VSP using the pIRES-EGFP plasmid (A) and Dr-VSP N-terminally tagged with EGFP (B). In B, the white trace superimposed on the green image shows the typical banded pattern of the fluorescence along the longitudinal axis of the fiber.

fibers used in Fig. 4, mean fiber diameter was $51.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$ ($n = 17$) and $49.5 \pm 2.0 \mu\text{m}$ ($n = 17$), respectively; corresponding mean measured capacitance was $1,599 \pm 120 \text{ pF}$ ($n = 21$) and $1,544 \pm 210 \text{ pF}$ ($n = 19$), which, considering that a similar length of fiber was always under voltage clamp, indicates that there was no significant difference in transverse tubule density between VSP-negative and Ci-VSP-positive fibers.

Although expression of EGFP with the pIRES plasmid produced an expected homogenous fluorescence, expression of the EGFP-Dr-VSP fusion protein revealed a clear double-striped transverse pattern with an $\sim 2\text{-}\mu\text{m}$ spacing interval, reminiscent of the triadic area. This pattern does not disclose which membrane compartment of the triad is targeted by the VSP. However, considering

that previous works in various expression systems established that VSPs localize in the plasma membrane, it is very likely that under our conditions, the striated pattern corresponded to the transverse tubule membrane system of the muscle fibers.

With the aim of formally establishing the VSP protein localization in the transverse tubule membrane, we attempted to measure intramembrane charge movement in VSP-negative and VSP-positive fibers maintained at a holding voltage of 0 mV. These measurements could not be made entirely acceptable because several fibers were not suitable for analysis as a result of remaining voltage-activated contaminating outward currents. Furthermore, a transient inward current component at the onset of the depolarizing pulses complicated the analysis. For these

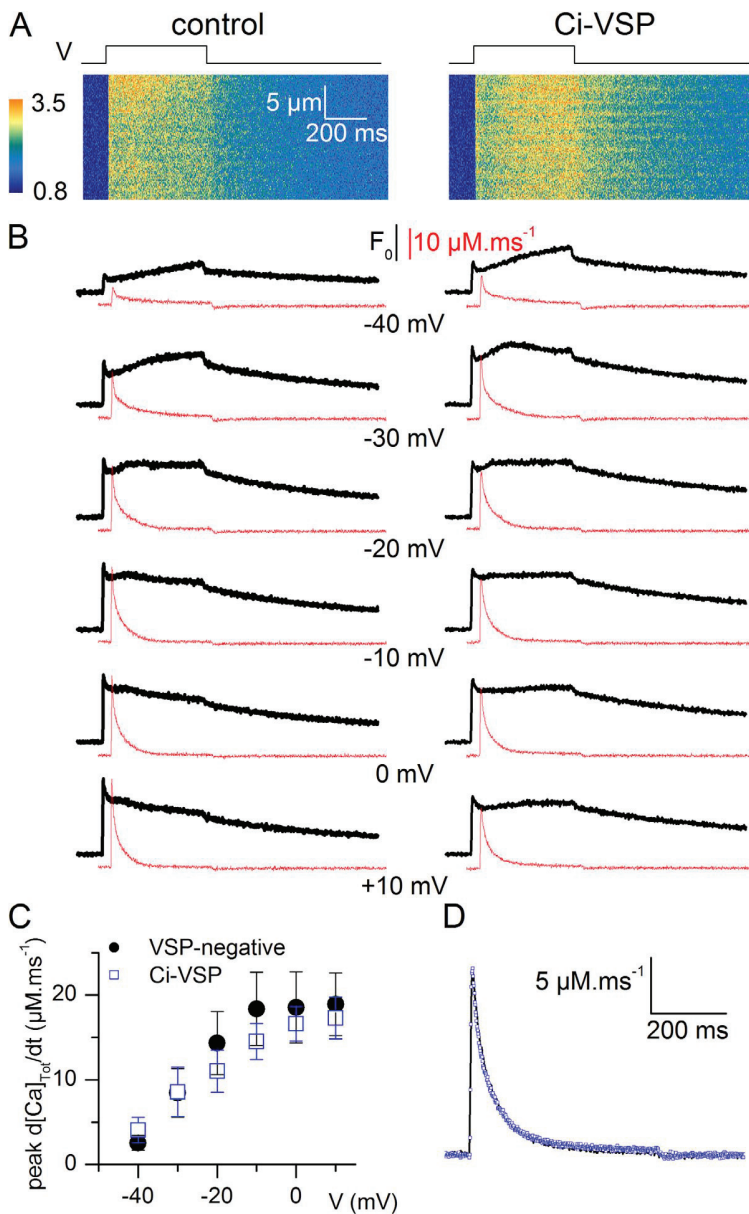


Figure 2. Voltage-activated Ca^{2+} release in VSP-expressing fibers. (A) Line-scan images of depolarization-induced Ca^{2+} release in a VSP-negative fiber (left) and in a Ci-VSP-expressing fiber (right); fibers were depolarized from -80 to 10 mV (traces on top). (B) Ca^{2+} transients (rhod-2 F/F_0 , thick traces) and corresponding rate of Ca^{2+} release (thin red traces) in response to pulses from -80 mV to the indicated values. (C) Peak Ca^{2+} release versus voltage in VSP-negative fibers ($n = 9$) and in Ci-VSP-expressing fibers ($n = 6$). Error bars represent \pm SEM. (D) Average Ca^{2+} release in response to a pulse from -80 to 10 mV in VSP-negative fibers (line) and in Ci-VSP-expressing fibers (blue squares).

reasons, we present and discuss corresponding results in the [supplemental text](#). Despite these difficulties, results shown in [Fig. S1](#) indicate that membrane current components yielding properties consistent with those of gating currents of VSP proteins are detectable in the transfected fibers, supporting the presence of VSPs in the transverse tubule membrane. Thus, the present system is effective to assess the consequences of their activation on Ca^{2+} homeostasis and E-C coupling.

Ca^{2+} release in response to single depolarizing steps in VSP-expressing fibers

SR Ca^{2+} release is physiologically activated within a range of membrane voltages that is more negative than the one needed to activate Ci-VSP or Dr-VSP. Our main goal was to take advantage of this shift to compare the properties of Ca^{2+} transients elicited by voltage pulses that would maximally activate Ca^{2+} release with or without activating the VSP. We first tested whether presence of the VSP proteins per se in the transverse tubule membrane affects the properties of Ca^{2+} release independently from the phosphatase activity. [Fig. 2 A](#) shows illustrative examples of line-scan confocal images of rhod-2 fluorescence taken from a VSP-negative fiber (left) and from a fiber expressing Ci-VSP (right). Both fibers were step-depolarized by a 0.5-s-long depolarization from -80 to 10 mV. [Fig. 2 B](#) shows the time course of change in rhod-2 fluorescence (thick traces) and the corresponding calculated rate of release (thin traces) in response to 0.5-s-long

pulses of increasing amplitude, in these two fibers. Expression of Ci-VSP had no striking consequence on the Ca^{2+} signals: in both fibers, Ca^{2+} release was activated at a similar threshold voltage level and yielded the classical waveform characterized by an early peak that rapidly decayed toward a lower level. [Fig. 2 C](#) presents mean values for peak Ca^{2+} release versus voltage in VSP-negative fibers ($n = 9$) and in Ci-VSP-expressing fibers ($n = 6$): there was no statistical difference between the values in the two groups. The same measurements performed in three fibers expressing Dr-VSP gave mean values in the same range (not depicted). [Fig. 2 D](#) shows the average Ca^{2+} release trace in response to a 0.5-s-long pulse to 10 mV in VSP-negative fibers and in Ci-VSP-expressing fibers. There was no sign of any difference in the time course of Ca^{2+} release in the VSP-expressing fibers.

According to previous works, substantial depletion of plasma membrane $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ requires at least several hundred milliseconds of VSP activation by a strong membrane depolarization, whereas subsequent recovery from depletion occurs over a time scale of seconds to tens of seconds (see, for instance, Sakata et al., 2011). Because upon membrane depolarization SR Ca^{2+} release exhibits an early peak that falls within 10–20 ms toward a low, slowly declining level, we did not expect a sustained strong depolarization to be the optimal protocol to reveal a potential effect of VSP activation, as $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ would become substantially depleted at a time when Ca^{2+} release is very low. Furthermore, such long pulses cannot

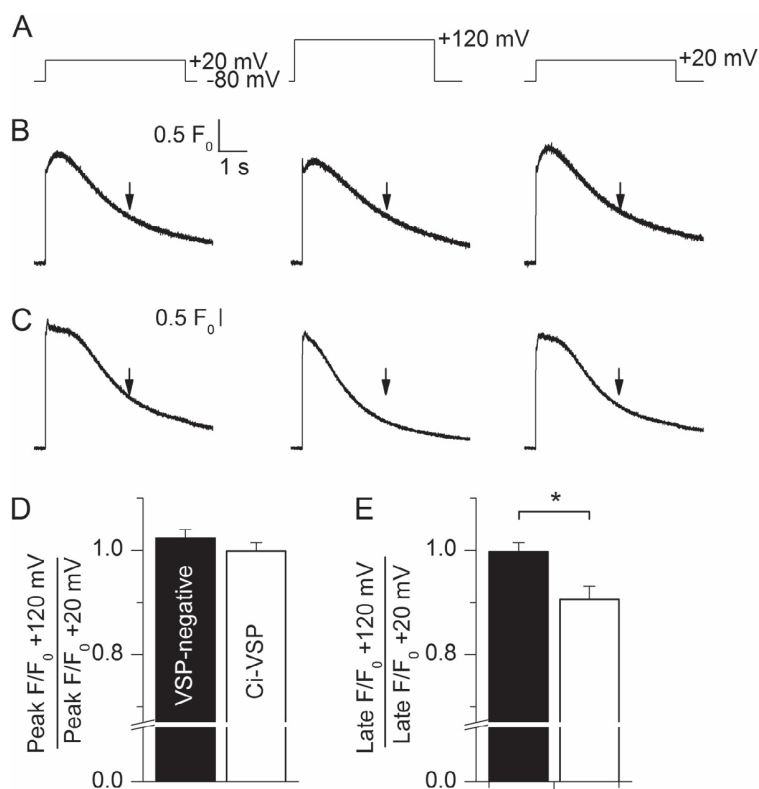


Figure 3. Ca^{2+} transients in VSP-expressing fibers depolarized by large pulses. (A) Voltage-pulse protocol. (B and C) Corresponding F/F_0 rhod-2 traces in a Ci-VSP-negative and in a Ci-VSP-positive fiber, respectively. Arrows point to the F/F_0 level 3 s after the onset of the pulse. (D) Mean values for the ratio of the initial peak rhod-2 Ca^{2+} transient in response to the pulse to 120 mV to the initial peak value in response to the pulse to 20 mV in VSP-negative ($n = 11$) and Ci-VSP-positive fibers ($n = 8$). (E) Mean values for the ratio of the rhod-2 Ca^{2+} level 3 s after the onset of the pulse to 120 mV to the corresponding value during the pulse to 20 mV. Error bars represent \pm SEM. *, $P \leq 0.05$.

be repeated at a frequency that would seem sufficiently high to avoid PtdIns(4,5)P₂ depletion between pulses, as the time for recovery of Ca²⁺ release from SR Ca²⁺ depletion, and also to some extent from voltage-dependent inactivation, precludes repeating such pulses with a short interval. We nevertheless did compare Ca²⁺ transients triggered by 5-s-long depolarizing pulses to 20 mV (non-VSP-activating pulse) and to 120 mV (VSP-activating pulse) in VSP-negative and VSP-positive fibers. Fig. 3 (B and C) shows rhod-2 fluorescence transients elicited by stepping the membrane potential from -80 to 20 mV, then from -80 to 120 mV, and then again from -80 to 20 mV in a Ci-VSP-negative fiber and in a Ci-VSP-positive fiber, respectively. The three fluorescence transients looked quite similar in the VSP-negative fiber, but in the VSP-expressing fiber, the fluorescence signal appeared to be less sustained late during the pulse to 120 mV as compared with the level during the bracketing pulses to

20 mV. Fig. 3 (D and E) shows mean values for the ratio of the initial peak and of the late (3 s after the beginning of the pulse) rhod-2 Ca²⁺ transients in response to the pulse to 120 mV versus corresponding values in response to the pulses to 20 mV in VSP-negative (*n* = 11) and Ci-VSP-positive fibers (*n* = 8). In each fiber, initial and late F/F₀ values for the pulse to 120 mV were divided by the average of the two respectively corresponding bracketing values measured in response to the pulses to 20 mV. The mean ratio for initial peak Ca²⁺ transient did not statistically differ between the two groups of fibers. In contrast, the mean ratio for the Ca²⁺ level 3 s after the beginning of the pulse was significantly depressed in Ci-VSP-expressing fibers as compared with the mean value in VSP-negative fibers (*P* = 0.007).

The strong depolarizing pulses used to activate the VSP inevitably triggered substantial activation of outward K⁺ current, which was expected to affect the quality of the

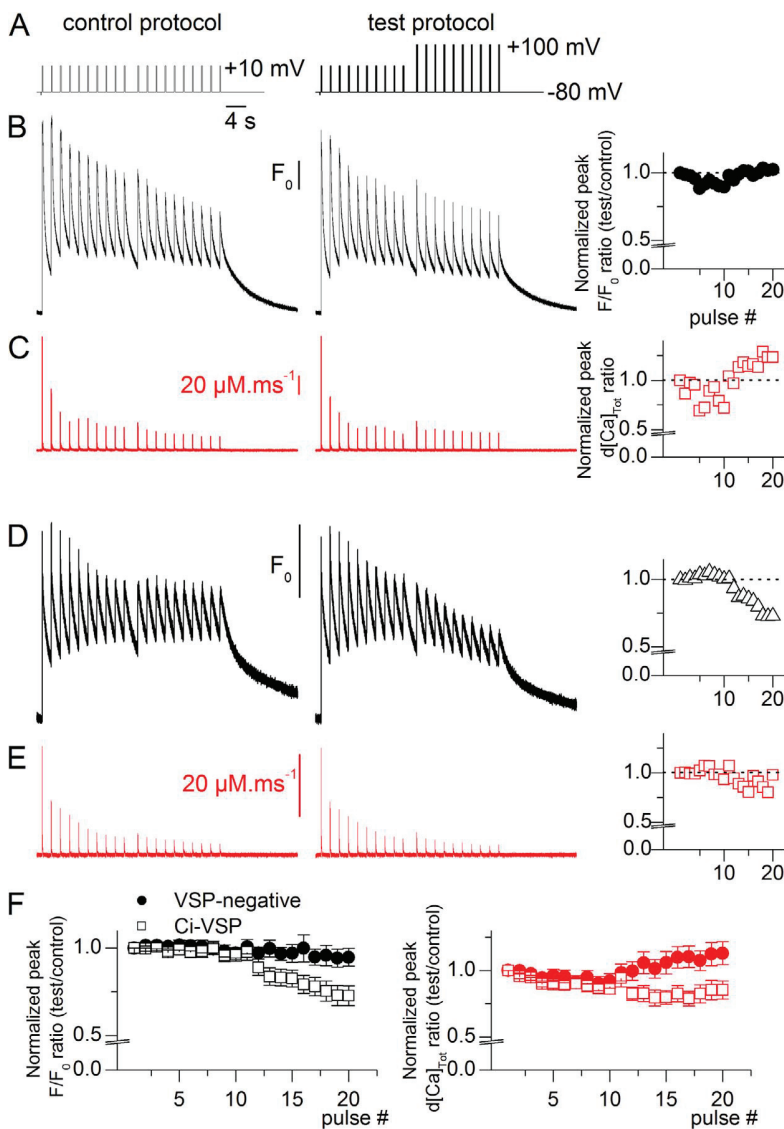


Figure 4. Ca²⁺ transients in response to trains of depolarizing steps in VSP-negative fibers and Ci-VSP-expressing fibers. (A) Control and test voltage-pulse protocols. (B and D) Rhod-2 F/F₀ traces recorded in response to the protocols shown in A in a VSP-negative fiber and in a Ci-VSP-expressing fiber, respectively. The graphs on the right show the ratio of the successive peak F/F₀ values during the test record to the corresponding values during the control record, plotted versus the pulse number during the protocols; values were normalized to the ratio value corresponding to the first Ca²⁺ transient. (C and E) Ca²⁺ release traces calculated from the above-corresponding rhod-2 transients. The graphs on the right show the ratio of the successive peak Ca²⁺ release values during the test record to the corresponding values during the control record, plotted versus the pulse number; values were normalized to the ratio value corresponding to the first Ca²⁺ transient. (F; left) Mean values for the normalized ratio of peak F/F₀ during the test record to the corresponding peak F/F₀ during the control record, versus the pulse number, in VSP-negative and in Ci-VSP-positive fibers. (Right) Corresponding mean values for the normalized ratio of peak Ca²⁺ release during the test record to the corresponding peak Ca²⁺ release during the control record. Error bars represent ± SEM.

voltage control. To estimate the actual voltage reached in the transverse tubule membrane of the voltage-clamped portion of fiber during these pulses, we measured the changes in fluorescence of the voltage-sensitive dye di-8-anepss in nontransfected muscle fibers. Results from these measurements are presented in Fig. S2. They suggest that during command pulses to 100 or 120 mV, the actual transverse tubule voltage reached ~ 60 mV, sufficient to substantially activate Ci-VSP.

Ca²⁺ release in response to trains of depolarizing steps in Ci-VSP-expressing fibers

To maximize the likelihood of severely depleting PtdIns(4,5)P₂ through VSP activation while maintaining the potency to trigger substantial Ca²⁺ release, we used a protocol consisting in successive 200-ms-long depolarizing pulses applied every 2 s. Although under such conditions peak Ca²⁺ release decreased over time as pulses were applied, a significant activity could be maintained over a period of ~ 1 min (Fig. 4). Fig. 4 A shows the exact protocol used in each fiber: a 200-ms-long pulse was applied 10 times from -80 to 10 mV and then 10 times again to either 10 mV (control protocol) or to 100 mV (test, VSP-activating, protocol). The 10 first Ca²⁺ transients were used to assess the reproducibility of the changes in Ca²⁺ in the test versus the control record in response to the same pulses that did not activate the VSP. The next 10 pulses were anticipated to reveal the effect of VSP activation in the test record. B and D in Fig. 4 show such pairs of records from a VSP-negative fiber and from a Ci-VSP-expressing fiber, respectively. In both fibers, as the successive pulses were applied, Ca²⁺ transients were triggered and decayed to an elevated level. In the VSP-negative fiber, the two records looked quite similar. In contrast, in the Ci-VSP-expressing fiber, there was a progressive drop in the amplitude of the Ca²⁺ transients as pulses to 100 mV were applied. Independent of the presence of VSP, there was fiber to fiber variability in the overall time course of change in peak and baseline Ca²⁺ levels along the records. For instance, the fact that the peak rhod-2 transient appeared more sustained along the last 10 pulses in Fig. 4 D as compared with Fig. 4 B was absolutely not a reproducible feature of the VSP-expressing

fiber (see, for instance, Fig. 6). Furthermore, in a given fiber the actual amplitude of peak Ca²⁺ transients in response to the first 10 pulses also could somewhat vary between the control and the test record. For analysis, successive peak F/F_0 values during the test record were thus divided by the corresponding values in the control record; values for this ratio were then normalized to the ratio value corresponding to the first Ca²⁺ transient of the train. The right-end graph in Fig. 4 (B and D) shows values for the ratio plotted versus the pulse number for the two fibers. Corresponding mean values from 21 VSP-negative fibers and 19 Ci-VSP-expressing fibers are reported in the left panel of Fig. 4 F. Although in the VSP-negative fibers the ratio remained close to unity for all Ca²⁺ transients, there was a clear drop in the ratio as pulses to 100 mV were applied in the Ci-VSP-expressing fibers. Statistical comparison of the values revealed a significant difference between VSP-negative and Ci-VSP-expressing fibers, starting from pulse number 13 (third pulse to 100 mV). For instance, the mean ratio value corresponding to the last pulse in the protocols was 0.73 ± 0.06 and 0.95 ± 0.05 for Ci-VSP-positive fibers and VSP-negative fibers, respectively ($P = 0.006$). Statistical difference was also tested versus the hypothesis of the ratio being 1. For the VSP-negative fibers, none of the mean ratio values significantly differed from 1, whereas for the Ci-VSP fibers, all ratio values starting from pulse number 12 were significantly lower than 1.

A similar analysis was performed from the peak values of the Ca²⁺ release flux calculated from the rhod-2 traces. Flux traces corresponding to the rhod-2 signals from the VSP-negative and VSP-expressing fibers illustrated in Fig. 4 are shown in C and E, with the right-side graph showing values for the test over control ratio plotted versus the pulse number. Corresponding mean values are reported in the right panel in Fig. 4 F. Mean values from the VSP-expressing fibers were significantly depressed as compared with values in VSP-negative fibers starting from pulse number 13.

We asked whether the presence and/or activation of VSP had consequences on the membrane current flowing during the pulses. We measured membrane current near the end of each depolarizing pulse applied during

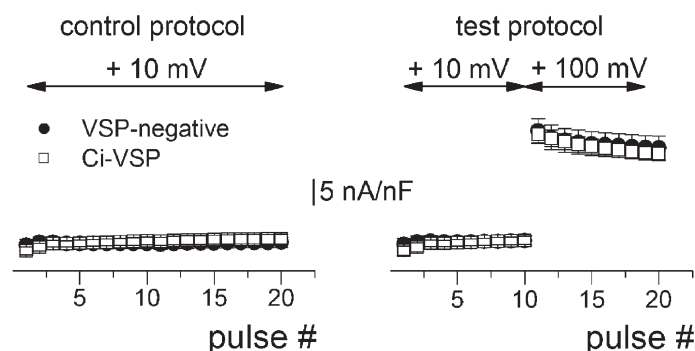


Figure 5. Membrane current during trains of depolarizing steps in VSP-negative fibers and Ci-VSP-expressing fibers. Mean value for the membrane current measured at the end of each depolarizing pulse during the control and test protocols shown in Fig. 4. The horizontal axis is positioned at the zero-current level. Error bars represent \pm SEM.

the control and test protocol, and values were normalized to fiber capacitance. Corresponding mean values are presented in Fig. 5. There was no indication that either the presence of Ci-VSP in the membrane or its activation by the pulses to 100 mV produced any modification of the membrane current.

To test whether the depressing effect of Ci-VSP activation on Ca^{2+} release was reversible and repeatable, two test protocols were applied, bracketed by control protocols, in a subset of fibers. This appeared to be the case, as Fig. 6 illustrates. Fig. 6 B shows F/F_0 rhod-2 traces elicited in a Ci-VSP-expressing fiber alternatively challenged by a control and a test protocol (Fig. 6 A). Fig. 6 C shows mean values for the peak F/F_0 values during the test 1, control 2, and test 2 records, all divided by the corresponding values in the control 1 record. Values are from 12 Ci-VSP-expressing fibers. The drop in Ca^{2+} release elicited by the first set of pulses to 100 mV was transient and could be triggered again by a second series of the same pulses, consistent with reversible reduction in the level of a molecule with agonistic properties toward Ca^{2+} release.

Ca^{2+} release in response to trains of depolarizing steps in Dr-VSP-expressing fibers

The 200-ms pulse-train control and test protocols described above were also tested in fibers expressing Dr-VSP, a teleost orthologue of VSP, which exhibits a more positive voltage dependence than Ci-VSP. As illustrated in Fig. 7 (B and C), Dr-VSP-expressing fibers responded in a similar manner to Ci-VSP-expressing fibers. However, out of seven fibers tested, two did not respond with any drop at all in the ratio (of peak F/F_0 values during the test record to corresponding values in the control

record) when the pulses to 100 mV were applied. As a consequence, none of the mean ratio values significantly differed from the corresponding ones in the VSP-negative fibers. Still, when testing the mean values versus the hypothesis of the ratio being 1, values for pulses number 15 and above were significantly depressed. Dr-VSP appeared thus less efficient than Ci-VSP in depressing Ca^{2+} release, but this was expected because it requires more positive voltage steps to be activated.

Ca^{2+} current after strong depolarizing pulses in Ci-VSP-expressing fibers

The above data are consistent with the possibility that activation of VSP in the transverse tubule membrane affects Ca^{2+} release. We examined whether the function of Cav1.1, which acts both as voltage sensor for E-C coupling and as voltage-dependent Ca^{2+} channel, would be affected after VSP activation. For this, we measured the Ca^{2+} current in fibers challenged by a double-pulse protocol. The membrane voltage was first stepped from -80 to 20 mV for 5 s (prepulse) and then, after a 1-s delay, from -80 to 20 mV for 1 s (test pulse). The double pulse was then applied with the prepulse to 120 mV to activate the VSP and then again with the prepulse to 20 mV as a bracketing control. In each fiber, the whole protocol was repeated with a 2-s and with a 5-s interval between the prepulse and the test pulse. Corresponding membrane current traces from a Ci-VSP-expressing fiber are shown in Fig. 8 (A–C). In each panel, the two membrane current records with the prepulse to 20 mV are in black, and the record with the prepulse to 120 mV is in red.

Ci-VSP expression per se did not affect the amplitude of the Ca^{2+} current: the mean peak value of the current

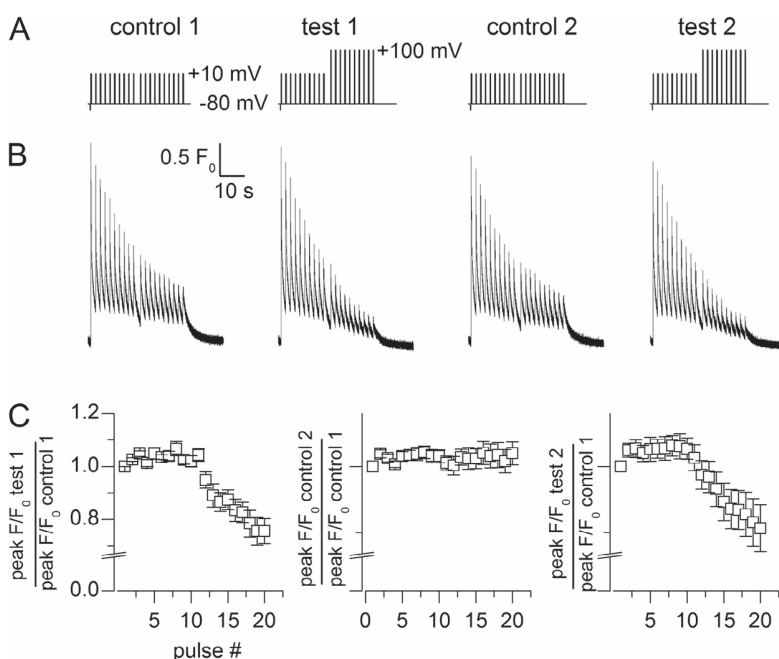


Figure 6. Reversibility of the effect of VSP activation on trains of Ca^{2+} transients. (A) Pulse protocols that were successively applied. (B) F/F_0 rhod-2 traces elicited in a Ci-VSP-expressing fiber challenged by the protocols shown in A. (C) Mean values for the peak F/F_0 rhod-2 signals during the test 1, control 2, and test 2 records ($n = 12$ Ci-VSP-expressing fibers); in each fiber, successive peak F/F_0 values were divided by the corresponding values for the same pulse number during the control 1 record. Error bars represent \pm SEM.

during the 5-s-long prepulse to 20 mV was -2.5 ± 0.6 A/F and -3.3 ± 0.6 A/F in VSP-negative ($n = 7$) and VSP-positive fibers ($n = 8$), respectively, not significantly different. The peak amplitude of the calcium current during the test pulse was depressed as compared with its amplitude during the prepulse to 20 mV, as expected from only partial recovery from voltage-dependent inactivation. Interestingly, the prepulse to 120 mV actually seemed to slightly enhance the Ca^{2+} current amplitude during the test pulse as compared with the prepulse to 20 mV, an effect that was observed in both VSP-negative and VSP-positive fibers. Reasons for this effect are currently being explored, independent from the present work. In any case, we found no indication that activation of the VSP had an effect on the Ca^{2+} channel activity. Fig. 8 D shows mean values for the ratio of the Ca^{2+} current amplitude after the prepulse to 120 mV to its amplitude after the prepulse to 20 mV (average of the two bracketing values) versus the pulse interval. Membrane current amplitudes were measured as the difference between the peak and the end-pulse level. There was no statistical difference between mean ratio values in VSP-negative and VSP-positive fibers. Although one cannot exclude that even the shortest interval at -80 mV (1 s) could allow some recovery from the consequences of the phosphatase activity, results provide no indication that Cav1.1 Ca^{2+} current amplitude is a sensitive target of this activity. In a separate series of experiments, we compared the voltage dependence of the Ca^{2+} current properties between VSP-negative and VSP-positive fibers (Fig. S3). Results provided again no indication that the peak amplitude and also the time to peak of the current would differ between VSP-negative fibers and Ci-VSP- and Dr-VSP-expressing fibers. Regarding the mean values for the time constant of current decay, they did not

significantly differ between VSP-negative fibers and either Ci-VSP- or Dr-VSP-expressing fibers. Values were, however, significantly larger in Ci-VSP-expressing fibers than in Dr-VSP-expressing fibers at 20 ($P = 0.039$), 30 ($P = 0.009$), and 40 mV ($P = 0.003$). Because Ci-VSP would be activated to some extent at these voltages, this may be an indication that Ca^{2+} current inactivation is sensitive to the consequences of the phosphatase activity.

PtdIns(4,5) P_2 level after depolarization of Ci-VSP-expressing fibers

To explicitly assess in our conditions the ability of VSP activation to deprive plasma membrane PtdIns(4,5) P_2 , we coexpressed Ci-VSP (using the pIRE5-EGFP plasmid) together with the PtdIns(4,5) P_2 -selective PLC δ_1 -PH domain (Stauffer et al., 1998; Várnai and Balla, 1998) tagged with mRFP, and we followed the corresponding changes in fluorescence upon membrane depolarization. For simplicity, we will refer to PLC δ_1 -PH-mRFP fluorescence as “mRFP fluorescence.” Fig. 9 A shows confocal images of GFP and of mRFP fluorescence from such a co-transfected muscle fiber. The enlarged view of the mRFP fluorescence on the right, together with the graph below which is reporting the fluorescence intensity along a rectangular region of interest, clearly shows that mRFP yielded a characteristic triadic pattern, namely double-banded transverse-oriented striations spaced by ~ 2 μm . The closed circles in Fig. 9 B show the time course of change in mRFP fluorescence averaged over an entire given area of the fiber while applying 5-s-long depolarizing pulses according to the protocol shown on top; for this, a confocal x,y image was taken every 1.97 s. The sequence of images at lower resolution is presented as Video 1. The open circles in Fig. 9 B show the time course of change in mRFP fluorescence measured afterward,

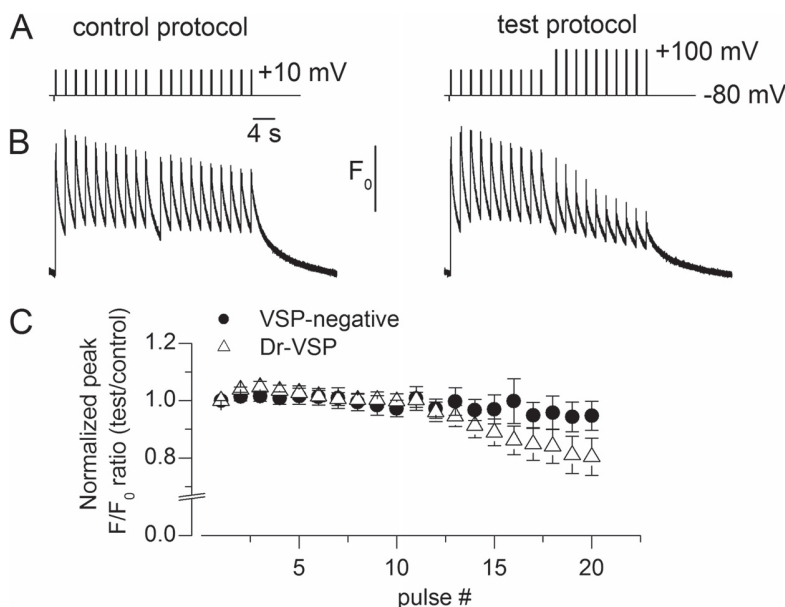


Figure 7. Ca^{2+} transients in response to trains of depolarizing steps in Dr-VSP-expressing fibers. (A) Control and test voltage-pulse protocols. (B) Rhod-2 F/F_0 traces recorded in response to the protocols shown in A in a Dr-VSP-positive fiber. (C) Mean values for the normalized ratio of peak F/F_0 during the test record to the corresponding peak F/F_0 during the control record, versus the pulse number in Dr-VSP-positive fibers ($n = 7$). Mean values for VSP-negative fibers are the same as in Fig. 4. Error bars represent \pm SEM.

over a nearby fiber area, while no pulse was applied. Although we tried to keep laser excitation as low as possible, there was quite substantial mRFP photobleaching over time. Nevertheless, on top of photobleaching, clear positive changes in fluorescence were triggered by the largest depolarizing pulses. In Fig. 9 C, the time course of change in fluorescence associated with the depolarizing pulse protocol was corrected for photobleaching. To do so, values were divided by the time-corresponding ones in the subsequent record taken when no pulse was applied (closed circles in Fig. 9 C). As an alternative, a two-exponential function was fitted to the time course of baseline decay in fluorescence in the series of measurements taken while the voltage steps were applied; for this, only the 20 first and 20 last values in the trial were used for the fit. From this, a synthetic series of decaying values was generated (superimposed line plot in Fig. 9 B), which was then used to normalize fluorescence values associated with the depolarizing pulses. The result

from this correction is shown as open circles in Fig. 9 C. The two correction procedures provided a very similar result: there was a clear transient rise in mRFP fluorescence in response to the pulses to 50, 90, and 110 mV. Identical measurements performed in three fibers isolated from a muscle expressing only the PLC δ_1 -PH domain and not the VSP showed absolutely no change in fluorescence upon membrane depolarization (not depicted).

A quantitative estimate of the kinetics of the depolarization-induced changes in mRFP fluorescence was made by fitting a single-exponential function to the time course of fluorescence increase upon membrane depolarization and of fluorescence recovery after membrane repolarization, when this could be reliably performed. This was intended to only provide an order of magnitude of the rate of changes, as photobleaching correction could not be perfectly accurate and corrupted to some extent the kinetics of voltage-induced mRFP changes. The time constant of rise estimated from data collected from four

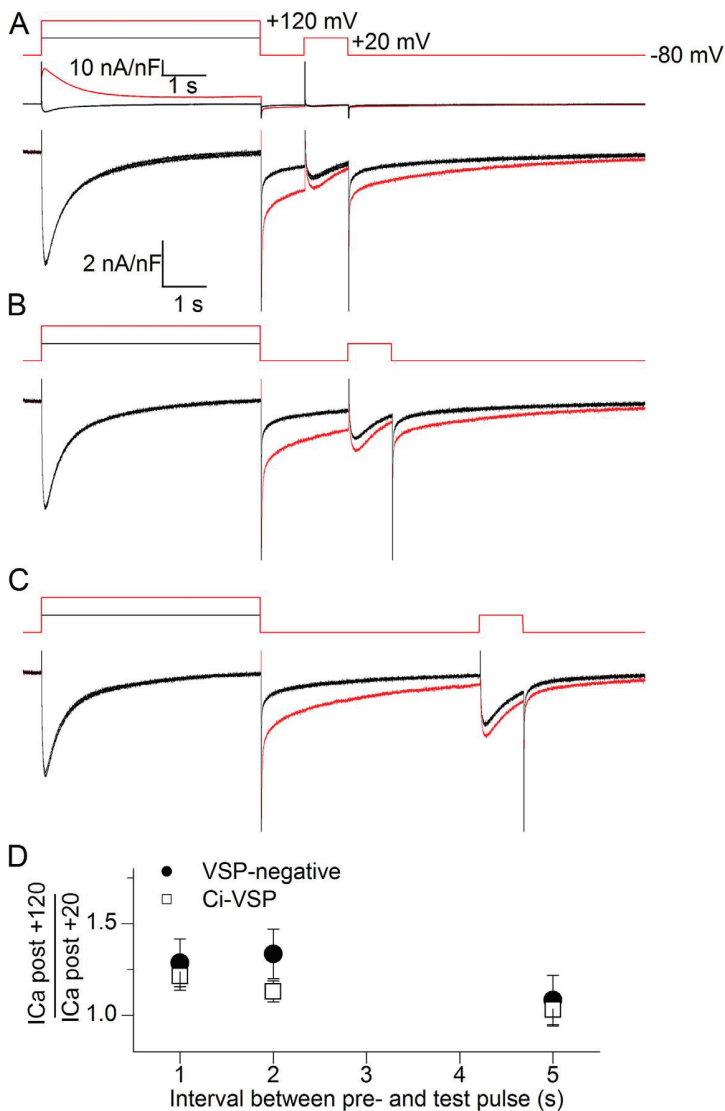


Figure 8. Ca²⁺ current after strong depolarizing pulses in Ci-VSP-expressing fibers. In each panel, top traces show the two voltage-pulse protocols that were applied to the fiber; the protocol with prepulse to 120 mV (test) was bracketed by two protocols with prepulse to 20 mV (controls). (A–C) Superimposed membrane current records in response to the above shown protocols. Currents recorded during the two control protocols are in black, whereas current elicited by the test protocol is presented in red. In A, records are presented at both low (top) and high magnification (bottom). In B and C, only the high magnification views are presented. (D) Mean values for the ratio of Ca²⁺ current amplitude after the prepulse to 120 mV to its amplitude after the prepulse to 20 mV; values are plotted versus the pulse interval between the pre- and test pulses. Results are from seven VSP-negative and eight Ci-VSP-positive fibers. Error bars represent \pm SEM.

fibers challenged with a 20-s-long depolarizing pulse to 40 or 50 mV and to 100 or 110 mV was 14.8 ± 4 s and 7.5 ± 2 s, respectively. The time constant of mRFP fluorescence recovery after membrane repolarization was 14.3 ± 4.5 s after a pulse to 40 or 50 mV ($n = 5$) and 13.9 ± 3 s after a pulse to 90–110 mV ($n = 6$), respectively. The fact that the rate of rise increased with the amplitude of the depolarizing pulse further supports the conclusion that this signal results from voltage-evoked VSP enzyme activity. It is also worth noting that the rate of rise of the mRFP signal upon strong depolarization is much slower than the kinetics of Ca^{2+} release. This confirms our postulate (in relation with Fig. 3) that during a sustained depolarization, $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ becomes substantially depleted at a time when Ca^{2+} release is very low.

Spatially segregated distinct changes in $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ after Ci-VSP activation

Careful viewing of Video 1 reveals that the striated pattern of mRFP fluorescence tends to vanish during the strong depolarizing pulses. This effect of membrane depolarization upon the spatial distribution of mRFP fluorescence is examined in Fig. 10. Fig. 10 A shows three confocal

images of mRFP fluorescence taken from another fiber before, during, and after a 5-s-long pulse to 50 mV. The corresponding whole sequence of successive images is presented as Video 2. The graph below each image in Fig. 10 A shows the fluorescence intensity profile along the highlighted rectangular area (Fig. 10 A, left). During the depolarizing pulse, the average fluorescence was slightly increased, accompanied by a clear attenuation of the transverse triadic profile, a phenomenon that was reversible after membrane repolarization. The fluorescence intensity at a given location of the profile during the pulse (Fluo+50) was subtracted from its corresponding initial/resting intensity before the pulse (Fluo-80(1)), and the difference is plotted versus the initial fluorescence intensity (Fluo-80(1)) in the left panel of Fig. 10 B. The result shows a clear negative slope with the difference being positive for the lowest levels of initial/resting fluorescence intensity and negative for the largest. According to the standard interpretation of the banded intensity profile, within the limits of the confocal resolution (with respect to triadic membrane compartment versus cytosolic volume), lowest values of initial/resting fluorescence are likely to report a

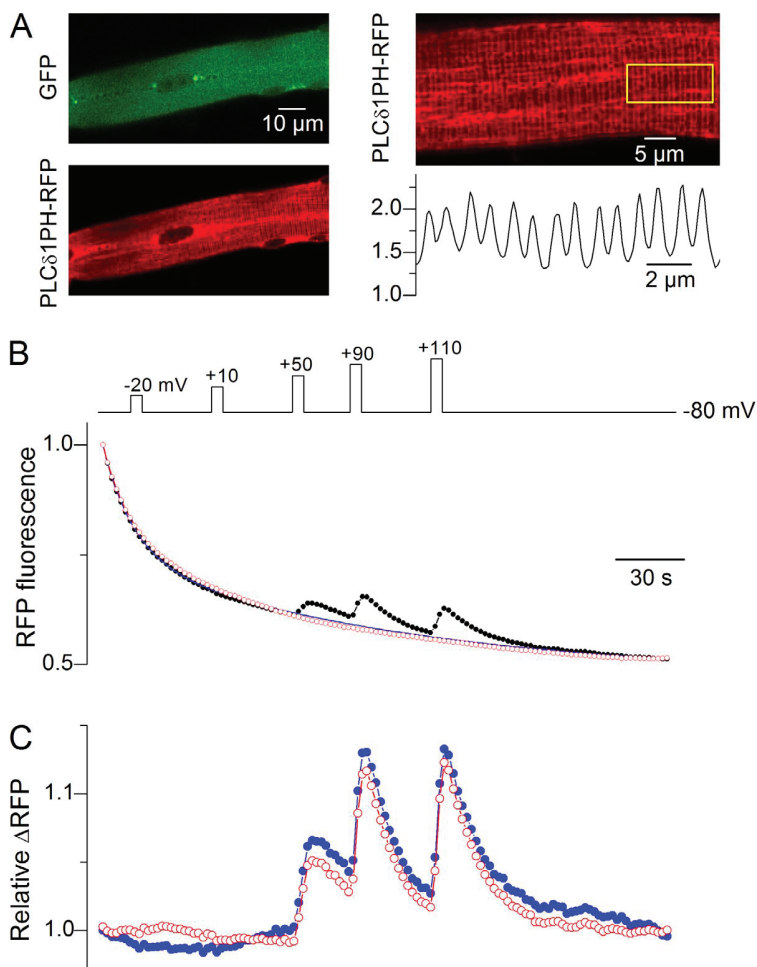


Figure 9. $\text{PLC}\delta_1\text{PH-mRFP}$ fluorescence in fibers expressing Ci-VSP. (A) Confocal images of a portion of a muscle fiber expressing Ci-VSP using the pIRES-EGFP plasmid and $\text{PLC}\delta_1\text{PH-mRFP}$. The image on the right shows the $\text{PLC}\delta_1\text{PH-mRFP}$ fluorescence at higher magnification, and the graph below shows the fluorescence profile along the longitudinal axis of the highlighted rectangular region (yellow box). (B) Time course of change in $\text{PLC}\delta_1\text{PH-mRFP}$ fluorescence averaged over a given area of the fiber while applying 5-s-long depolarizing pulses according to the protocol shown on top (closed circles); superimposed time course of change in $\text{PLC}\delta_1\text{PH-mRFP}$ fluorescence measured subsequently over a nearby fiber area while no pulse was applied (open circles); synthetic trace generated from a two-exponential fit to the closed-circles record, using only the 20 first and 20 last values in the record for the fit (line). (C) Changes in fluorescence associated with the depolarizing pulse protocol after normalization by the record taken when no pulse was applied (closed circles); changes in fluorescence associated with the depolarizing-pulse protocol after normalization by the synthetic record (open circles).

dominant cytosolic contribution, whereas highest values should encompass a more important triadic membrane contribution, which we will assume here to correspond to the transverse tubule. Accordingly, the depolarizing pulse induces a depression of transverse tubule-bound mRFP and an increase in cytosolic mRFP, consistent with translocation of the probe from the transverse tubule into the cytosol, most likely reporting reduction of transverse tubule PtdIns(4,5)P₂ level. In the right graph of Fig. 10 B, the fluorescence intensity at a given location of the profile during the pulse (Fluo+50) was subtracted from the corresponding intensity after the pulse (Fluo-80(2)) and the difference plotted versus the post-pulse fluorescence intensity (Fluo-80(2)). The result is very similar to the one in the left graph, consistent with return of the probe to the transverse tubule membrane upon membrane repolarization.

This spatially distinct effect of strong depolarizing pulses on mRFP fluorescence is examined in an alternative

way in Fig. 10 C; here, the analysis shown in Fig. 9 (B and C) was performed using either only the high intensity pixels in the initial/resting image (which should report a larger transverse tubule contribution) or only low intensity pixels (which should report a larger cytosolic contribution). Consistently, in response to the strong depolarizing pulses, pixels of high initial intensity tended to experience a transient decrease in fluorescence in contrast to pixels of low initial intensity. A similar analysis was successfully achieved in three out of four muscle fibers that were challenged by this same pulse protocol. Fig. 10 D shows the mean relative peak change in mRFP fluorescence versus membrane potential calculated using either all pixels in the images or using only high intensity or low intensity initial pixels. Collectively, these results appear very consistent with voltage-activated translocation of the PLCδ₁-PH probe from the triad into the cytosol, with a voltage dependence similar to that of Ci-VSP activation.

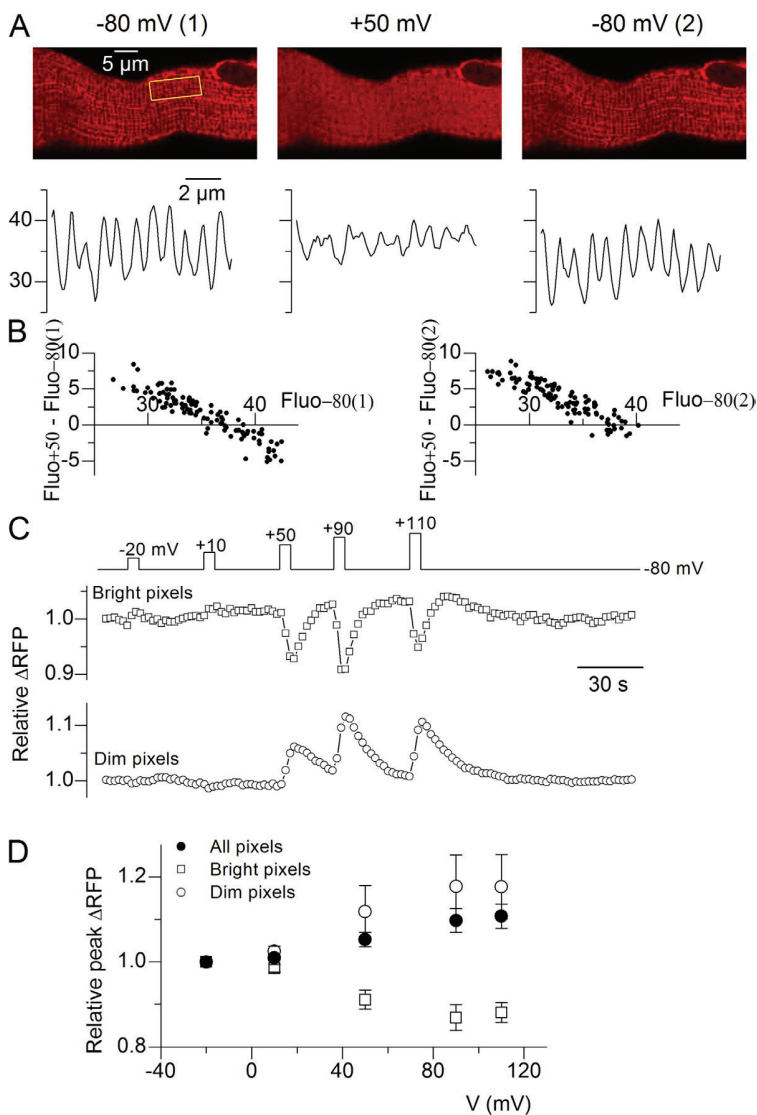


Figure 10. Spatially segregated distinct changes in PLCδ₁-PH-mRFP fluorescence upon strong membrane depolarization in fibers expressing Ci-VSP. (A) Confocal images of a portion of a muscle fiber expressing Ci-VSP and PLCδ₁-PH-mRFP. Images from left to right were taken before, during, and after a 5-s-long depolarizing pulse to 50 mV, respectively. The graph below each image shows the fluorescence intensity profile along the rectangular area highlighted in the image on the left. (B; left graph) Difference between the intensity at a given location of the fluorescence profile during the pulse (Fluo+50) and its corresponding intensity before the pulse (Fluo-80(1)) versus Fluo-80(1). (Right graph) Difference between the intensity at a given location of the fluorescence profile during the pulse (Fluo+50) and its corresponding intensity after the pulse (Fluo-80(2)) versus Fluo-80(2). (C) Result of the analysis similar to that shown in Fig. 9 C, except that pixels with high initial intensity and low initial intensity were separated; pixel selection was achieved by adjusting manually the threshold tool in ImageJ in the first image of the sequence. (D) Mean relative peak change in PLCδ₁-PH-mRFP fluorescence versus membrane potential calculated from three fibers that experienced the pulse protocol shown in C; closed circles, open squares, and open circles correspond to values obtained using all, high intensity, and low intensity initial pixels, respectively. Error bars represent ± SEM.

One unclear feature of the mRFP signal is that if PLC δ_1 -PH molecules simply translocate from membrane to cytosol, no change in the global fluorescence should occur. As there is no reason for the number of PH molecules available in the fibers to increase in response to the large depolarizing pulses, there has to be nonlinearity in the system that makes the fluorescence increase. We have no clear-cut explanation for this yet. There are two factors that may contribute to this effect. One possibility is that changes in the local microenvironment experienced by mRFP upon translocation from membrane to cytosol modify its fluorescence properties, as was suggested for PH constructs with CFP, YFP, or GFP (van der Wal et al., 2001), although the changes observed by these authors corresponded to a decreased intensity upon translocation to the cytosol. Another possibility is that the fluorescence intensity from the PH domain molecules bound to the transverse tubule membrane at rest underestimates its actual concentration; this could be enhanced by the fact that the confocal imaging system detects essentially the fluorescence from the cytosol, even in the regions of higher resting fluorescence, which we assume correspond to the transverse tubules.

Change in PtdIns(4,5)P₂ after Ci-VSP activation by a train of depolarizing steps

It was of specific interest to determine whether the pulse-train protocol that we used to assess the effect of VSP activation on voltage-activated Ca²⁺ release (Fig. 4) induced a detectable change of the PLC δ_1 -PH-mRFP signal. Fig. 11 A shows mRFP fluorescence traces taken successively on the same fiber while applying, from left to right, the test protocol, no pulse protocol, the control protocol, and the test protocol again. Fluorescence was measured using the line-scan mode of the microscope (1 line per 11.4 ms). In the absence of pulses and also during the control-pulse protocol, the fluorescence

exhibited only a progressive decay. In contrast, the series of pulses to 100 mV during the test protocol were clearly associated with a transient increase of the fluorescence. The rightmost trace in Fig. 11 A was calculated by simply dividing the sum of the two traces taken during a test protocol by the sum of the two other traces. Fig. 11 B shows the mean (\pm SEM) change in fluorescence measured in four fibers during the test protocol: in each fiber, the fluorescence record during the test protocol was processed as in Fig. 11 A, using bracketing traces recorded while either applying no pulse and/or while applying a control protocol. Results clearly indicate the efficiency of the series of pulses to 100 mV to mobilize the PtdIns(4,5)P₂-binding probe.

DISCUSSION

We used VSP as a tool to deplete PtdIns(4,5)P₂ in the sarcolemma and transverse tubule membrane of skeletal muscle fibers. Results show that VSP can be expressed by *in vivo* electroporation in mouse muscle without disturbing the basic morphological and functional properties of the muscle fibers. VSP expresses and is active in the transverse tubule membrane of the transfected muscle fibers. PtdIns(4,5)P₂ visualized by expression of mRFP-tagged PLC δ_1 -PH domain also localizes to the transverse tubule membrane. Activating VSP alters the localization of the PLC δ_1 -PH domain in a way that is consistent with its translocation to the cytosol. Activating VSP reduces SR Ca²⁺ release during depolarizing pulses. This last point is the new message: PtdIns(4,5)P₂ depletion depresses calcium release.

Although an absolute quantification of the extent of VSP activation-induced PtdIns(4,5)P₂ depletion in the transverse tubule membrane was not possible with the mRFP probe, the quite extensive disappearance of the spatial distribution of the mRFP signal triggered by strong

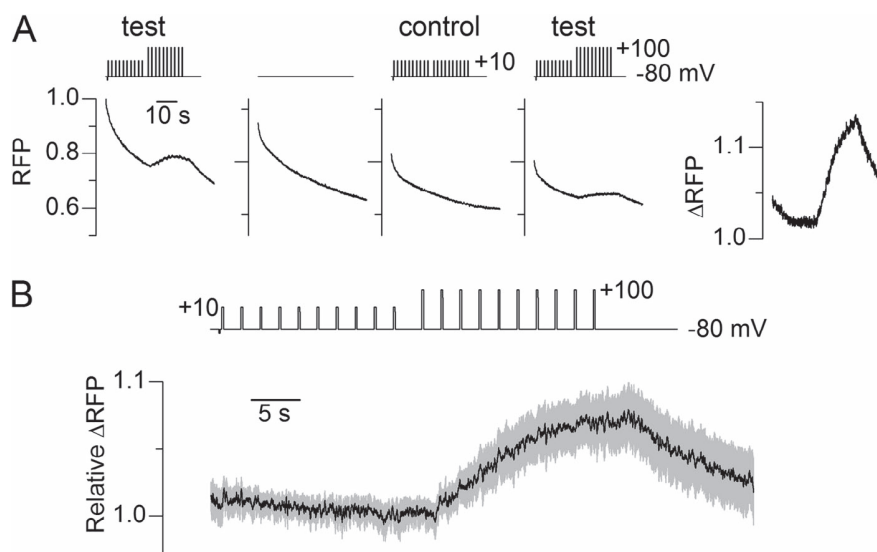


Figure 11. Changes in PLC δ_1 -PH-mRFP fluorescence in Ci-VSP-expressing fibers during the train of depolarizing steps protocol. (A) PLC δ_1 -PH-mRFP fluorescence detected in a fiber successively challenged by the above shown voltage-pulse protocols; fluorescence was measured in line-scan mode. The rightmost trace corresponds to the ratio of the sum of the two traces taken during a test train-pulse protocol and the sum of the two other traces. (B) Mean (\pm SEM; gray shading) change in fluorescence during the test protocol ($n = 4$); in each fiber, the fluorescence record during the test protocol was normalized by bracketing traces recorded while either applying no pulse or while applying a control protocol.

depolarizing pulses is likely to correlate with a substantial reduction of the membrane-bound PtdIns(4,5)P₂ level. One other quite remarkable feature of this signal is its transient nature with recovery occurring with a time constant in the 10-s range, which appears independent of the VSP-activating voltage. Assuming PtdIns(4)P to be the main PtdIns(4,5)P₂ precursor in the plasma membrane, this indicates that the transverse tubule membrane of muscle fibers is well equipped with PtdIns 5 kinase activity to face PtdIns(4,5)P₂ depletion and reconstitute the pool.

Upon depolarization VSPs dephosphorylate the 5' position of PtdIns(3,4,5)P₃ and PtdIns(4,5)P₂ and the 3' position of PtdIns(3,4)P₂ (Kurokawa et al., 2012). In the present conditions, we tend to favor PtdIns(4,5)P₂ as the active molecule because of its rich history of function in regulating ion channels and transporters in the plasma membrane of various cell types, and also because of our results with the PtdIns(4,5)P₂-selective PLCδ₁PH probe. However, we cannot exclude a possible contribution from the two other substrates.

Another point that is worth stressing is that although we assumed that VSP was negligibly activated during pulses to 20 mV, this was likely not entirely the case, specifically with Ci-VSP, which yielded the most negative voltage dependence. However, because our major aim was to compare Ca²⁺ release during strong VSP activation to Ca²⁺ release without (or with less) VSP activation in a same muscle fiber, Ca²⁺ release needed to be maximally activated with respect to its voltage dependence in both cases; so, pulses to 10 or 20 mV were required in the non-VSP-activating situation.

The question of how Ca²⁺ release can be affected by PtdIns(4,5)P₂ depletion is then the upcoming challenge. Although we are tempted to dismiss a role of PtdIns(4,5)P₂ as precursor of the Ca²⁺-mobilizing molecule Ins(1,4,5)P₃ because of the lines of evidence denying a role for this pathway in the control of E-C coupling-related Ca²⁺ signals in differentiated muscle fibers (see Foster, 1994; Blaauw et al., 2012), we cannot unequivocally reject the possibility of a contribution of this process to the VSP effect we observe.

The alternative is to consider an interaction of PtdIns(4,5)P₂ with a protein partner of the E-C coupling machinery. Interestingly, in the 1990s several studies using skinned fibers, SR membrane preparations, and RyR channels incorporated into a phospholipid bilayer showed that RyR1 activity and Ca²⁺ release could be directly triggered or enhanced by PtdIns(4,5)P₂ (Kobayashi et al., 1989; Ogawa and Harafuji, 1989; Chu and Stefani, 1991; Ohizumi et al., 1999). Although no clear correlate was given as to how PtdIns(4,5)P₂ could act under physiological conditions, results emphasized that PtdIns(4,5)P₂ either would be active because it is present in the SR membrane, or could somehow be released from the transverse tubule to the SR membrane upon muscle

stimulation (Chu and Stefani, 1991). Under our conditions, VSP activation depletes PtdIns(4,5)P₂ in the transverse tubule membrane, and the possibility that PtdIns(4,5)P₂ could rapidly shuttle from the transverse tubule to the SR terminal cisternae upon cell depolarization seems unlikely. Nevertheless, given the close apposition between the DHPR and RyR1, one could propose that PtdIns(4,5)P₂ may either interact with a cytoplasmic region of RyR1 that is close to the transverse tubule membrane, or sneak into the molecular interactions that make Cav1.1 control RyR1 opening.

Cav1.1 could be the potential target, as PtdIns(4,5)P₂ has been shown to regulate the activity of other voltage-gated Ca²⁺ channels (e.g., Suh et al., 2010), potentially through a dual interaction with a fatty acid-binding site on a transmembrane part of the channel and a cytoplasmic part of the channel (see Suh et al., 2012). Our present results provide no indication that Cav1.1 Ca²⁺ channel activity is strongly affected by VSP activation. However, it could still be that depletion of transverse tubule PtdIns(4,5)P₂ affects Cav1.1–RyR1 interaction in a subtle way that preserves the voltage-dependent Ca²⁺ channel activity.

Alternatively, PtdIns(4,5)P₂ could also be thought to act as a docking target for another protein capable of enhancing the efficiency of depolarization-induced SR Ca²⁺ release. For instance, annexin VI, which was initially presumed to modify the activity of the Ca²⁺ release channel from the SR luminal side, was then shown to be attached to transverse tubule membrane in isolated triads, likely because of its PtdIns(4,5)P₂-binding properties (Barrientos and Hidalgo, 2002). Also dysferlin, a transverse tubule membrane protein present at triadic junctions presumably in association with the DHPR, was recently shown to contribute to Ca²⁺ homeostasis (Kerr et al., 2013), and is also known to interact with PtdIns(4,5)P₂ (Therrien et al., 2009).

The modulation of Ca²⁺ release by transverse tubule PtdIns(4,5)P₂ level may be relevant under particular physiological or pathological conditions. PtdIns(4,5)P₂ is a substrate for phospholipase C and for type 1 PtdIns-3 kinase, making it an inescapable target in several signaling cascades; there is thus the possibility that specific conditions of activation of either or both of these enzymes does modify the transverse tubule PtdIns(4,5)P₂ content so as to modulate Ca²⁺ release. The plasma membrane level of PtdIns(4,5)P₂ was also shown to be increased by hyperosmolarity in several cell types including cardiac cells (Nasuhoglu et al., 2002), which may occur in skeletal muscle during high intensity exercise (Lindinger et al., 1992). The potential for alteration in phosphoinositide metabolism to trigger specific muscle diseases was demonstrated by the fact that deficiency in the phosphatidylinositol-phosphate Mtm1 is responsible for myotubular myopathy (Taylor et al., 2000). Interestingly, there is strong evidence that defective SR Ca²⁺ release is primarily involved in this

disease (Al-Qusairi et al., 2009; Rodríguez et al., 2014). Collectively, our results demonstrate the potential offered by expression of VSPs in adult muscle fibers to investigate signaling mechanisms dependent on plasma membrane phosphoinositides and suggest that voltage-activated SR Ca^{2+} release is enhanced by the presence of $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ in the transverse tubule membrane.

We are grateful to Dr. Tamas Balla for providing us the $\text{PLC}\delta_1\text{PH-mRFP}$ construct. We thank Ms. Megumi Kobahashi for generating the GFP-tagged Dr-VSP construct; Thomas Loustau for performing early preliminary experiments; Jimmy Perrot for technical help; Bruno Allard for critical comments on the manuscript; and Bruno Allard, Pierre Charnet, and Norbert Weiss for helpful discussion.

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique and Université Lyon 1 to Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, and by a grant from Association Française contre les Myopathies to V. Jacquemond (AFM no. 15677).

The authors declare no competing financial interests.

Eduardo Ríos served as editor.

Submitted: 23 October 2014

Accepted: 5 March 2015

REFERENCES

- Al-Qusairi, L., N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A.H. Beggs, B. Allard, J.L. Mandel, et al. 2009. T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:18763–18768. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0900705106>
- Barrientos, G., and C. Hidalgo. 2002. Annexin VI is attached to transverse-tubule membranes in isolated skeletal muscle triads. *J. Membr. Biol.* 188:163–173. <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-001-0179-x>
- Blaauw, B., P. Del Piccolo, L. Rodriguez, V.H. Hernandez Gonzalez, L. Agatea, F. Solagna, F. Mammano, T. Pozzan, and S. Schiaffino. 2012. No evidence for inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} release in isolated fibers of adult mouse skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 140:235–241. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201110747>
- Casas, M., R. Figueroa, G. Jorquera, M. Escobar, J. Molgó, and E. Jaimovich. 2010. IP_3 -dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 136:455–467. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200910397>
- Cheng, H., W.J. Lederer, and M.B. Cannell. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 262:740–744. <http://dx.doi.org/10.1126/science.8235594>
- Chu, A., and E. Stefani. 1991. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum terminal cisternal membranes. Ca^{2+} flux and single channel studies. *J. Biol. Chem.* 266:7699–7705.
- Collet, C., L. Csernoch, and V. Jacquemond. 2003. Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and mdx mice. *Biophys. J.* 84:251–265. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74846-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74846-2)
- Collet, C., S. Pouvreau, L. Csernoch, B. Allard, and V. Jacquemond. 2004. Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under “silicone voltage-clamp” conditions. *Cell Biochem. Biophys.* 40:225–236. <http://dx.doi.org/10.1385/CBB:40:2:225>
- Dulhunty, A.F. 2006. Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33:763–772. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04441.x>
- Foster, P.S. 1994. The role of phosphoinositide metabolism in Ca^{2+} signalling of skeletal muscle cells. *Int. J. Biochem.* 26:449–468. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-711X\(94\)90001-9](http://dx.doi.org/10.1016/0020-711X(94)90001-9)
- Hossain, M.I., H. Iwasaki, Y. Okochi, M. Chahine, S. Higashijima, K. Nagayama, and Y. Okamura. 2008. Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish voltage-sensing phosphatases. *J. Biol. Chem.* 283:18248–18259. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M706184200>
- Jacquemond, V. 1997. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73:920–928. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78124-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78124-4)
- Jorquera, G., F. Altamirano, A. Contreras-Ferrat, G. Almarza, S. Buvinic, V. Jacquemond, E. Jaimovich, and M. Casas. 2013. Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *J. Cell Sci.* 126:1189–1198. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.116855>
- Kerr, J.P., A.P. Ziman, A.L. Mueller, J.M. Muriel, E. Kleinhans-Welte, J.D. Gumerson, S.S. Vogel, C.W. Ward, J.A. Roche, and R.J. Bloch. 2013. Dysferlin stabilizes stress-induced Ca^{2+} signaling in the transverse tubule membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110:20831–20836. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1307960110>
- Kobayashi, M., A. Muroyama, and Y. Ohizumi. 1989. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:1487–1491. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91147-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(89)91147-9)
- Kurokawa, T., S. Takasuga, S. Sakata, S. Yamaguchi, S. Horie, K.J. Homma, T. Sasaki, and Y. Okamura. 2012. $3'$ Phosphatase activity toward phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [$\text{PI}(3,4)\text{P}_2$] by voltage-sensing phosphatase (VSP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109:10089–10094. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203799109>
- Lefebvre, R., C. Legrand, E. González-Rodríguez, L. Groom, R.T. Dirksen, and V. Jacquemond. 2011. Defects in Ca^{2+} release associated with local expression of pathological ryanodine receptors in mouse muscle fibres. *J. Physiol.* 589:5361–5382. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2011.216408>
- Lefebvre, R., C. Legrand, L. Groom, R.T. Dirksen, and V. Jacquemond. 2013. Ca^{2+} release in muscle fibers expressing R4892W and G4896V type 1 ryanodine receptor disease mutants. *PLoS ONE*. 8:e54042. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054042>
- Legrand, C., E. Giacomello, C. Berthier, B. Allard, V. Sorrentino, and V. Jacquemond. 2008. Spontaneous and voltage-activated Ca^{2+} release in adult mouse skeletal muscle fibres expressing the type 3 ryanodine receptor. *J. Physiol.* 586:441–457. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145862>
- Lindinger, M.I., G.J. Heigenhauser, R.S. McKelvie, and N.L. Jones. 1992. Blood ion regulation during repeated maximal exercise and recovery in humans. *Am. J. Physiol.* 262:R126–R136.
- Melzer, W., A. Herrmann-Frank, and H.C. Lüttgau. 1995. The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta*. 1241:59–116. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)00014-5](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4157(94)00014-5)
- Murata, Y., H. Iwasaki, M. Sasaki, K. Inaba, and Y. Okamura. 2005. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature*. 435:1239–1243. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03650>
- Nasuhoglu, C., S. Feng, Y. Mao, I. Shammatt, M. Yamamoto, S. Earnest, M. Lemmon, and D.W. Hilgemann. 2002. Modulation of cardiac PIP_2 by cardioactive hormones and other physiologically relevant interventions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283:C223–C234. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00486.2001>
- Ogawa, Y., and H. Harafuji. 1989. Ca-release by phosphoinositides from sarcoplasmic reticulum of frog skeletal muscle. *J. Biochem.* 106:864–867.

- Ohizumi, Y., Y. Hirata, A. Suzuki, and M. Kobayashi. 1999. Two novel types of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77:276–285. <http://dx.doi.org/10.1139/y99-017>
- Pouvreau, S., and V. Jacquemond. 2005. Nitric oxide synthase inhibition affects sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in skeletal muscle fibres from mouse. *J. Physiol.* 567:815–828. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2005.089599>
- Pouvreau, S., L. Csernoch, B. Allard, J.M. Sabatier, M. De Waard, M. Ronjat, and V. Jacquemond. 2006. Transient loss of voltage control of Ca^{2+} release in the presence of maurocalcine in skeletal muscle. *Biophys. J.* 91:2206–2215. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.078089>
- Ríos, E., G. Pizarro, and E. Stefani. 1992. Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* 54:109–133. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.000545>
- Rodríguez, E.G., R. Lefebvre, D. Bodnár, C. Legrand, P. Szentesi, J. Vincze, K. Poulard, J. Bertrand-Michel, L. Csernoch, A. Buj-Bello, and V. Jacquemond. 2014. Phosphoinositide substrates of myotubularin affect voltage-activated Ca^{2+} release in skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 466:973–985. <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1346-5>
- Sakata, S., M.I. Hossain, and Y. Okamura. 2011. Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. *J. Physiol.* 589:2687–2705. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2011.208165>
- Schneider, M.F. 1994. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu. Rev. Physiol.* 56:463–484. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002335>
- Stauffer, T.P., S. Ahn, and T. Meyer. 1998. Receptor-induced transient reduction in plasma membrane $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* 8:343–346. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70135-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70135-6)
- Suh, B.C., K. Leal, and B. Hille. 2010. Modulation of high-voltage activated Ca^{2+} channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron.* 67:224–238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.001>
- Suh, B.C., D.I. Kim, B.H. Falkenburger, and B. Hille. 2012. Membrane-localized β -subunits alter the PIP_2 regulation of high-voltage activated Ca^{2+} channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:3161–3166. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1121434109>
- Taylor, G.S., T. Maehama, and J.E. Dixon. 2000. Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:8910–8915. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.160255697>
- Therrien, C., S. Di Fulvio, S. Pickles, and M. Sinnreich. 2009. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry.* 48:2377–2384. <http://dx.doi.org/10.1021/bi802242r>
- Tjondrokoesoemo, A., N. Li, P.H. Lin, Z. Pan, C.J. Ferrante, N. Shirokova, M. Brotto, N. Weisleder, and J. Ma. 2013. Type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor activates ryanodine receptor 1 to mediate calcium spark signaling in adult mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 288:2103–2109. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.425975>
- Treves, S., M. Vukcevic, M. Maj, R. Thurnheer, B. Mosca, and F. Zorzato. 2009. Minor sarcoplasmic reticulum membrane components that modulate excitation-contraction coupling in striated muscles. *J. Physiol.* 587:3071–3079. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171876>
- van der Wal, J., R. Habets, P. Várnai, T. Balla, and K. Jalink. 2001. Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 276:15337–15344. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007194200>
- Várnai, P., and T. Balla. 1998. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: Calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[^3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J. Cell Biol.* 143:501–510. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.143.2.501>
- Weiss, N., C. Legrand, S. Pouvreau, H. Bichraoui, B. Allard, G.W. Zamponi, M. De Waard, and V. Jacquemond. 2010. In vivo expression of G-protein $\beta\gamma$ 2 dimer in adult mouse skeletal muscle alters L-type calcium current and excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* 588:2945–2960. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191593>
- Yamaguchi, S., T. Kurokawa, I. Taira, N. Aoki, S. Sakata, Y. Okamura, and K.J. Homma. 2014. Potential role of voltage-sensing phosphatases in regulation of cell structure through the production of $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$. *J. Cell. Physiol.* 229:422–433. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24463>

Berthier et al., <http://www.jgp.org/cgi/content/full/jgp.201411309/DC1>

Intramembrane charge movement in VSP-negative and VSP-positive fibers

Membrane currents were measured in response to 100-ms-long depolarizing pulses of increasing amplitude. The holding potential was set to 0 mV to annihilate or at least limit the contribution of currents caused by voltage-gated ion channels (including the DHPR voltage-sensing and Ca²⁺-conducting activities) that otherwise would have completely precluded detection of intramembrane charge movement at the large depolarizing levels necessary to activate the VSPs. Although we are aware that taking measurements from fibers held at 0 mV may somewhat negatively shift the voltage dependence of VSP charge as compared with a standard -80-mV holding potential (see Villalba-Galea et al., 2008), there was hardly any alternative way this could be achieved in this preparation.

Fig. S1 (A–C) shows examples of membrane current traces, processed as described in Materials and methods to extract charge movement, from a VSP-negative fiber, a Ci-VSP-positive fiber, and a Dr-VSP-positive fiber, respectively. The inset in each panel shows the corresponding voltage dependence of the amount of on and off charge normalized to cell capacitance. Fig. S1 A illustrates the fact that VSP-negative fibers yielded small nonlinear transient currents at the onset and termination of the pulse. Similar transient changes were present in previously published records of membrane current from depolarized levels in muscle fibers (e.g., Fahlke and Rüdell, 1995; DiFranco et al., 2011). These currents were of opposite polarity from those anticipated from VSP function, and the amount of charge in the on component always exceeded the one in the off. These currents were not the result of erroneous subtraction of gating charge in the control pulses, as these were made positive to avoid contamination from charge 2 (Brum and Rios, 1987). The origin and properties of these currents were not further explored, but because they had to also be present in the VSP-expressing fibers, they contaminated, to some extent, detection of the VSP charge movement. Despite this limitation, Ci-VSP- and Dr-VSP-expressing fibers clearly yielded specific nonlinear currents, respectively positive and negative in terms of the onset and termination of the depolarizing pulses. Fig. S1 D shows the voltage dependence of the mean amount of off charge measured in VSP-negative fibers ($n = 6$), Dr-VSP-positive fibers ($n = 4$), and Ci-VSP-positive fibers ($n = 5$). For quantification, the off was preferred because of the lower amount of contami-

nating current inferred from measurements in VSP-negative fibers. The dependence of charge versus voltage was more positive and the maximum amount of charge was larger in Dr-VSP fibers than in Ci-VSP fibers. Fitting the voltage dependence of charge movement in each fiber with a Boltzmann function gave mean values for Q_{max} (maximal available charge), $V_{0.5}$ (voltage of equal charge distribution), and k (steepness) of 19.3 ± 4.3 nC/ μ F, 59.6 ± 6.2 mV, and 15.7 ± 2.5 mV in Ci-VSP-expressing fibers and 85.4 ± 4.9 nC/ μ F, 89.4 ± 4.2 mV, and 15.6 ± 0.6 mV in Dr-VSP-expressing fibers, respectively. These results are consistent with the voltage-sensing domain of the VSPs being active in the transverse tubule membrane of the transfected muscle fibers. Interestingly, the voltage dependence of Ci-VSP and Dr-VSP gating currents found here is similar to the one reported previously in standard expression systems. For instance, the average mid-activation voltage for Ci-VSP and Dr-VSP was 59.6 and 89.4 mV in the muscle fibers as compared with either 62.9 and 94.3 mV (Hossain et al., 2008) or 55 and 100 mV (Falkenburger et al., 2010) in tsA201 cells, respectively. Furthermore, gating current kinetics were slower in fibers expressing Dr-VSP as compared with fibers expressing Ci-VSP, consistent with previously reported features of the VSPs in tsA201 cells (Hossain et al., 2008). Also interestingly similar was the more robust charge movement detected in Dr-VSP- than in Ci-VSP-expressing cells, by a factor of ~ 2 in the tsA201 cells (Falkenburger et al., 2010) and by a factor of ~ 4 here in the muscle fibers. The codon usage index (CAI) in mammalian cells was found to be higher for Dr-VSP than for Ci-VSP mRNA (CAI = 0.78 vs. 0.69, calculated using mouse codon usage table; Puigbò et al., 2008), which may contribute to the more robust expression of Dr-VSP in mammalian cells. In terms of absolute density, assuming 1.5 charge moving per voltage sensor, the mean maximal amount of charge moved at depolarized voltages would correspond to ~ 800 and $\sim 3,600$ molecules of Ci-VSP and Dr-VSP per μ m² of transverse tubule membrane. Although this is less than the corresponding levels reported in tsA201 cells (four and seven times, respectively; Falkenburger et al., 2010), it is within the order of magnitude or larger than the previously reported density of PtdIns(4,5)P₂ in the transverse tubule membrane of skeletal muscle (435 molecules per μ m²; Milting et al., 1994). Thus, it seems more than reasonable to anticipate that substantial depletion of the transverse tubule PtdIns(4,5)P₂ pool does occur upon VSP activation in this system.

Estimation of the changes in transverse tubule membrane voltage from measurements of di-8-anepps fluorescence

In the silicone voltage-clamp condition, previous measurements with microelectrodes in the silicone-free fiber extremity established that in response to depolarizing or hyperpolarizing pulses of 20–40 mV the membrane voltage reached 90–95% of the command pulse value (Collet et al., 1999). In the present work, in response to large pulses to 100 or 120 mV, the membrane potential could not be expected to stay so close to the command voltage because of large outward potassium currents. To check for the actual membrane voltage reached, we measured the changes in the fluorescence of di-8-anepps in fibers voltage clamped under the same conditions as used in the VSP-expressing fibers. Di-8-anepps fluorescence transients in differentiated muscle fibers are known to arise mostly from the transverse tubule membrane and should thus provide a reliable estimate of the voltage changes experienced by the VSP. Fig. S2 shows the results from these measurements. Fig. S2 (B and D) shows changes in membrane current and in di-8-anepps fluorescence recorded from a fiber stimulated by successive transient voltage-clamp pulses of 500-ms duration from -80 to -60, -40, -20, 0, 40, 80,

and 120 mV (Fig. S2 A). Fig. S2 C shows the line-scan image collected in response to the pulse from -80 to 20 mV. As expected, depolarizing pulses produced a transient decrease in fluorescence, the amplitude of which increased with the pulse amplitude. The inset in Fig. S2 D presents the percent change in di-8-anepps fluorescence measured near the end of the pulse versus the command voltage. The line superimposed to the data points corresponds to the result from fitting a linear relationship to the first three data points (command voltage to -60, -40, and -20 mV for which little, if any, voltage-dependent calcium or potassium conductance was activated). The measured changes in di-8-anepps fluorescence for the largest pulses clearly escaped from this linear relationship. Assuming the transverse tubule membrane voltage being reasonably close to the command voltage for values between -80 and -20 mV, we used the linear relationship to estimate the actual membrane voltage reached at each depolarizing level. Fig. S2 E shows corresponding mean values for the estimated transverse tubule membrane voltage (estimated V) versus the command voltage from measurements taken in four fibers. According to this analysis, in response to the pulse to 120 mV, the actual membrane

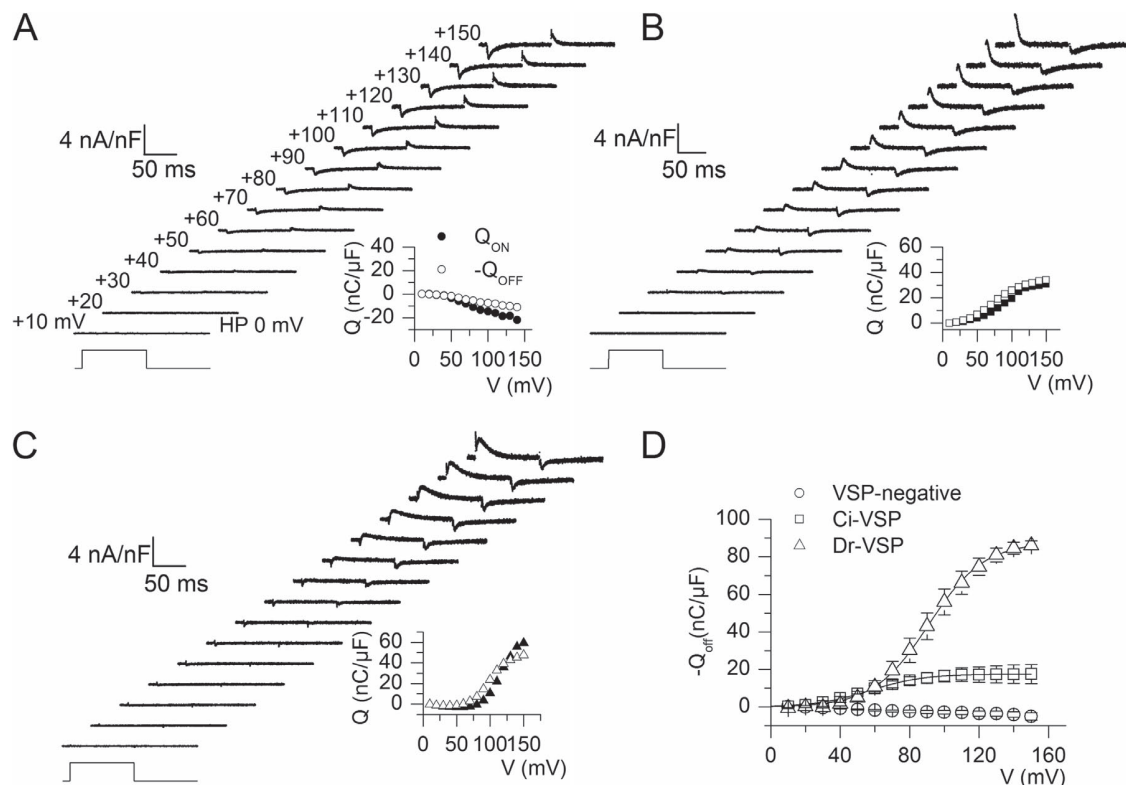


Figure S1. Intramembrane charge movement in VSP-expressing fibers. (A–C) Charge movement traces from a VSP-negative fiber, a Ci-VSP-positive fiber, and a Dr-VSP-positive fiber, respectively. In the three fibers, membrane voltage was stepped from a holding level of 0 mV to the values indicated in A. Insets show the corresponding voltage dependence of the amount of on and off charge. (D) voltage dependence of the mean amount of off charge measured in VSP-negative fibers ($n = 6$), Dr-VSP-positive fibers ($n = 4$), and Ci-VSP-positive fibers ($n = 5$). Error bars represent \pm SEM.

potential was close to 60 mV. This indicates that under these conditions, Ci-VSP was likely not fully activated, and thus the effect we see on Ca^{2+} release may actually be underestimated. This also likely contributes to the fact that Dr-VSP, which exhibits a more positive voltage dependence than Ci-VSP, appeared less effective in depressing Ca^{2+} release.

In a few fibers we also checked how fast the membrane gets depolarized by measuring di-8-anepps fluorescence transients in response to short (20-ms-long) depolarizing pulses using the spot detection mode of the microscope (32-kHz acquisition frequency). Fig. S2

F shows the time course of the command voltage (negatively scaled) and of the di-8-anepps response normalized to the same maximal amplitude. The command pulse was from -80 to 20 V. The di-8-anepps trace corresponds to the average of 10 successive records. The superimposed red portions of traces show the result from fitting a single-exponential function to the decaying and rising phase of the di-8-anepps transient. From similar measurements and analysis taken in seven fibers, mean values for the time constant of decay and of rise of the fluorescence were 0.67 ± 0.33 ms and 0.77 ± 0.4 ms, respectively.

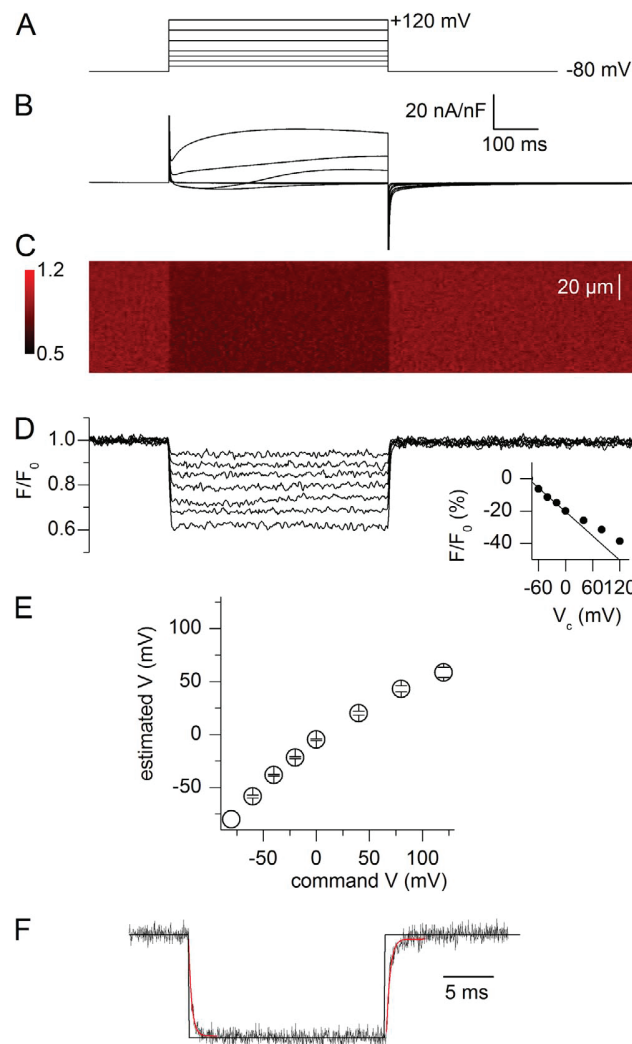


Figure S2. Changes in transverse tubule membrane voltage measured with di-8-anepps in response to voltage-clamp depolarizing pulses. (A) Command voltage pulses applied to the fiber. (B) Corresponding changes in membrane current. (C) Line-scan image of di-8-anepps fluorescence recorded while the command pulse from -80 to 20 mV was applied. (D) Time course of the relative changes in di-8-anepps fluorescence elicited by the pulses shown in A; fluorescence was integrated over the entire image width. In D, the inset shows the percent change in fluorescence measured near the end of the pulses versus the command voltage; a linear function was fitted through the first three data points (superimposed line). (E) Estimated membrane voltage versus applied command voltage (see text for details). Error bars represent \pm SEM. (F) Normalized time course of change in di-8-anepps fluorescence recorded at high temporal resolution (noisy trace) in response to a 20-ms-long depolarizing pulse (clean trace). The red portions of lines correspond to the result from an exponential fit to the rising and decaying phase of the fluorescence transient.

DHPR Ca^{2+} current in VSP-negative and VSP-positive fibers
 Membrane currents were measured in response to 1-s-long depolarizing pulses of increasing amplitude from a holding voltage of -80 mV. Fig. S3 A shows examples of membrane current traces corrected for the linear resistive component from a VSP-negative fiber, a Ci-VSP-positive fiber, and a Dr-VSP-positive fiber. Fig. S2 (B–D) shows mean values for the peak amplitude, time to peak, and time constant of decay of the current in VSP-negative, Ci-VSP-positive, and Dr-VSP-positive fibers. There was no statistically significant difference in any parameter between VSP-negative fibers and either Ci-VSP- or Dr-VSP-expressing fibers.

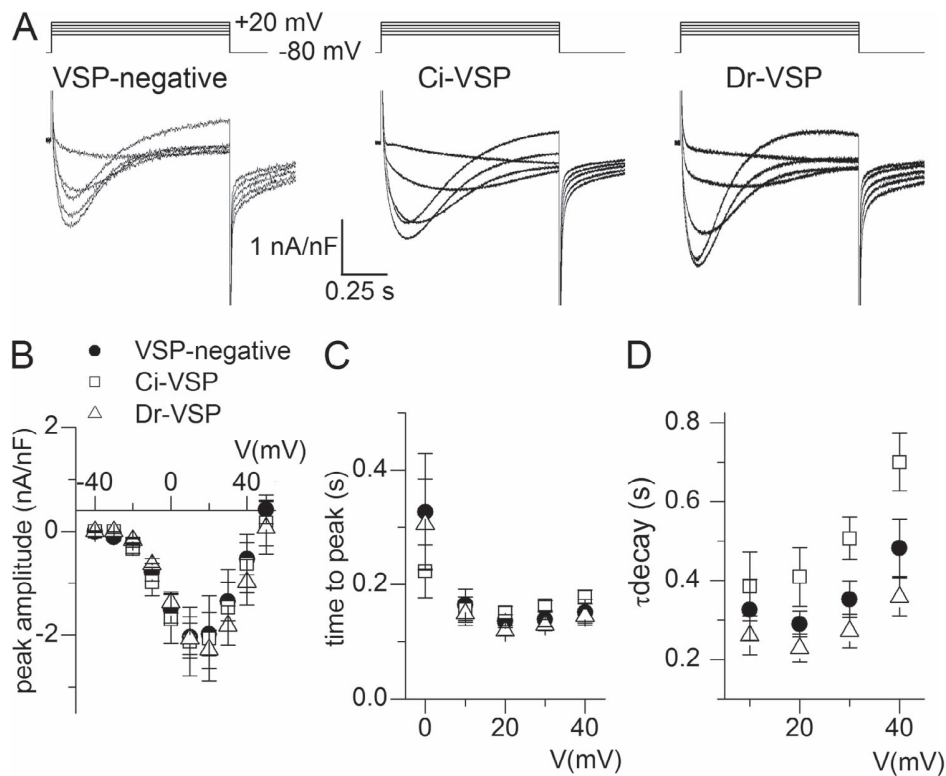
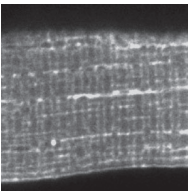


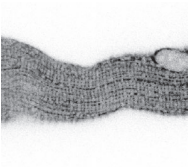
Figure S3. DHPR Ca^{2+} current in VSP-expressing fibers. (A) Ca^{2+} current traces from a VSP-negative fiber, a Ci-VSP-positive fiber, and a Dr-VSP-positive fiber in response to depolarizing pulses to -20 , -10 , 0 , 10 , and 20 mV. Membrane current was acquired at a lower sampling rate in the VSP-negative fiber. (B–D) Mean voltage dependence of the peak amplitude, time to peak, and time constant of decay of the Ca^{2+} current in VSP-negative fibers ($n = 9$), Ci-VSP-positive fibers ($n = 4$), and Dr-VSP-positive fibers ($n = 6$). Error bars represent \pm SEM.

REFERENCES

- Brum, G., and E. Rios. 1987. Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge 2. *J. Physiol.* 387:489–517. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016586>
- Collet, C., B. Allard, Y. Tourneur, and V. Jacquemond. 1999. Intracellular calcium signals measured with indo-1 in isolated skeletal muscle fibres from control and mdx mice. *J. Physiol.* 520:417–429. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00417.x>
- DiFranco, M., A. Herrera, and J.L. Vergara. 2011. Chloride currents from the transverse tubular system in adult mammalian skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 137:21–41. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201010496>
- Fahlke, C., and R. Rüdell. 1995. Chloride currents across the membrane of mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 484:355–368. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020670>
- Falkenburger, B.H., J.B. Jensen, and B. Hille. 2010. Kinetics of PIP₂ metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *J. Gen. Physiol.* 135:99–114. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200910345>
- Hossain, M.I., H. Iwasaki, Y. Okochi, M. Chahine, S. Higashijima, K. Nagayama, and Y. Okamura. 2008. Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish voltage-sensing phosphatases. *J. Biol. Chem.* 283:18248–18259. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M706184200>
- Milting, H., L.M. Heilmeyer Jr., and R. Thieleczek. 1994. Phosphoinositides in membranes that build up the triads of rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 345:211–218. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00440-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(94)00440-4)
- Puigbò, P., I.G. Bravo, and S. Garcia-Vallve. 2008. CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol. Direct.* 3:38. <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6150-3-38>
- Villalba-Galea, C.A., W. Sandtner, D.M. Starace, and F. Bezanilla. 2008. S4-based voltage sensors have three major conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:17600–17607. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0807387105>



Video 1. Successive confocal images of the mRFP fluorescence from a skeletal muscle fiber expressing Ci-VSP and PLC δ_1 PH-mRFP. The fiber was depolarized from -80 mV to the indicated levels. Frames were collected every 1.97 s and are displayed at a rate of four frames per second. Frame side size is 25.5 μm .



Video 2. Successive confocal images of the mRFP fluorescence from a skeletal muscle fiber expressing Ci-VSP and PLC δ_1 PH-mRFP. The fiber was depolarized from -80 to 50 mV approximately between frame number 10 and frame number 12. Frames were collected every 2.35 s and are displayed at a rate of four frames per second. Frame side size is 51 μm .

Section 2.

ALTERATIONS DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DANS LA FIBRE MUSCULAIRE DE SOURIS DEFICIENTE EN MYOTUBULARINE, ET BENEFICES D'UN TRAITEMENT AUX INHIBITEURS DE L'ACTIVITE PTDINS 3-KINASE

Article 2 : **Kutchukian, C.**, Lo Scudato, M., Tourneur, Y., Poulard, K., Vignaud, A., Berthier, C., Allard, B., Lawlor, M.W., Buj-Bello, A., and Jacquemond, V. (2016). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca^{2+} release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *113*, 14432–14437.

Chez l'Homme, des mutations dans le gène codant pour la myotubularine (MTM1), une PtdInsP phosphatase ayant pour substrats le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P₂, sont associées à la myopathie myotubulaire. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire très sévère à la naissance ainsi qu'une détresse respiratoire limitant l'espérance de vie à moins d'un an pour la plupart des patients. Un modèle murin transgénique de cette pathologie (*Mtm1* KO) a été généré par le Dr Ana Buj-Bello (Buj-Bello et al., 2002) et reproduit les principales caractéristiques de la maladie humaine. En 2009, une étude a révélé l'importance de MTM1 dans la fonction du couplage EC du muscle squelettique (Al-Qusairi et al., 2009) : en effet, les fibres musculaires de souris *Mtm1* KO présentent un défaut du couplage EC caractérisé par une réduction de l'amplitude de l'efflux calcique, associée à une désorganisation des tubules T. Cette altération du couplage EC est sans aucun doute une cause majeure de la faiblesse musculaire fatale chez les patients atteints de la myopathie myotubulaire. Cependant, malgré de nombreux travaux, la fonction primaire de la myotubularine et surtout les mécanismes pathologiques à l'origine de la myopathie restent controversés. Dans ce contexte, les objectifs principaux de ce travail ont été de réaliser une caractérisation complète des défauts de signalisation calcique et du couplage EC dans les fibres musculaires de souris *Mtm1* KO, et de déterminer si une altération du métabolisme des PtdInsPs joue un rôle dans la pathologie et pourrait faire l'objet d'une approche thérapeutique pharmacologique. En bref, nous avons mesuré le couplage EC à l'aide d'une combinaison d'électrophysiologie en configuration de potentiel imposé et d'imagerie confocale d'un indicateur calcique fluorescent sur fibres musculaires isolées de souris contrôles et *Mtm1* KO. De plus, nous avons testé l'effet d'inhibiteurs pharmacologiques de l'activité PtdIns 3-kinase *in vitro* sur la signalisation calcique des fibres *Mtm1* KO et *in vivo* sur la survie des individus.

Signalisation calcique dans les fibres déficientes en MTM1 et inhibition pharmacologique de l'activité PtdIns 3-kinase

La caractérisation complète des propriétés des signaux calciques macroscopiques en fonction du potentiel de membrane a révélé une réduction de 62 % de l'amplitude maximale de l'efflux de Ca^{2+} par le RS ainsi qu'un retard de 10 à 30 ms de son temps au pic dans les fibres *Mtm1* KO par rapport aux fibres contrôles, tandis qu'aucune différence significative n'est détectée pour le potentiel de demi-activation. De plus, alors que le flux calcique dans les conditions normales présente un pic initial suivi d'une phase de déclin, nous avons observé dans les fibres *Mtm1* KO une seconde phase retardée, pour des potentiels intermédiaires (-20 à 0 mV). Etant donné que le potentiel de membrane est finement contrôlé dans nos conditions expérimentales, un tel retard pourrait être la conséquence d'un découplage entre les DHPRs et certains RYR1. L'ouverture de ces derniers dépendrait alors d'une augmentation initiale de Ca^{2+} à proximité du canal (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release) induite soit par le courant Ca^{2+} à travers les DHPRs soit par l'efflux de Ca^{2+} à travers des RYR1 spatialement adjacents maintenus couplés dans les fibres *Mtm1* KO.

Dans un deuxième temps, nous avons envisagé la possibilité que les altérations de signalisation calcique dans les fibres *Mtm1* KO puissent être associées à un déséquilibre de l'activité PtdIns 3-kinase. Pour le vérifier, nous avons exposé les fibres musculaires isolées de souris contrôles et *Mtm1* KO à des pan-inhibiteurs de PtdIns 3-kinase, la wortmannine et le LY294002 pendant 1h avant les enregistrements. Nos résultats montrent une nette amélioration de l'amplitude du flux de Ca^{2+} à travers le RS, ainsi qu'une tendance à la réduction du temps au pic dans les fibres musculaires *Mtm1* KO traitées, alors qu'aucun effet n'est observé dans les fibres contrôles. Un traitement prolongé d'une nuit ne s'est en revanche pas avéré plus efficace sur ces altérations, signifiant que l'effet bénéfique de l'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase est rapide, et n'implique pas de remodelage structural. La wortmannine et le LY294002 sont des pan-inhibiteurs de l'activité PtdIns 3-kinase. Il existe par ailleurs des inhibiteurs spécifiques de chaque isoforme, telle que la 3-méthyladénine (3-MA) qui agit spécifiquement sur l'activité de la PtdIns 3-kinase de classe III. L'exposition des fibres musculaires à la 3-MA n'a eu aucun effet ni sur l'amplitude, ni sur le temps au pic du flux de Ca^{2+} à travers le RS. Ces résultats indiquent que les défauts du couplage EC dans les fibres *Mtm1* KO sont associés à un déséquilibre d'activité PtdIns 3-kinase de classe I et/ou de classe II.

Altérations spatialement localisées de l'efflux de Ca^{2+} par le RS dans les fibres déficientes en MTM1

Au-delà des défauts globaux de signalisation calcique, l'observation détaillée des images de la fluorescence du rhod-2 pendant l'application de dépolarisations imposées a révélé un nouvel aspect des altérations de l'efflux calcique dans les fibres *Mtm1* KO. En effet, alors que la fluorescence du

rhod-2 est homogène le long de la ligne de scan, nous avons observé dans la majorité des fibres musculaires *Mtm1* KO des altérations spatialement localisées des transitoires calciques. Ces inhomogénéités spatiales se caractérisent par des réductions locales de l'amplitude et/ou du temps au pic du flux de Ca^{2+} à travers le RS, représentatives des altérations observées à l'échelle macroscopique. Cette hétérogénéité du signal calcique a été confirmée par une analyse de la variabilité du temps au pic du flux de Ca^{2+} à travers le RS, significativement plus élevée dans les fibres *Mtm1* KO par rapport aux fibres contrôles. Afin de déterminer si ces défauts de signalisation calcique sont spatialement corrélés aux altérations structurales des tubules T déjà décrites dans les fibres *Mtm1* KO (Al-Qusairi et al., 2009), nous avons combiné l'imagerie calcique à l'imagerie de fluorescence d'un marqueur membranaire, le di-8-ANEPPS. Nos résultats indiquent que, bien que les altérations de structure soient systématiquement associées aux défauts fonctionnels, la réciproque est fautive, suggérant que ces altérations structurales ne sont pas le seul mécanisme responsable des défauts de signalisation calcique. Puisque l'inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase a montré un effet bénéfique sur l'amplitude de l'efflux calcique global dans les fibres *Mtm1* KO, il était d'intérêt de tester si un tel effet était reproduit sur les altérations spatialement localisées du signal calcique. L'analyse quantitative de la variabilité spatiale du signal calcique dans les fibres contrôles et *Mtm1* KO traitées à la wortmannine et au LY294002 a révélé un effet bénéfique de ces inhibiteurs sur ce paramètre.

Inhibition in vivo de l'activité PtdIns 3-kinase chez les souris Mtm1 KO

Les résultats bénéfiques obtenus sur la signalisation calcique des fibres musculaires *Mtm1* KO nous ont encouragé à tester la pan-inhibition de l'activité PtdIns 3-kinase *in vivo*. Dans ce but, nous avons traité des souris WT et *Mtm1* KO avec de la wortmannine. Dans nos conditions, l'observation régulière des animaux et la mesure de leur poids n'ont montré aucun effet adverse du traitement chez les souris contrôles par rapport aux souris non traitées. De manière spectaculaire, et ceci bien que les souris *Mtm1* KO traitées n'atteignent pas le poids moyen des souris contrôles, l'administration de wortmannine a significativement augmenté leur espérance de vie, avec 6 souris traitées dépassant l'espérance de vie moyenne des souris malades non traitées de plus de 8 semaines. De plus, les souris *Mtm1* KO traitées à la wortmannine ont montré une mobilité normale, alors que leurs congénères non traitées ont développé une diminution progressive de l'activité motrice. Ces résultats démontrent les bénéfices de l'inhibition pharmacologique de l'activité PtdIns 3-kinase sur la fonction musculaire, et par voie de conséquence, sur la survie des souris déficientes en MTM1, en accord avec les effets observés *in vitro*. Ils fournissent une preuve de concept

thérapeutique pour l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de l'activité PtdIns 3-kinase dans le traitement de la myopathie myotubulaire.

Conclusions

L'ensemble de cette étude apporte des éléments nouveaux concernant les propriétés des altérations de la signalisation calcique dans les fibres musculaires d'un modèle murin de la myopathie myotubulaire, et fournit une preuve de concept thérapeutique de l'inhibition pharmacologique de l'activité PtdIns 3-kinase. Nos résultats révèlent une réduction de l'amplitude et un ralentissement des transitoires calciques sur toute la gamme de sensibilité au potentiel du couplage EC dans les fibres *Mtm1* KO, suggérant que l'activité des RYR1 supportant le flux de Ca^{2+} est diminuée et qu'un temps plus long est nécessaire à leur ouverture. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois une hétérogénéité du signal calcique dans les fibres *Mtm1* KO, avec des altérations spatialement localisées résumant celles observées à l'échelle macroscopique. De manière intéressante, des défauts similaires ont été rapportés dans les cardiomyocytes de divers modèles d'insuffisance cardiaque, et ont été associés à une désorganisation du réseau de tubules T ou à une réduction de sa densité (Louch et al., 2006; Song et al., 2006; Heinzel et al., 2008). Dans le muscle squelettique de mammifère, l'activité des RYRs est étroitement contrôlée par les DHPRs dans la membrane du tubule T. Cependant, en absence de DHPRs, les RYRs sont connus pour être activés par une augmentation de Ca^{2+} à la face cytosolique du canal et générer ainsi un phénomène de libération autocatalytique de Ca^{2+} (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release). L'observation de retards spatialement localisés de l'efflux calcique suggère que ce mécanisme est fonctionnel dans les fibres *Mtm1* KO et pourrait refléter dans ces régions la présence de RYRs dépourvus de contrôle par les DHPRs et activés par les ions Ca^{2+} libérés par des RYRs spatialement adjacents toujours couplés. Nous pouvons spéculer que ce phénomène contribue à compenser, au moins en partie, le déficit pathologique du couplage EC. Ce postulat se base sur la démonstration de l'existence d'un mécanisme compensatoire de Ca^{2+} induced- Ca^{2+} release dans les cellules cardiaques soumises à un protocole de détubulation membranaire (Ferrantini et al., 2014). Ces altérations du couplage EC ne sont toutefois pas systématiquement corrélées aux altérations apparentes des tubules T, et le retard de l'efflux calcique ainsi que l'hétérogénéité spatiale du signal calcique sont par ailleurs partiellement corrigés par une courte exposition des fibres musculaires aux inhibiteurs de l'activité PtdIns 3-kinase. Il est peu probable que cet effet bénéfique rapide soit dû à un remodelage structural, mais pourrait suggérer la participation d'un autre mécanisme pathologique, probablement associé à une accumulation des PtdInsPs substrats de MTM1. En particulier, on peut suspecter une modulation de l'activité de RYR1 par les produits de PtdIns 3-kinase, lesquels ont déjà été rapportés interagir avec et moduler

l'activité de RYR1 (Shen et al., 2009; Rodríguez et al., 2014). En accord avec cette hypothèse, nous démontrons que l'inhibition pharmacologique de l'activité PtdIns 3-kinase corrige de manière très substantielle l'amplitude de l'efflux de Ca^{2+} du RS *in vitro* et prolonge l'espérance de vie des souris *Mtm1* KO. Néanmoins, nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité que le défaut de couplage EC soit lié à la fonction combinée de MTM1 dans la tubulation membranaire et en tant que phosphoinositide 3-phosphatase. En effet, il a été récemment suggéré une réduction des taux de PtdIns(5)P et de PtdIns(4,5)P₂ en l'absence de MTM1 (Hohendahl et al., 2016). Compte tenu des interactions fonctionnelles entre MTM1, DNM2 et BIN1 dans la tubulation membranaire et du rôle du PtdIns(4,5)P₂ membranaire dans le recrutement et la régulation de BIN1 et de DNM2, ceci expliquerait comment l'activité phosphatase de MTM1 est nécessaire à l'intégrité membranaire (Royer et al., 2013; Wu et Baumgart, 2014).

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence le rôle critique de la perturbation du métabolisme des PtdInsPs dans la fonction du couplage EC et fournissent une preuve de concept de bénéfice thérapeutique d'une approche pharmacologique.

Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca²⁺ release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice

Candice Kutchukian^a, Mirella Lo Scudato^{b,c}, Yves Tourneur^{d,e}, Karine Poulard^{b,c}, Alban Vignaud^b, Christine Berthier^a, Bruno Allard^a, Michael W. Lawlor^f, Ana Buj-Bello^{b,c}, and Vincent Jacquemond^{a,1}

^aInstitut NeuroMyoGène, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Université Claude Bernard Lyon 1, F69622 Villeurbanne, France; ^bGénéthon, 91002 Evry, France; ^cINSERM UMR_S951, 91002 Evry, France; ^dFaculté de Médecine Lyon Sud, Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition, INSERM U1060, 69921 Oullins, France; ^eUniversidade Federal de Pernambuco, Dept Nutrição, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Brazil; and ^fDivision of Pediatric Pathology, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI 53226

Edited by Louis M. Kunkel, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved October 26, 2016 (received for review March 11, 2016)

Mutations in the gene encoding the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin (MTM1) are responsible for a pediatric disease of skeletal muscle named myotubular myopathy (XLMTM). Muscle fibers from MTM1-deficient mice present defects in excitation–contraction (EC) coupling likely responsible for the disease-associated fatal muscle weakness. However, the mechanism leading to EC coupling failure remains unclear. During normal skeletal muscle EC coupling, transverse (t) tubule depolarization triggers sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ release through ryanodine receptor channels gated by conformational coupling with the t-tubule voltage-sensing dihydropyridine receptors. We report that MTM1 deficiency is associated with a 60% depression of global SR Ca²⁺ release over the full range of voltage sensitivity of EC coupling. SR Ca²⁺ release in the diseased fibers is also slower than in normal fibers, or delayed following voltage activation, consistent with the contribution of Ca²⁺-gated ryanodine receptors to EC coupling. In addition, we found that SR Ca²⁺ release is spatially heterogeneous within myotubularin-deficient muscle fibers, with focally defective areas recapitulating the global alterations. Importantly, we found that pharmacological inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns 3-kinase) activity rescues the Ca²⁺ release defects in isolated muscle fibers and increases the lifespan and mobility of XLMTM mice, providing proof of concept for the use of PtdIns 3-kinase inhibitors in myotubular myopathy and suggesting that unbalanced PtdIns 3-kinase activity plays a critical role in the pathological process.

skeletal muscle | excitation–contraction coupling | ryanodine receptor | sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release | myotubularin

Impaired skeletal muscle excitation–contraction (EC) coupling is believed to be a main cause of the severe muscle weakness associated with myotubular myopathy (1). EC coupling operates through interactions between the voltage-sensing CAV1.1 Ca²⁺ channel (also known as the dihydropyridine receptor) in the transverse (t) tubule membrane and the type 1 ryanodine receptor (RYR1) Ca²⁺ release channel in the junctional sarcoplasmic reticulum (SR) membrane: Opening of RYR1 channels under the control of the CAV1.1 voltage-sensing activity is responsible for the Ca²⁺ flux that raises cytosolic Ca²⁺ to trigger contraction (2, 3). Myotubular myopathy is due to genetic deficiency in the phosphoinositide (phosphatidylinositol, PtdInsP) phosphatase MTM1, which dephosphorylates PtdIns(3,5)P₂ and PtdIns(3)P at the D3 position of the inositol ring (4, 5). How MTM1 deficiency is responsible for defective EC coupling remains unclear, and this issue is highly relevant to understanding the mechanisms of the disease but also to gaining insights into the interactions between phosphoinositides and Ca²⁺ signaling in muscle (see ref. 6). The *Mtm1*-KO mouse model reproduces the main symptomatic features of the human disease: Mutant mice develop a progressive myopathy that starts at about 3–4 wk of age, leading to death 3–5 wk later (7).

An initial analysis of EC coupling in muscle fibers isolated from 5-wk-old *Mtm1*-KO mice revealed that the peak amplitude of the Ca²⁺ transient triggered by a maximally activating depolarization was reduced, with no concurrent change in resting Ca²⁺, rate of Ca²⁺ removal, and SR Ca²⁺ content (1). This highlighted a very specific alteration of the SR Ca²⁺ release process. Membrane structure defects and disorganization as well as decreased content in RYR1 and CAV1.1 were also identified, but whether they correspond to a primary or secondary defect during the disease progression is unclear. In the present work, we explored the properties of SR Ca²⁺ release over the full range of voltage sensitivity of EC coupling at the macroscopic and subcellular level, using the Ca²⁺ dye rhod-2 under conditions of high EGTA buffering. We reveal that the dysfunction of Ca²⁺ release is strongly heterogeneous at the subcellular level and not only affects the amplitude but also the activation kinetics of Ca²⁺ release, with the disease promoting a Ca²⁺-gated opening mode of the RYR1 channels that is denied to normal muscle. Moreover, we show that pharmacological inhibition of PtdIns 3-kinase substantially alleviates the Ca²⁺ release defects in muscle fibers and prolongs survival of *Mtm1*-KO mice.

Significance

Myotubular myopathy is a fatal muscle disease due to deficiency in a phosphoinositide 3-phosphatase called myotubularin. We identify critical alterations involved in the pathophysiology of the disease, and we reveal the beneficial effect of a pharmacological treatment. Specifically, we demonstrate that the disease-associated dysfunction of Ca²⁺ signaling is strongly heterogeneous at the subcellular level, affects the amplitude and activation kinetics of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release, and promotes a Ca²⁺-gated opening mode of the calcium release channels. Pharmacological inhibition of phosphoinositide 3-kinase activity substantially alleviates these functional defects and prolongs survival of myotubularin-deficient mice, suggesting a crucial role of this kinase activity in the dysfunction of Ca²⁺ homeostasis and a potential benefit of this therapeutic approach for the disease.

Author contributions: A.B.-B. and V.J. designed research; C.K., M.L.S., Y.T., K.P., A.V., C.B., M.W.L., A.B.-B., and V.J. performed research; C.K., M.L.S., Y.T., K.P., A.V., B.A., M.W.L., A.B.-B., and V.J. analyzed data; and A.B.-B. and V.J. wrote the paper.

Conflict of interest statement: M.W.L. receives research funding support from Audentes Therapeutics, Solid GT, and Demeter Therapeutics; is a member of the Scientific Advisory Board of Audentes Therapeutics; and was recently a consultant for Sarepta Therapeutics. A.B.-B. is a scientific advisor of Audentes Therapeutics.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. Email: vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1604099113/-DCSupplemental.

Results

SR Ca²⁺ Release in MTM1-Deficient Muscle Fibers and Effect of PtdIns 3-Kinase Inhibitors. Using voltage-clamp and confocal line-scan microscopy, we characterized the voltage-dependent SR Ca²⁺ release flux in muscle fibers isolated from WT and MTM1-deficient

mice. Fig. 1A shows representative line-averaged rhod-2 F/F₀ Ca²⁺ transients and the corresponding Ca²⁺ release flux (d[Ca]_{tot}/dt) elicited by depolarizing pulses from -80 mV to the indicated values (top traces) in a WT and in a MTM1-deficient muscle fiber (also referred to as KO fibers). The nonprocessed rhod-2 line-scan image recorded during the pulse to -10 mV in each fiber is shown below the pulse protocol. The rhod-2 transients yield a rapid phase of rise upon depolarization followed by a slower increase for low and midactivation voltages, whereas for the largest depolarization levels the signal spontaneously decays during the pulse. The underlying Ca²⁺ release flux exhibits an early peak phase that decays rapidly to a low, slowly declining level, as classically reported in this preparation. The maximal amplitude of the rhod-2 transients is smaller in the MTM1-deficient fiber than in the WT fiber due to reduced amplitude of the peak Ca²⁺ release flux. The activation kinetics of the Ca²⁺ release flux are also altered in the MTM1-deficient fiber: The time to peak is larger than in the WT fiber, and a delayed secondary phase of Ca²⁺ release takes place during the pulse to -10 mV. Fig. 1B and C presents the voltage dependence of the mean values for peak amplitude of the Ca²⁺ release flux and for its time to peak, respectively, in WT (*n* = 20) and MTM1-deficient fibers (*n* = 13). Fitting a Boltzmann function to the amplitude versus voltage data points in each fiber revealed a 62% reduction in the mean maximal release flux in MTM1-deficient fibers (Fig. 1B, Inset) with no concurrent change in either the midactivation voltage or the steepness factor (Table S1).

The decreased peak amplitude of Ca²⁺ release in the MTM1-deficient fibers was associated with an increase of its time to peak (Fig. 1C), with the largest difference between WT and MTM1-deficient fibers being observed for pulses to values between -20 and 0 mV. This is also the voltage range where presence of a secondary onset phase of Ca²⁺ release during the pulses was most routinely observed (Fig. S1). Such a secondary phase was never observed in WT fibers, and there is, to our knowledge, no other report of such behavior of Ca²⁺ release in any model of differentiated muscle fibers under voltage-clamp control. Thus, this late phase of Ca²⁺ release activation is certainly the consequence of a mode of RYR1 channels opening that is different from the standard gating process controlled by t-tubule CAV1.1 channels. Because RYR1 channels are also known to be potentially activated by a rise in cytosolic Ca²⁺ (see ref. 8), Ca²⁺-induced Ca²⁺ release could be the responsible mechanism. Fig. S1B presents quantitative features of the secondary delayed onset of Ca²⁺ release as inferred from 19 MTM1-deficient muscle fibers where such delayed onset was distinctly identified during a voltage-clamp depolarization (as illustrated in Fig. 1A and Fig. S1A): The Ca²⁺ concentration level immediately preceding the onset (threshold Ca²⁺) yielded a mean value of 0.24 ± 0.01 μM, whereas the mean peak amplitude of the delayed phase was 3.0 ± 0.4 μM·ms⁻¹.

MTM1 is a PtdIns 3-phosphatase, and thus, accumulation of its enzymatic substrates may play a role in the disease. We therefore tested whether inhibition of PtdIns 3-kinase activity would ameliorate the EC coupling defects. The open symbols in Fig. 1B and C correspond to the values for the peak and time to peak Ca²⁺ release measured in WT (*n* = 17) and MTM1-deficient fibers (*n* = 12) exposed for 1 h to the PtdIns 3-kinase blockers wortmannin (0.1 μM) and LY294002 (50 μM) before taking the measurements. PtdIns 3-kinase inhibition had no effect in WT fibers, but it significantly enhanced the maximal Ca²⁺ release flux in MTM1-deficient fibers (Table S1). In addition, mean values for the time to peak Ca²⁺ release were reduced in treated compared with untreated MTM1-deficient fibers, although the difference was not significant for all values of membrane potential (red asterisks in Fig. 1C). These results show that PtdIns 3-kinase inhibition substantially improves the diseased Ca²⁺ release. MTM1 deficiency is also associated with a decreased activity of the CAV1.1 Ca²⁺ channel activity (1), but this effect was not alleviated by treatment with PtdIns 3-kinase blockers (Fig. S2).

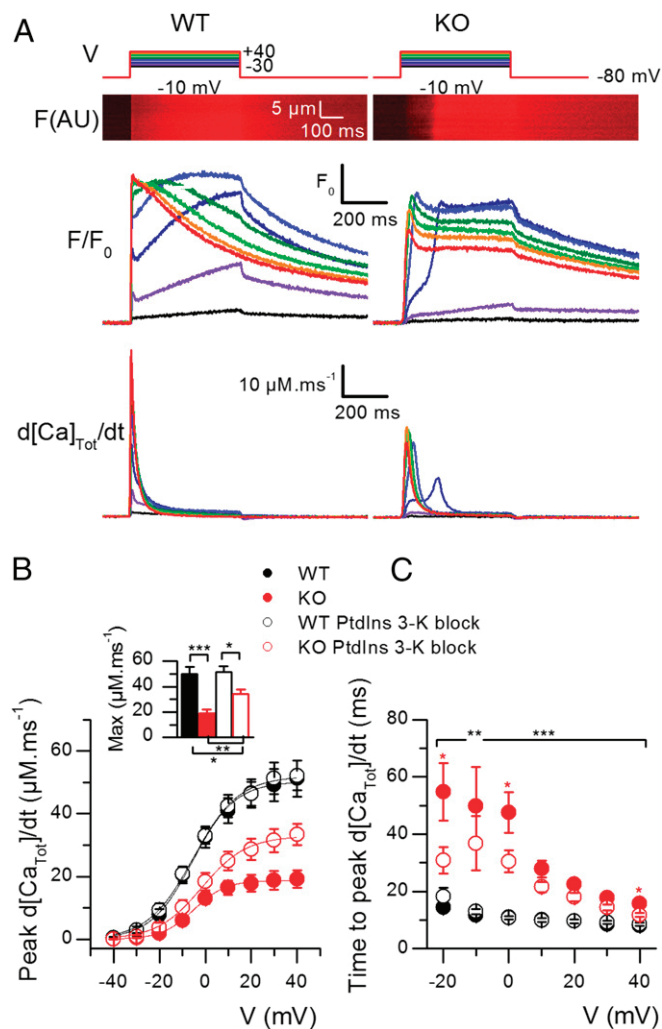


Fig. 1. Defects in voltage-activated global Ca²⁺ release in MTM1-deficient muscle fibers are alleviated by PtdIns 3-kinase inhibition. (A) Changes in rhod-2 fluorescence (F/F₀) and corresponding calculated rate of Ca²⁺ release (d[Ca]_{tot}/dt) in response to 500 ms-long voltage-clamp depolarizing pulses of various amplitude (top traces) in a WT (Left) and in a MTM1-deficient muscle fiber (KO, Right). F/F₀ traces correspond to the average change in fluorescence over the entire scanned line. The raw rhod-2 fluorescence image collected while applying the pulse to -10 mV is shown above each series of F/F₀ traces. (B) Voltage dependence of the peak rate of Ca²⁺ release in WT (black symbols) and MTM1-deficient muscle fibers (red symbols) under control conditions (filled symbols) and following a 1-h exposure to the PtdIns 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 (PtdIns 3-K block, open symbols). The Inset shows the mean values for the maximum rate of Ca²⁺ release in the different conditions: For this, a Boltzmann function was fitted to the individual sets of values in each fiber. Corresponding mean values for the other Boltzmann parameters are presented in Table S1. (C) Voltage dependence of the mean time to peak rate of Ca²⁺ release in the different conditions. Black and red asterisks report a significant difference between WT and KO fibers and between KO fibers not treated and treated with the PtdIns 3-kinase blockers, respectively. In C and D, mean values are from 20 and 13 WT and KO fibers under control conditions and 17 and 12 WT and KO fibers treated with the PtdIns 3-kinase inhibitors, respectively. All data are expressed as mean ± SEM. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 with unpaired *t* test.

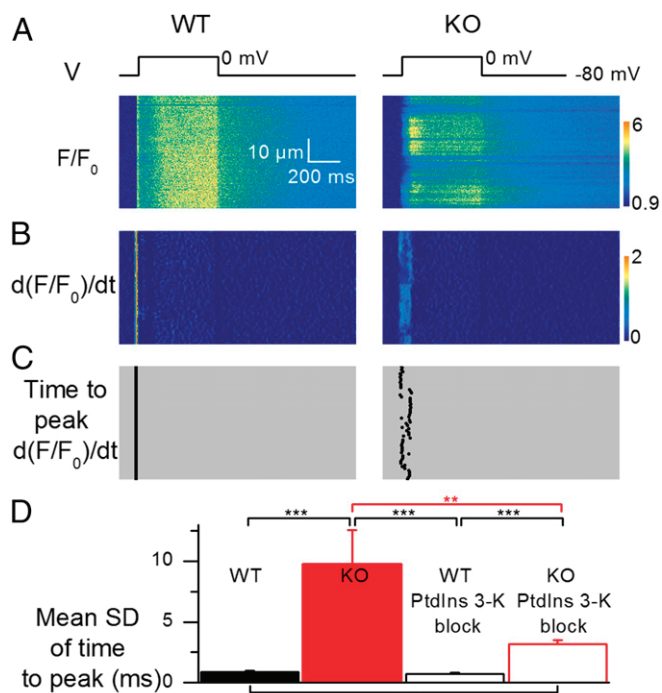


Fig. 2. Spatial heterogeneity of Ca^{2+} release in MTM1-deficient muscle fibers. (A) Line-scan rhod-2 F/F_0 images collected in a WT fiber (Left) and in a MTM1-deficient fiber (Right) while a 500 ms-long depolarizing pulse to 0 mV was applied. (B) Corresponding images of the rate of change in F/F_0 ($d(F/F_0)/dt$); these images were resampled from 512 to 64 pixels (0.1–0.8 μm per pixel) after linear averaging in the space domain, and the time derivative was calculated with a dt of 4 pixels (4.6 ms). (C) Corresponding distribution of the time to peak rate of change in F/F_0 along the scanned line. (D) Mean SD of the time to peak rate of change in F/F_0 in WT and KO fibers ($n = 30$ and 26 , respectively) and in WT and KO fibers treated with the PtdIns 3-kinase blockers ($n = 26$ and 24 , respectively). All data are expressed as mean \pm SEM. $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ with unpaired t test.

To test whether a more prolonged exposure to PtdIns 3-kinase blockers would further correct the Ca^{2+} release defects, a separate series of measurements was performed on muscle fibers kept overnight in the presence of the PtdIns 3-kinase blockers. This did not further improve the Ca^{2+} release parameters in MTM1-deficient fibers (Fig. S3). Thus, the recovery of Ca^{2+} release defects by PtdIns 3-kinase inhibition is a rapid and acute process that likely does not involve profound molecular and/or structural remodeling of the muscle fibers. Wortmannin and LY294002 are broad inhibitors of PtdIns 3-kinase activity with no isoform specificity. Therefore, we also tested the effect of 3-methyladenine (3-MA), which is reported to have some preference for class III PtdIns 3-kinase (9). Results show that 3-MA did not improve Ca^{2+} release in MTM1-deficient fibers (Fig. S4), suggesting that class III enzymatic activity is not involved in the pathological mechanism.

Spatially Localized Disruptions of SR Ca^{2+} Release in MTM1-Deficient Muscle Fibers. Examination of the spatial profile of the line-scan rhod-2 F/F_0 signals triggered by depolarizing pulses revealed another hallmark of the altered Ca^{2+} release in MTM1-deficient fibers: Whereas Ca^{2+} transients were homogeneous along the scanned line in WT fibers, images from MTM1-deficient fibers exhibited localized alterations, demonstrating that the EC coupling defect is spatially discontinuous at the subcellular level. This is exemplified in Fig. 2 and Fig. S5, which show rhod-2 images from a WT and MTM1-deficient fiber taken while a pulse to -10 , 0 , or $+10$ mV was applied. Qualitative features of the local Ca^{2+}

release defects were diverse: Compared with adjacent regions of the same line, locally deficient areas exhibited either reduced peak amplitude, delayed time to peak, retarded onset, or a combination thereof. This is illustrated in Fig. 3, which shows three examples of rhod-2 line-scan images taken from separate MTM1-deficient fibers depolarized to -10 or 0 mV. For each image, the time course of change in F/F_0 fluorescence and the corresponding rate of Ca^{2+} release are shown at three different positions along the line (colored arrows and corresponding traces).

Because MTM1-deficient fibers display alterations in membranous structures and triad disorganization (1), we attempted to determine whether the locally defective Ca^{2+} release areas were associated with disrupted t-tubules. For this purpose, voltage-activated rhod-2 Ca^{2+} transients were recorded in fibers stained with di-8-aneppps. Overall we could not achieve a reproducible strict correlation between local alterations in t-tubule pattern and in Ca^{2+} release, as illustrated in Fig. S6: It shows three examples of

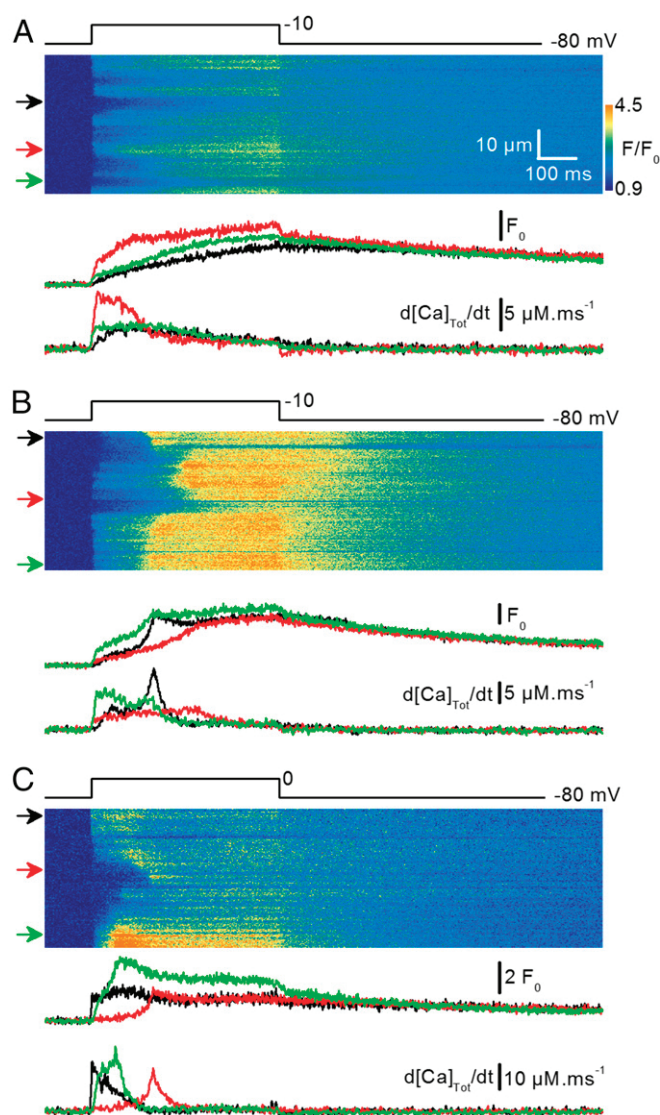


Fig. 3. Local alterations in voltage-activated SR Ca^{2+} release in MTM1-deficient muscle fibers. (A–C) Rhod-2 F/F_0 line-scan images collected in MTM1-deficient fibers while a 500 ms-long depolarizing pulse to the indicated value was applied. In each panel, bottom traces show the changes in rhod-2 fluorescence (F/F_0) and the corresponding calculated rate of Ca^{2+} release ($d[\text{Ca}]_{\text{Tot}}/dt$) at three different positions of the line (colored arrows).

rhod-2 line-scan images taken in MTM1-deficient fibers depolarized from -80 to 0 mV, together with the corresponding t-tubule profile along the scanned line. Fig. S6A shows an example where local defects in the t-tubule pattern do correlate with a reduced peak rate of Ca^{2+} release (areas pointed by the black and red arrows). Conversely, in Fig. S6B, the rhod-2 line-scan image yields a large region of depressed Ca^{2+} release, whereas the t-tubule pattern appears very neat all along the line, with no indication of structure defects. Finally, Fig. S6C shows a line-scan image taken from a fiber yielding a very much devastated t-tubule network, which is associated with Ca^{2+} release yielding either slow or retarded onset. Altogether, areas with a clearly altered t-tubule pattern did yield defective (either depressed and/or delayed) Ca^{2+} release compared with adjacent areas with a more standard triadic pattern, but the reciprocal was not systematically true. This suggests that either some t-tubule defects remained undetectable or that defective t-tubule structure is not the primary or not the only primary mechanism responsible for altered Ca^{2+} release.

Because PtdIns 3-kinase inhibition ameliorates the defects in global Ca^{2+} release of MTM1-deficient fibers, it was of interest to determine if it could also reduce the extent of spatially localized Ca^{2+} release defects. For this, we quantified the spatial heterogeneity of Ca^{2+} release activation by calculating the SD of the time to peak rate of rise in the rhod-2 F/F_0 signal along the scanned line in each image. Analysis was performed on a space- and time-filtered version of the rhod-2 line-scan images obtained in response to a pulse from -80 to $+10$ mV (Materials and Methods). Fig. 2B shows the $d(F/F_0)/dt$ images calculated from the above respective rhod-2 line-scan images (Fig. 2A), and Fig. 2C shows the corresponding position along the scanned line of the time to peak rate of rise of rhod-2 F/F_0 . Although this time value was very well conserved along the scanned line in the WT fiber, there was much greater variability in the time to peak along the line in the MTM1-deficient fiber. Fig. 2D presents mean values for the SD of the time to peak rate of rise of F/F_0 in WT and MTM1-deficient fibers treated and not treated with wortmannin and LY294002. In Fig. 2D, SD values from short-term- (data shown in Fig. 1) and longer term-treated fibers (data shown in Fig. S3) were pooled together for the analysis and so were the values from the corresponding control fibers. The mean SD was significantly elevated in nontreated diseased fibers compared with the mean SD in treated and nontreated WT fibers and also compared with treated diseased fibers. Thus, PtdIns 3-kinase inhibition not only enhanced peak Ca^{2+} release in MTM1-deficient fibers (Fig. 1), but it also reduced its spatial discontinuity. The result could be obtained independently if using only the batch of short-term-treated fibers or the batch of longer term-treated ones. We also checked whether there could be a relationship between spatial heterogeneity and peak amplitude of Ca^{2+} release that could explain the improved spatial homogeneity in treated MTM1-deficient fibers. For this, we compared the spatial SD of untreated MTM1-deficient fibers at $+10$ mV to the SD of untreated WT fibers at -10 mV, for which mean values of peak Ca^{2+} release are very similar (Fig. 1). The mean SD from WT fibers at -10 mV was somewhat elevated compared with the mean SD from WT fibers at $+10$ mV (1.4 ± 0.1 ms vs. 0.9 ± 0.1 ms, respectively, $P = 0.011$), but it remained much lower than the mean SD from MTM1-deficient fibers at $+10$ mV (10.0 ± 2.1 ms, $P < 0.0001$). This indicates that spatial heterogeneity of Ca^{2+} release in KO fibers is not strictly related to the reduced Ca^{2+} release peak amplitude.

Wortmannin Treatment Enhances Life Expectancy of *Mtm1*-KO Mice.

Defects in EC coupling are thought to make a critical contribution to the fatal generalized muscle weakness that characterizes myotubular myopathy. The effect of pharmacological PtdIns 3-kinase inhibition on EC coupling in MTM1-deficient fibers prompted us to assess whether this strategy could also be effective in improving the phenotype of mutant mice. For that purpose, we treated WT and

MTM1-deficient mice with wortmannin. Details of the protocol were devised according to previous data showing beneficial effects of wortmannin in other disease conditions in mice with no signs of toxicity (10, 11). Under our conditions, careful routine observations of the animals and bodyweight measurements showed no sign of adverse effects of wortmannin treatment in WT mice (Fig. 4B). Whereas the body weight of treated *Mtm1*-KO mice did not reach the values of WT animals, administration of wortmannin increased significantly the life expectancy of mutant animals (Fig. 4A), with six treated mice exceeding the average lifetime of nontreated littermates by more than 8 wk. Importantly, the mobility of these long-term survivors was apparently normal, compared with nontreated KO mice, which develop a progressive reduction in motor activity (see Movies S1 and S2). These results show the benefit of PtdIns 3-kinase inhibition on the muscle function of mice with myotubular myopathy, in accordance with the observed in vitro effects on EC coupling.

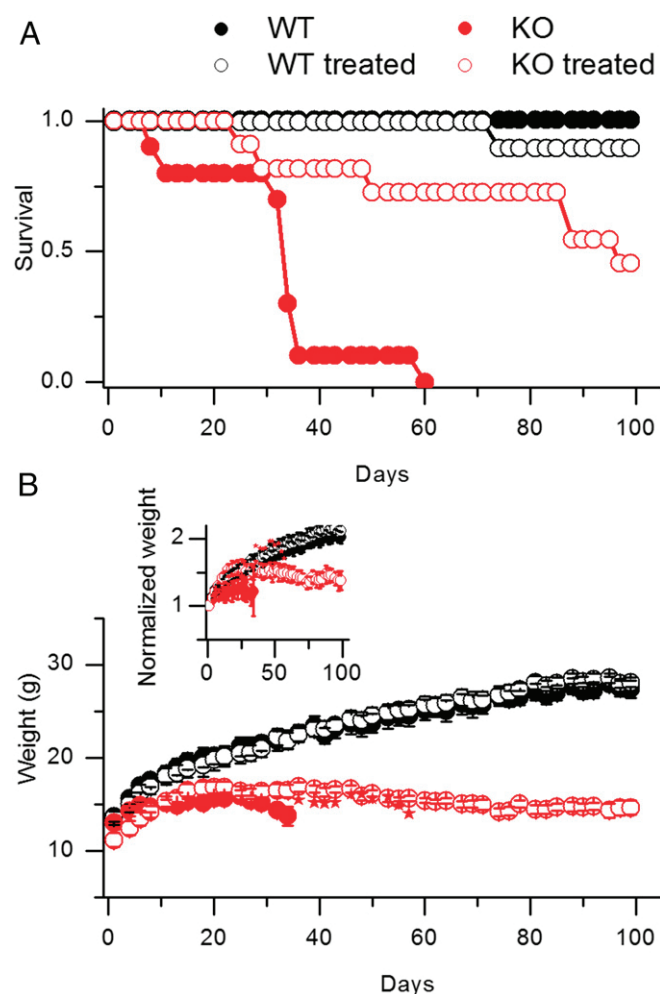


Fig. 4. In vivo wortmannin treatment enhances life expectancy of *Mtm1*-KO mice. (A) Survival curves of WT and *Mtm1*-KO mice treated with wortmannin ($n = 10$ and $n = 11$, respectively) and untreated ($n = 9$ and $n = 10$, respectively). The x axis corresponds to the number of days following the beginning of the treatment. An analysis with the log-rank test gave a statistically increased survival rate in treated versus nontreated KO mice ($P = 0.001$). (B) Absolute body weight of the WT and *Mtm1*-KO mice treated with wortmannin and untreated. The *Inset* shows the corresponding relative weight of the animals. One untreated KO mouse unexpectedly survived about 3 wk longer than all other ones; corresponding data points during that period are presented as stars.

In an attempt to get further insights into how the treatment improves muscle function, the expression of EC coupling genes and the structure properties of muscle fibers were studied in animals treated during 3 wk with wortmannin, just before the period when nontreated KO animals start to die massively. In this situation, we could not detect any change between muscles of untreated and treated KO animals (Fig. S7 and Table S2). This could be taken as an indication that, at least at this stage, EC coupling was improved in the KO fibers independently from changes in structure and molecular content. However, we also cannot rule out the possibility that there was yet no substantial benefit of the treatment at this age. In any case, muscle function in treated, long-term surviving KO animals cannot be thought to be maintained if structure and molecular content are not. In this respect, Fig. S8 presents results obtained from a wortmannin-treated, 6-mo-old KO mouse, showing that muscle fibers from such animals can maintain a normal t-tubule network and strong voltage-activated Ca^{2+} release.

Discussion

Our results reveal salient functional features of EC coupling in muscle fibers of mice suffering from myotubular myopathy and establish proof of concept of PtdIns 3-kinase inhibition to treat the disease.

We demonstrate that global SR Ca^{2+} release is depressed in MTM1-deficient fibers at all depolarizing voltages, providing evidence for an intrinsic deficiency of EC coupling, independent from the activation level of the process. Our results also reveal that, in addition to the reduced peak amplitude of Ca^{2+} release, activation kinetics are also affected. This indicates not only that the SR Ca^{2+} release flux due to activation of RYR1 channels is reduced under this pathological condition but also that it takes longer for the recruited RYR1 channels to open following t-tubule depolarization. In addition, we also uncovered another hallmark of the diseased EC coupling, which is spatial discontinuity of Ca^{2+} release, with the presence of discrete areas exhibiting the defects identified at the global level. Therefore, the disease does not affect simultaneously the entire cellular EC coupling mechanism but instead progresses through accumulation of focally defective areas.

Spatial heterogeneity, referred to as reduced synchrony or dyssynchrony of Ca^{2+} release, was reported in cardiac cells in several models of heart failure (12–14), and the defects were associated with reduced density or disorganization of t-tubules. The spatial heterogeneity of Ca^{2+} release that we report here could thus result from t-tubule defects, in accordance with previous histological observations (1). Consistent with this are the examples of colocalization between t-tubule network alterations and defective Ca^{2+} release (Fig. S6). This interpretation also fits with the proposed role of MTM1 and associated protein amphiphysin-2 in membrane tubulation (15) and with the fact that disrupted continuity of Ca^{2+} transients was observed in muscle fibers down-expressing amphiphysin 2 (16).

However, it is still not clear whether or not t-tubule and triad alterations fully underlie or not the defective EC coupling associated with MTM1 deficiency (see ref. 6). For instance, knock-down of the PtdInsP phosphatase MTMR14, which uses the same substrates as MTM1, affects EC coupling in zebrafish without structure defects (17). Some of our present results also concur with this possibility, including the nonsystematic correlations between defective Ca^{2+} release and apparent t-tubule disorganization but also the relieving effect of a short exposure of MTM1-deficient fibers to PtdIns 3-kinase blockers. Indeed, it is hard to conceive that t-tubule structure, triad organization, and proper arrangement of interactions between the molecular partners of EC coupling could be fixed within such a short time of treatment. Along this line, the depressed CAV1.1-mediated Ca^{2+} current was not corrected by PtdIns 3-kinase inhibition (Fig. S2). The pharmacologically induced enhancement of Ca^{2+} release in MTM1-deficient

fibers rather suggests that, before—or in addition to—structure defects, unbalanced PtdIns 3-kinase activity plays a critical role in the defective Ca^{2+} release. Because it was reported that direct injection of MTM1 substrates in normal muscle fibers depresses Ca^{2+} release (18), it is possible that RYR1 channels, which are known to bind PtdInsPs (19), become refractory to activation by CAV1.1 in the presence of excess PtdIns 3-kinase products. Nevertheless, it remains uncertain whether t-tubule structure disruption occurs as a separate mechanism or is intimately linked to the deficiency of Ca^{2+} release. A separate mechanism could rely on the known functional interactions between MTM1, dynamin 2 (DNM2), and amphiphysin 1 (BIN1) that are believed to promote membrane tubulation (15). As recently suggested (20), MTM1 loss of activity may lead to decreased levels of PtdIns(5)P and PtdIns(4,5)P₂. Because these appear necessary to recruit DNM2 and BIN1 at the plasma membrane to ensure proper membrane tubulation, this would provide an explanation as to how MTM1 phosphatase activity is necessary to maintain t-tubule integrity. One could also speculate that there is a causative link between depressed RYR1 activity due to MTM1 deficiency and altered t-tubule structure. However, there is so far no straight evidence from other models that it could be the case.

In cardiac muscle cells where SR Ca^{2+} release through RYR2 channels is triggered by Ca^{2+} entry across the t-tubule membrane, there is evidence that transverse propagation of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release can compensate for partial loss of t-tubule (e.g., ref. 21). In mammalian skeletal muscle, EC coupling requires direct interactions between t-tubule CAV1.1 and SR RYR1 channels, and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release is not physiologically involved under normal conditions (22). Proper t-tubule SR organization is thus compulsory for normal EC coupling function, and t-tubule disruption should annihilate the capacity of disconnected RYR1 channels to respond to t-tubule depolarization. Although, as discussed earlier, this likely contributes to the depressed Ca^{2+} release amplitude in MTM1-deficient fibers, it does not readily explain the slow and delayed onsets of activation observed at both the global and local levels. We believe that delayed Ca^{2+} release is due, at least in part, to RYR1 channels activated through Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. Indeed, we provide evidence that this process is operant in MTM1-deficient muscle fibers, at least under the form of a delayed onset phase of Ca^{2+} release during a depolarizing pulse (Fig. S1). Because this phenomenon was clearly observed in regions of a strongly altered t-tubule pattern, it suggests the involvement of RYR1 channels orphaned from CAV1.1 control and activated by Ca^{2+} released from neighboring, still connected, RYR1s. This interpretation also fits with the fact that spontaneous elementary Ca^{2+} release events believed to result from Ca^{2+} -activated RYR1 channels are observed in mammalian muscle under conditions of disrupted interactions between t-tubules and SR (see ref. 23). It should be noted that, when a delayed onset phase of Ca^{2+} release was clearly separated from the normal voltage-activated Ca^{2+} release (Fig. S1), its peak amplitude rarely exceeded $5 \mu\text{M}\cdot\text{ms}^{-1}$, which remains much lower than the peak values reached in response to a large depolarizing pulse in normal conditions. Therefore, although Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release is likely to contribute to EC coupling in MTM1-deficient fibers, it remains insufficient to ensure the fast and large rise in cytosolic Ca^{2+} necessary for proper muscle contraction.

The contribution of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release certainly plays a role in the slow kinetics of activation of voltage-dependent Ca^{2+} release in MTM1-deficient fibers, but it may not be the only underlying reason. Indeed, PtdIns 3-kinase inhibition tended to reduce the time to peak rate of global Ca^{2+} release (Fig. 1C) and enhanced the spatial homogeneity of the Ca^{2+} transients (Fig. 2D). Thus, slower activation is partially reversible on a time scale that hardly fits with improvement of structure defects that are likely the reason for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release to operate. Again, it may be

postulated that an excess of PtdIns 3-kinase products directly alters the normal EC coupling and delays the opening of RYR1 channels.

Although the diversity of cellular functions linked to PtdIns 3-kinase activity would tend to refrain any attempt to use corresponding pharmacological blockers as a therapeutic option, our results provide encouraging evidence that this approach may be beneficial in myotubular myopathy. While revising this manuscript, another study reported that genetic ablation of class II PtdIns 3-kinase corrects the myotubular myopathy phenotype in mice and that oral administration of wortmannin is able to prolong survival of *Mtm1*-KO mice by an average of 10 d (24). In our conditions, the striking increase in survival and maintained mobility of wortmannin-treated *Mtm1*-KO mice are also consistent with an effect of PtdIns 3-kinase inhibition in the whole skeletal musculature, as observed in single isolated muscle fibers. In this context, the effect of wortmannin necessarily includes proper maintenance of the EC-coupling membrane architecture and organization in addition to the acute enhancement of Ca^{2+} release observed in the isolated fibers.

The use of wortmannin in clinics has been traditionally limited by its poor solubility, instability, and toxicity, but interestingly, a nanoparticle formulation of the drug was shown to overcome these drawbacks (25). In any case, our results provide the proof of concept that pharmacological inhibition of PtdIns 3-kinase could represent a strategy to ameliorate the consequences of the disease. Because the search of PtdIns 3-kinase inhibitors is a very active field with a number of compounds being developed and tested in preclinical and clinical trials for cancer (e.g., ref. 26), we speculate that some of these compounds may be beneficial for the treatment of patients with myotubular myopathy.

Materials and Methods

Detailed materials and methods are presented in *SI Materials and Methods*.

Experiments on Isolated Muscle Fibers. Confocal measurements of intracellular Ca^{2+} were performed in single isolated, voltage-clamped muscle fibers from mouse, following previously described procedures (27–29). The holding voltage was always set to -80 mV.

Treatment of Mice with Wortmannin. All experiments and procedures were performed in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of the University Claude Bernard–Lyon 1, the French Ministry of Agriculture (87/848), and the European Community (86/609/EEC). Mice were manipulated and taken care of according to European recommendations on animal experimentation. The experimental protocol used for treatment of mice with wortmannin (DR2015-62) was approved by the animal care committee of the University Claude Bernard Lyon 1 and the French Ministry of Education and Research. WT and *Mtm1*-KO male mice, 23–25 d of age, were injected intraperitoneally with wortmannin (2 mg/kg) three times per week. Wortmannin was dissolved in DMSO diluted 1:25 in sterile saline. Control WT and *Mtm1*-KO mice were treated with the vehicle alone.

Statistics. Unless otherwise specified, data values are presented as means \pm SEM for n fibers. Statistical significance was determined using a Student's t test ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Jimmy Perrot, members of Genethon's platforms, members of the Dubois Animal Housing Facility at University Lyon 1 for expert technical assistance, and Clive Wells from the Electron Microscopy Core Facility at the Medical College of Wisconsin. This work was supported by grants from CNRS, INSERM, and the Université Claude Bernard–Lyon 1 (to the Institut NeuroMyoGène), by a grant from the Société Française de Myologie (SFM) (to C.K.), and by Grant 18648 from the Association Française contre les Myopathies (AFM–Téléthon) (to V.J.). A.B.-B. was supported by the AFM–Téléthon, the Myotubular Trust, and INSERM.

- Al-Qusairi L, et al. (2009) T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(44):18763–18768.
- Ríos E, Pizarro G, Stefani E (1992) Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 54:109–133.
- Schneider M-F (1994) Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol* 56:463–484.
- Taylor G-S, Maehama T, Dixon J-E (2000) Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(16):8910–8915.
- Tronchère H, et al. (2004) Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem* 279(8):7304–7312.
- Csernoch L, Jacquemond V (2015) Phosphoinositides in Ca^{2+} signaling and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: An old player and newcomers. *J Muscle Res Cell Motil* 36(6):491–499.
- Buj-Bello A, et al. (2002) The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(23):15060–15065.
- Endo M (2009) Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 89(4):1153–1176.
- Miller S, et al. (2010) Shaping development of autophagy inhibitors with the structure of the lipid kinase Vps34. *Science* 327(5973):1638–1642.
- Ohta T, et al. (2006) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in vivo ovarian cancer models. *Endocrinology* 147(4):1761–1769.
- Teranishi F, et al. (2009) Phosphoinositide 3-kinase inhibitor (wortmannin) inhibits pancreatic cancer cell motility and migration induced by hyaluronan in vitro and peritoneal metastasis in vivo. *Cancer Sci* 100(4):770–777.
- Louch W-E, et al. (2006) T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca^{2+} release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 574(Pt 2):519–533.
- Song L-S, et al. (2006) Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(11):4305–4310.
- Heinzel F-R, et al. (2008) Remodeling of T-tubules and reduced synchrony of Ca^{2+} release in myocytes from chronically ischemic myocardium. *Circ Res* 102(3):338–346.
- Royer B, et al. (2013) The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep* 14(10):907–915.
- Tjondrokoesoemo A, et al. (2011) Disrupted membrane structure and intracellular Ca^{2+} signaling in adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS One* 6(9):e25740.
- Dowling J-J, Low S-E, Busta A-S, Feldman E-L (2010) Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Hum Mol Genet* 19(13):2668–2681.
- Rodríguez E-G, et al. (2014) Phosphoinositide substrates of myotubularin affect voltage-activated Ca^{2+} release in skeletal muscle. *Pflugers Arch* 466(5):973–985.
- Shen J, et al. (2009) Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca^{2+} homeostasis. *Nat Cell Biol* 11(6):769–776.
- Hohendahl A, Roux A, Galli V (2016) Structural insights into the centronuclear myopathy-associated functions of BIN1 and dynamin 2. *J Struct Biol* 196(1):37–47.
- Ferrantini C, et al. (2014) Impact of detubulation on force and kinetics of cardiac muscle contraction. *J Gen Physiol* 143(6):783–797.
- Figueroa L, et al. (2012) Synthetic localized calcium transients directly probe signalling mechanisms in skeletal muscle. *J Physiol* 590(6):1389–1411.
- Csernoch L (2007) Sparks and embers of skeletal muscle: The exciting events of contractile activation. *Pflugers Arch* 454(6):869–878.
- Sabha N, et al. (2016) PIK3C2B inhibition improves function and prolongs survival in myotubular myopathy animal models. *J Clin Invest* 126(9):3613–3625.
- Karve S, et al. (2012) Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(21):8230–8235.
- Cleary J-M, Shapiro G-I (2010) Development of phosphoinositide-3 kinase pathway inhibitors for advanced cancer. *Curr Oncol Rep* 12(2):87–94.
- Jacquemond V (1997) Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys J* 73(2):920–928.
- Pouvreau S, et al. (2006) Transient loss of voltage control of Ca^{2+} release in the presence of maurocalcine in skeletal muscle. *Biophys J* 91(6):2206–2215.
- Lefebvre R, et al. (2011) Defects in Ca^{2+} release associated with local expression of pathological ryanodine receptors in mouse muscle fibres. *J Physiol* 589(Pt 22):5361–5382.
- Cheng H, Lederer WJ, Cannell M-B (1993) Calcium sparks: Elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262(5134):740–744.

Supporting Information

Kutchukian et al. 10.1073/pnas.1604099113

SI Materials and Methods

MTM1-Deficient Mice. We used WT and MTM1-deficient mice in the 129PAS background. MTM1-deficient mice exhibit a progressive impairment of muscle function as described by Buj-Bello et al. (7).

Experiments on Isolated Muscle Fibers. Single fibers isolated from the *flexor digitorum brevis* and interosseus muscles of 4–5-wk-old WT and *Mtm1*-KO male mice were used under voltage-clamp conditions according to previously described procedures (27–29). In brief, mice were killed by cervical dislocation before removal of the muscles. Muscles were treated with collagenase (Sigma, type 1) for 60 min at 37 °C. Single fibers were then obtained by triturating the muscles within the experimental chamber. Fibers were partially insulated with silicone grease so that only a short portion of the fiber extremity was left out of the silicone, as described previously (27). The Ca^{2+} -sensitive fluorescent indicator rhod-2 was introduced into the myoplasm together with a high concentration of EGTA (see *Solutions*) by diffusion through the tip of the voltage-clamp pipette. The tip of the micropipette was inserted through the silicone within the insulated part of the fiber. Intracellular equilibration of the solution was allowed for a period of 30 min with the holding voltage held at -80 mV, before initiating measurements. To test the effect of PtdIns 3-kinase inhibition on EC coupling, isolated fibers were incubated with 0.1 μM wortmannin and 50 μM LY294002 for either 1 h (short exposure) or overnight (long exposure) before the experiments and throughout the measurements. All experiments were performed at room temperature (20 – 22 °C).

Electrophysiology. An RK-400 patch-clamp amplifier (Bio-Logic) was used in whole-cell voltage-clamp configuration. Command voltage pulse generation was achieved with an analog-digital converter (Digidata 1440A, Axon Instruments) controlled by pClamp 9 software (Axon Instruments). Analog compensation was adjusted to decrease the effective series resistance. For calcium current measurements, removal of the linear leak component was achieved by using the appropriately scaled value of the steady change in membrane current elicited by a 20 -mV hyperpolarization from the holding potential.

Confocal Imaging. Confocal imaging was conducted with a Zeiss LSM 5 Exciter microscope equipped with a $63\times$ oil immersion objective (numerical aperture, 1.4). For detection of rhod-2 fluorescence, excitation was from the 543 nm line of a HeNe laser, and fluorescence was collected above 560 nm. Rhod-2 fluorescence changes were expressed as F/F_0 , where F_0 is the baseline fluorescence. For imaging of the t-tubule network, fibers were incubated for 30 – 60 min in the presence of 10 μM di-8-anepps before establishing the voltage-clamp and rhod-2 measurements conditions. Di-8-anepps fluorescence was measured above 505 nm in response to 458 nm excitation. Intracellular Ca^{2+} -related rhod-2 fluorescence changes were imaged by using the line-scan mode (x,t) of the system with the line parallel to the longitudinal fiber axis. Images were taken with a scanning frequency of 1.15 ms per line. Analysis of the spatial heterogeneity of Ca^{2+} release (Fig. 2) was performed with an ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) macro program, available on request.

$[\text{Ca}^{2+}]$ and Ca^{2+} Release Calculation. The Ca^{2+} release flux underlying the calculated global $[\text{Ca}^{2+}]$ transients was estimated according to a previously described procedure (28, 29). For this,

changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ were calculated from the rhod-2 signals using the pseudoratio equation (30), assuming a basal $[\text{Ca}^{2+}]$ of 0.1 μM and a K_d of rhod-2 for Ca^{2+} of 1.2 μM . The SR calcium release flux was then calculated from the time derivative of the total myoplasmic Ca^{2+} ($[\text{Ca}]_{\text{Tot}}$) obtained from the occupancy of intracellular calcium binding sites. The model included troponin C binding sites, parvalbumin binding sites, and calcium transport across the SR membrane with the same parameters as used in Lefebvre et al. (29). Ca^{2+} binding sites on EGTA were included with a total site concentration of 6 mM, an “on” rate constant $k_{\text{on, EGTA}}$ of 0.056 $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{ms}^{-1}$, and an “off” rate constant $k_{\text{off, EGTA}}$ of 0.002 ms^{-1} . In all sets of data where a comparison was made between several groups of muscle fibers, all fibers were issued from the same type of muscle (either *flexor digitorum brevis* or interosseus) isolated from age-matched animals (except in Fig. S8).

Quantitative RT-PCR Analysis. Tibialis anterior muscle of 6-wk-old male mice was homogenized using MagNa Pure LC RNA Isolation Tissue Lysis Buffer (Roche), and total RNA was isolated using an automated nucleic acid extraction instrument (MagNa Pure 96 System), followed by DNase digestion to minimize genomic DNA contamination (Ambio DNA-free DNA Removal Kit, Life Technologies). RNA was reverse-transcribed using RevertAid H minus Reverse Transcriptase (Fermentas) in the presence of random primers (Fermentas). Quantitative PCR amplifications of cDNA were performed on ABI Prism 7900HT apparatus (Applied Biosystems). Primer sequences for amplification were as described previously (1).

Immunoblot Analysis. Proteins were extracted from mouse quadriceps using a RIPA buffer that contains 50 mM Tris-HCl pH 8.0 , 150 mM NaCl, 0.5% Na deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, and a Protease Inhibitor Mixture (Roche Applied Science) and homogenized in tubes of Lysing Matrix A with a FastPrep-24 (MP Biomedicals). We loaded 50 μg of total proteins into NuPage 3–8% (wt/vol) Tris-Acetate gels in Tris Acetate SDS Running Buffer (Invitrogen) and transferred them onto Immobilon-P membranes (Millipore). Membranes were probed with a mouse monoclonal antibody raised against the RYR1 (Abcam, ab2868), and a mouse monoclonal antibody specific for GAPDH (Millipore, MAB374) was used as the internal control. Detection was performed with a secondary antibody coupled to IRDye 680 (LI-COR) using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biotechnology Inc.).

Electron Microscopy. Electron microscopy was performed for the evaluation of sarcomeric architecture. Briefly, glutaraldehyde-fixed skeletal muscle specimens were processed at the Medical College of Wisconsin EM Core Facility for the evaluation of triad morphology. After confirming appropriate tissue quality on scout sections, longitudinally oriented 30 -nm sections were stained with 2% (wt/vol) uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and electron microscopy was performed using a Hitachi H600 transmission electron microscope. Longitudinally oriented muscle fibers were evaluated and photographed, with photography of the single best oriented region from each myofiber in the specimen at $10,000\times$, $20,000\times$, and $30,000\times$ magnification. Ten fibers per specimen were evaluated and photographed in this manner. The number of t-tubules, longitudinal (l-) tubules, and triad structures were then manually quantified by a blinded, board-certified neuropathologist using the $20,000\times$ magnification

image. The values for all images in a given treatment condition were pooled together to generate average numbers of t-tubules, l-tubules, and triads in that condition.

Solutions. The extracellular solution used contained (in mM) 140 TEA-methanesulfonate, 2.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 4-aminopyridine,

10 Hepes, and 0.002 tetrodotoxin. The intracellular solution contained (in mM) 120 K-glutamate, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 5.5 MgCl₂, 12 EGTA, 4.8 CaCl₂, 0.1 rhod-2, 5 glucose, and 5 Hepes. All solutions were adjusted to pH 7.20. Wortmannin and 3-MA were purchased from Sigma. LY294002 was purchased from Echelon.

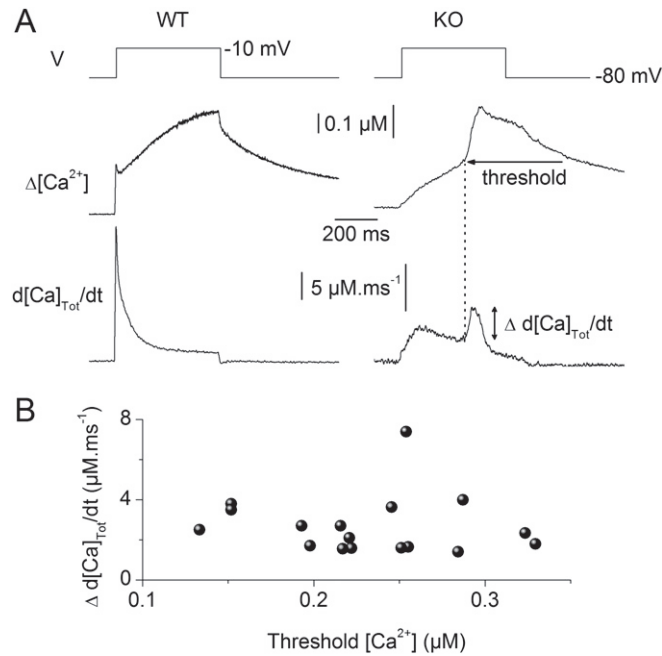


Fig. S1. Evidence for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in MTM1-deficient muscle fibers. (A) Change in cytosolic [Ca²⁺] ($\Delta[Ca^{2+}]$) and corresponding rate of Ca²⁺ release ($d[Ca]_{Tot}/dt$) calculated from line-averaged rhod-2 fluorescence signals collected while applying a 500 ms-long depolarizing pulse to -10 mV in a WT fiber (Left) and in a MTM1-deficient fiber (Right). The MTM1-deficient fiber yields a delayed onset phase of Ca²⁺ release during the pulse: Its amplitude and the corresponding threshold [Ca²⁺] level were determined as indicated. (B) Peak amplitude of the delayed onset phase of Ca²⁺ release as a function of the threshold [Ca²⁺] level. Each data point is from a separate MTM1-deficient muscle fiber.

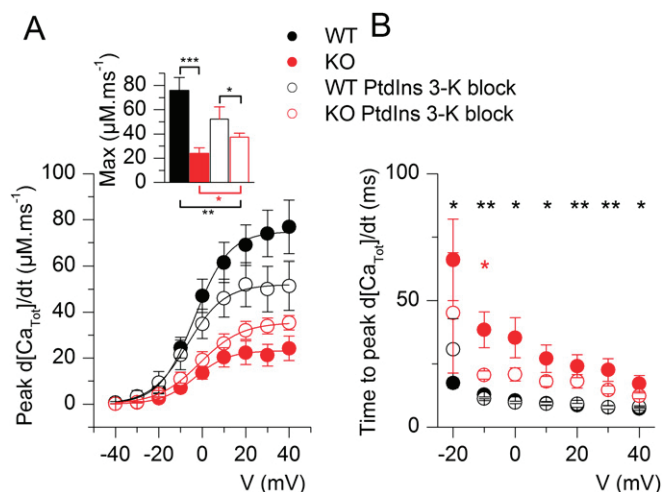


Fig. 53. Defects in voltage-activated global Ca^{2+} release in MTM1-deficient muscle fibers are alleviated by a prolonged exposure to PtdIns 3-kinase inhibitors. (A) Voltage dependence of the peak rate of Ca^{2+} release in WT (black symbols) and MTM1-deficient muscle fibers (red symbols) under control conditions (filled symbols, $n = 7$ and 8 WT and KO fibers, respectively) and following overnight exposure to the PtdIns 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 (PtdIns 3-K block, open symbols, $n = 8$ and 9 WT and KO fibers, respectively). The *Inset* shows the mean values for the maximum rate of Ca^{2+} release in the different conditions: For this, a Boltzmann function was fitted to the individual sets of values in each fiber. (B) Voltage dependence of the mean time to peak rate of Ca^{2+} release in the different conditions. Black and red asterisks report a significant difference between WT and KO fibers and between KO fibers untreated and treated with the PtdIns 3-kinase blockers, respectively. All data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with unpaired t test.

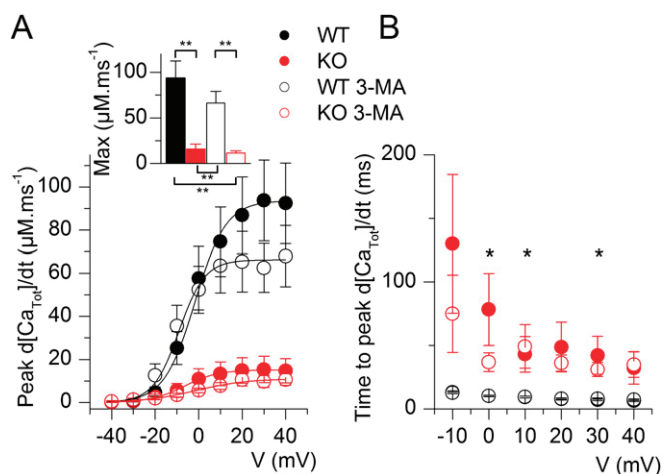


Fig. 54. 3-MA does not rescue the defects in voltage-activated global Ca^{2+} release in MTM1-deficient muscle fibers. (A) Voltage dependence of the peak rate of Ca^{2+} release in WT (black symbols) and MTM1-deficient muscle fibers (red symbols) under control conditions (filled symbols, $n = 7$ and 7 WT and KO fibers, respectively) and following 1 h exposure to 1 mM of the PtdIns 3-kinase inhibitor 3-MA (open symbols, $n = 9$ and 6 WT and KO fibers, respectively). The *Inset* shows the mean values for the maximum rate of Ca^{2+} release in the different conditions: For this, a Boltzmann function was fitted to the individual sets of values in each fiber. (B) Voltage dependence of the mean time to peak rate of Ca^{2+} release in the different conditions. Asterisks report a significant difference between WT and KO fibers. All data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with unpaired t test.

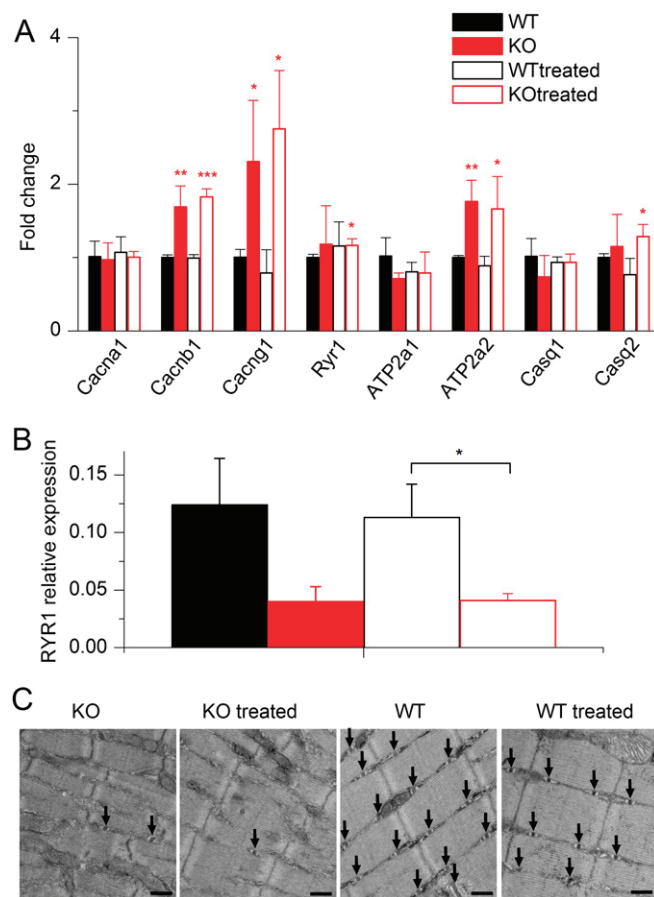


Fig. S7. Absence of changes in the expression of genes of the EC coupling machinery and in muscle fiber structure after 3 wk of wortmannin treatment. (A) Relative fold changes in mRNA level between tibialis muscles from WT, WT treated, KO, and KO treated animals for DHPR α 1, β 1, and γ 1 subunits (*Cacna1s*, *Cacnb1*, and *Cacng1*); type 1 ryanodine receptor (*Ryr1*); type 1 and 2 SERCA pumps (*Atp2a1* and *Atp2a2*); and calsequestrin 1 and 2 (*Casq1* and *Casq2*). Data are mean \pm SD. All fold changes were calculated versus the value of the WT group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with unpaired t test. The major changes in the diseased muscles corresponded to an increased level of DHPR β 1 and γ 1 subunits and in SERCA2. These changes persisted in muscles from the treated KO animals, whereas no other substantial modification was detected in muscles from both treated WT and KO animals. (B) Immunoblot analysis showing no change in the protein level of RYR1 between treated and untreated KO muscles ($n = 5$ in each group). GAPDH was used as the internal control. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ with unpaired t test. (C) Ultrastructure evaluation of muscles from wortmannin-treated and untreated animals. Electron microscopy performed on longitudinal sections of skeletal muscle reveals approximately appropriate myofibrillar and mitochondrial morphology, with variable numbers of triad structures (arrows) in the intermyofibrillar space. Images shown are at 30,000 \times magnification. (Scale bar, 500 nm.) Upon visual inspection, the MTM and WT specimens were easily distinguishable from one another due to the presence of sarcofibrillar disorganization and differences in myofibril thickness and organization. A distinction between wortmannin-treated and untreated states within each genotype was not possible, and this was supported by our quantitation of t-tubules, l-tubules, and triads (Table S2).

Table S2. Quantitation of t-tubules, l-tubules, and triads in muscles from mice treated with wortmannin and untreated during 3 wk

Tubules and triads counts	WT, $n = 50$	KO, $n = 40$	WT treated, $n = 50$	KO treated, $n = 40$
t-tubules counts	20.42 ± 0.88	2.55 ± 0.67	16.36 ± 0.92	2.6 ± 0.46
l-tubules counts	0.02 ± 0.02	0.15 ± 0.09	0.06 ± 0.03	0.38 ± 0.12
Triad counts	20.44 ± 0.87	2.83 ± 0.69	16.42 ± 0.91	2.98 ± 0.5

Ten images per muscle from 4 KO and 5 WT mice were examined in each condition. Data are mean \pm SEM.



Movie S1. Treated and nontreated 7-wk-old *Mtm1*-KO mice. The mouse on the right at the beginning of the sequence has been treated with wortmannin.

[Movie S1](#)



Movie S2. A 22-wk-old *Mtm1*-KO mouse treated with wortmannin.

[Movie S2](#)

Section 3.

ETUDE DE LA SIGNALISATION CALCIQUE ET DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DANS LA FIBRE MUSCULAIRE D'UN MODELE MURIN DE LA MYOPATHIE CENTRONUCLEAIRE AUTOSOMIQUE DOMINANTE

Article 3 : **Kutchukian, C.**, Szentesi, P., Allard, B., Trochet, D., Beuvin, M., Berthier, C., Tourneur, Y., Guicheney, P., Csernoch, L., Bitoun, M., et al. (2017). Impaired excitation-contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2^{R465W} mouse model of centronuclear myopathy. *J. Physiol. (Lond.)* 595, 7369–7382.

Chez l'Homme des mutations dans le gène *DNM2* sont responsables de la myopathie centronucléaire autosomique dominante (AD-CNM), caractérisée par une faiblesse musculaire généralisée plus ou moins sévère. Une augmentation de la concentration cytosolique de Ca²⁺ de repos ainsi que du contenu calcique du RS ont été décrites dans les fibres musculaires d'un modèle murin de l'AD-CNM (Durieux et al., 2010; Fraysse et al., 2016), suggérant qu'un défaut de l'homéostasie calcique puisse contribuer à la faiblesse musculaire associée à cette pathologie. Il était alors particulièrement intéressant d'évaluer la fonction du couplage EC et de la signalisation calcique dans les fibres musculaires squelettiques de ce modèle. Pour cela, nous avons employé les mêmes techniques d'électrophysiologie et d'imagerie calcique que celles utilisées dans la section précédente. La souris knock-in (KI)-Dnm2^{R465W}, qui porte la mutation la plus fréquente de la maladie humaine, nous a été fournie par le Dr. Marc Bitoun (UPMC, Institut de Myologie).

Légère altération du réseau de tubules T dans les fibres musculaires KI-Dnm2^{R465W}

Etant donné que les altérations structurales du réseau de tubules T sont une caractéristique principale de la myopathie myotubulaire et contribuent aux défauts du couplage EC, il était d'intérêt majeur de tester si des altérations similaires sont présentes dans les fibres musculaires KI-Dnm2^{R465W}. L'imagerie de fluorescence du di-8-ANEPPS n'a pas révélé de défauts aigus de l'organisation du réseau de tubules T semblables à ceux observés sur le modèle déficient en MTM1. Cependant, nous avons tout de même quantifié une réduction de 10 % de la densité du réseau de tubules T dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} par rapport aux fibres contrôles, suggérant la présence de défauts subtils pouvant contribuer à la pathologie. Nous avons par ailleurs mesuré une réduction de 8 % du

diamètre des fibres KI-Dnm2^{R465W}, en accord avec l'atrophie déjà caractérisée chez ce modèle (Durieux et al., 2010).

Réduction de la densité de courant calcique à travers le DHPR dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}

Les courants membranaires déclenchés par des dépolarisations d'amplitudes croissantes ont été enregistrés simultanément à l'acquisition des signaux de fluorescence de l'indicateur calcique rhod-2. Nos résultats indiquent une réduction de 36 % du condensateur membranaire dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} par rapport aux fibres contrôles. De plus, nous montrons une réduction de 70 % de la conductance calcique maximale du DHPR, associée à un décalage de la sensibilité au potentiel du système vers des valeurs plus négatives. A l'aide de la technique de *Western Blot* réalisée sur des extraits protéiques de muscles *tibialis anterior* de souris contrôles et KI-Dnm2^{R465W}, nous avons montré que le taux de Ca_v1.1 est similaire dans ces deux conditions. Ceci suggère que la réduction du courant calcique dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} n'est pas due à une réduction d'expression mais à une perte de fonction du DHPR.

Altérations de l'efflux calcique dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé les propriétés complètes de l'efflux calcique du RS sur des fibres musculaires isolées de souris contrôles et KI-Dnm2^{R465W}, en condition de potentiel imposé. Nos résultats indiquent une réduction de 30 % de l'amplitude maximale de l'efflux calcique du RS dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} par rapport aux fibres contrôles. De manière intéressante, le calcul de la quantité de calcium total libéré durant de fortes dépolarisations ne montre aucune différence entre les deux types de fibres, suggérant que le stock calcique du RS n'est pas affecté. De plus, nos résultats ont révélé une réduction significative des cinétiques d'activation de l'efflux calcique dans les fibres malades par rapport aux fibres contrôles.

Variabilité spatiale de l'efflux calcique du RS dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}

A l'instar des fibres *Mtm1* KO, bien que dans une moindre mesure, l'analyse détaillée des images en mode balayage de ligne a révélé une hétérogénéité spatiale du signal calcique dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}. Plus précisément, alors que le signal calcique des fibres contrôles est très homogène le long de la ligne de scan, le temps au pic du flux calcique est généralement retardé et variable entre deux régions adjacentes d'une même fibre.

Présence de sparks calciques spontanés dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} au repos

Dans la fibre musculaire squelettique différenciée, la capacité des canaux RYR1 à être activés par le Ca²⁺ cytosolique est réprimée par le couplage mécanique avec le DHPR. Cependant, cette inhibition peut être levée en conditions artificielles de stress cellulaire, et se manifeste alors par la présence d'événements calciques élémentaires spontanés appelés *sparks*. Afin de tester si ce mécanisme est perturbé dans la présente condition pathologique, nous avons enregistré des images confocales de la fluorescence de l'indicateur calcique fluo-4 dans des fibres contrôles et KI-Dnm2^{R465W} au repos. Les résultats ont montré la présence de *sparks* calciques dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}, contrairement aux fibres contrôles qui présentent une fréquence beaucoup plus faible de tels événements. L'analyse révèle également que l'amplitude et la largeur moyennes des *sparks* calciques sont plus élevées dans les fibres malades par rapport à celles des rares événements détectés dans les fibres contrôles.

Conclusions

Dans cette étude nous avons identifié une altération de la fonction du couplage EC dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}, probablement impliquée dans la faiblesse musculaire associée à l'AD-CNM. Cependant, contrairement aux fibres musculaires du modèle murin *Mtm1* KO, les fibres KI-Dnm2^{R465W} ne présentent pas d'altérations apparentes du système tubulaire transverse. Une faible réduction de la densité de tubules T a cependant été mesurée dans les fibres malades et pourrait refléter de subtiles altérations indétectables avec le di-8-ANEPPS, probablement liées au rôle de DNM2 dans la fission membranaire (Chin et al., 2015). Ce défaut ainsi que l'atrophie contribuent très certainement à la réduction du condensateur membranaire des fibres KI-Dnm2^{R465W}. De manière intéressante, une réduction du condensateur membranaire a également été rapportée dans les cellules cardiaques déficientes en BIN1, et serait due en partie à une réduction du nombre de replis membranaires dans les tubules transverses (Hong et al., 2014). Ainsi, compte tenu du rôle commun de ces deux protéines dans la tubulation membranaire, on pourrait supposer un mécanisme similaire dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}. Cependant, contrairement à MTM1 et BIN1 qui apparaissent localisées dans la région triadique (Lee et al., 2002; Rodríguez et al., 2014), DNM2 a été identifiée à proximité de la ligne Z (Durieux et al., 2010). On pourrait alors supposer qu'il existe deux populations distinctes de DNM2 dans la fibre musculaire, dont la localisation, la concentration et la fonction est spécifique à chacune. Une autre hypothèse serait que DNM2 régule à distance l'organisation triadique/des tubules T, ou qu'elle soit capable de transiter de la ligne Z à la triade dans certaines situations. Ainsi, on peut suspecter que l'interaction entre les canaux RYR1 et DHPRs soit déstabilisée, ce qui expliquerait la réduction de 30 % de l'amplitude ainsi que l'hétérogénéité spatiale de l'efflux calcique du RS observés dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}. Il est toutefois important de mentionner que ces altérations

affectent dans une moindre mesure les fibres musculaires KI-Dnm2^{R465W} par rapport aux fibres *Mtm1* KO, lesquelles présentent une réduction de 60 % de l'efflux calcique. Ceci joue certainement un rôle clé dans la différence de sévérité entre les deux CNMs. Par ailleurs, l'hétérogénéité spatiale du signal calcique dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} affecte principalement la vitesse d'activation de l'efflux de Ca²⁺ du RS. Ceci, associé à la présence d'événements calciques élémentaires au repos dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}, est une signature classique du phénomène de Ca²⁺-induced Ca²⁺ release dans le muscle, et suggère que malgré l'absence d'altérations structurales apparentes, certains canaux RYR1 ne sont plus sous le contrôle répressif des DHPRs et peuvent ainsi être activés par le Ca²⁺ cytosolique. De plus, nos résultats révèlent qu'à l'échelle macroscopique, ce retard de l'efflux calcique est tout à fait similaire à celui mesuré dans les fibres *Mtm1* KO, suggérant que ce défaut ne joue pas un rôle majeur dans la sévérité de la faiblesse musculaire associée à la CNM. Enfin, à l'instar des fibres *Mtm1* KO, les fibres KI-Dnm2^{R465W} présentent une forte réduction de la densité de courant calcique qui n'est pas associée à une réduction du taux de Ca_v1.1, suggérant une perte de la fonction canal des DHPRs dans les fibres pathologiques. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que l'altération de l'homéostasie calcique dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} participe à la faiblesse musculaire associée à l'AD-CNM. De manière intéressante, une surexpression de DNM2 a été rapportée dans les fibres *Mtm1* KO et une réduction de l'expression de DNM2 améliore le phénotype des souris *Mtm1* KO (Cowling et al., 2011, 2014), suggérant une augmentation/altération pathologique de l'activité de DNM2 dans la XL-CNM. Ainsi les altérations telles que le retard de l'efflux calcique et la réduction du courant calcique, communes entre les deux modèles de la CNM, pourraient résulter d'une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de DNM2. En revanche, l'altération du réseau de tubules T et la réduction de l'efflux calcique affectent plus sévèrement le modèle *Mtm1* KO, et pourraient être déterminants dans la différence de sévérité entre les deux formes de CNM.

Impaired excitation–contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2^{R465W} mouse model of centronuclear myopathy

Candice Kutchukian¹ , Peter Szentesi², Bruno Allard¹ , Delphine Trochet³, Maud Beuvin³, Christine Berthier¹, Yves Tourneur^{4,5}, Pascale Guicheney⁶ , Laszlo Csernoch², Marc Bitoun³ and Vincent Jacquemond¹ 

¹Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, Villeurbanne, France

²Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

³Research Center for Myology, UPMC Univ Paris 06 and INSERM UMR_S974, Institute of Myology, Paris, France

⁴CarMeN, INSERM U1060, Faculté de Médecine Lyon Sud, Oullins, France

⁵UFPE Dept Nutrição, Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, Brazil

⁶Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMR_S1166, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Paris, France

Edited by: Don Bers & Michael Shattock

Key points

- Dynamin 2 is a ubiquitously expressed protein involved in membrane trafficking processes.
- Mutations in the gene encoding dynamin 2 are responsible for a congenital myopathy associated with centrally located nuclei in the muscle fibres.
- Using muscle fibres from a mouse model of the most common mutation responsible for this disease in humans, we tested whether altered Ca²⁺ signalling and excitation–contraction coupling contribute to muscle weakness.
- The plasma membrane network that carries the electrical excitation is moderately perturbed in the diseased muscle fibres.
- The excitation-activated Ca²⁺ input fluxes across both the plasma membrane and the membrane of the sarcoplasmic reticulum are defective in the diseased fibres, which probably contributes to muscle weakness in patients.

Abstract Mutations in the gene encoding dynamin 2 (DNM2) are responsible for autosomal dominant centronuclear myopathy (AD-CNM). We studied the functional properties of Ca²⁺ signalling and excitation–contraction (EC) coupling in muscle fibres isolated from a knock-in (KI) mouse model of the disease, using confocal imaging and the voltage clamp technique. The transverse-tubule network organization appeared to be unaltered in the diseased fibres, although its density was reduced by ~10% compared to that in control fibres. The density of Ca²⁺ current through CaV1.1 channels and the rate of voltage-activated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release were reduced by ~60% and 30%, respectively, in KI vs. control fibres. In addition, Ca²⁺ release in the KI fibres reached its peak value 10–50 ms later than in control ones. Activation of Ca²⁺ transients along the longitudinal axis of the fibres was more heterogeneous in the KI than in the control fibres, with the difference being exacerbated at intermediate membrane voltages. KI fibres exhibited spontaneous Ca²⁺ release events that were almost absent from control fibres. Overall, the results of the present study demonstrate that Ca²⁺ signalling and EC coupling exhibit a number of dysfunctions likely contributing to muscle weakness in DNM2-related AD-CNM.

(Resubmitted 24 July 2017; accepted after revision 20 October 2017; first published online 26 October 2017)

Corresponding author V. Jacquemond, Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Université Claude Bernard Lyon 1, Bât. Raphaël Dubois, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, F69622 Villeurbanne, France. Email: vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr

Abbreviations AD, autosomal dominant; BIN1, amphiphysin 2; CNM, centronuclear myopathy; DNM2, dynamin 2; EC, excitation–contraction; FDB, flexor digitorum brevis; FWHM, full width at half-maximum; KI, knock-in; MyHC, myosin heavy chain; MTM1, myotubularin; PBS, phosphate-buffered saline; PH, pleckstrin homology; RYR1, type 1 ryanodine receptor; SR, sarcoplasmic reticulum; WT, wild-type.

Introduction

In skeletal muscle, Ca^{2+} released from the sarcoplasmic reticulum (SR) through type 1 ryanodine receptor (RYR1) channels generates the rise in cytosolic Ca^{2+} concentration that triggers contraction. The process is under the control of electrical activity in the transverse invaginations of the plasma membrane (the t-tubules) where it is sensed by the dihydropyridine receptor Ca^{2+} channel $\text{CaV}1.1$, which physically controls RYR1 channel opening (Rios *et al.* 1992; Schneider, 1994; Dulhunty *et al.* 2017). Centronuclear myopathies (CNMs) encompass a group of inherited diseases that yield heterogeneous features in terms of age of onset and muscle weakness severity and progression, with all of them being associated with the presence of nuclei in a central position within the muscle fibres. Most well-known mutations responsible for CNMs affect the genes encoding myotubularin (MTM1; Laporte *et al.* 1996), amphiphysin 2 (BIN1; Nicot *et al.* 2007) and dynamin 2 (DNM2; Bitoun *et al.* 2005). Although great progress has been made in the recent years with respect to the knowledge of the corresponding diseases, the underlying detailed pathophysiological mechanisms still remain unclear (Jungbluth & Gautel, 2014).

DNM2 is an ubiquitously expressed GTPase interacting with actin and microtubules and involved in endocytosis, membrane trafficking and centrosome cohesion (Durieux *et al.* 2010b). From the N- to C-terminus, the protein is constituted by a GTPase domain, a ‘stalk’ region essential for the protein structure, a pleckstrin homology (PH) domain, a GTPase effector domain and a domain enriched in proline and arginine (Cao *et al.* 1998). DNM2-related autosomal dominant (AD)-CNM was initially characterized as a slowly-progressing muscle weakness affecting distal muscles with onset in early adulthood, resulting from mutations affecting the stalk domain of the protein (Bitoun *et al.* 2005; Jeub *et al.* 2008). However, mutations affecting the PH domain were subsequently also identified in more severe neonatal sporadic forms of the disease (Bitoun *et al.* 2007). A knock-in (KI) heterozygous mouse model of the most common mutation in the DNM2 human gene was generated by Durieux *et al.* (2010a, KI-*Dnm2*^{R465W}) and found to reproduce the main symptoms of the human disease. In brief, mice develop progressive muscle weakness starting at ~3 weeks of age, which occurs first with no associated loss in muscle mass or morphological abnormalities. Subsequently, at ~2 months of age, atrophy develops, together with the appearance of alterations in mitochondria and the

reticular membrane network, similar to those reported in biopsies from human patients. Defective membrane trafficking, including altered autophagy, was highlighted as a potentially major mechanism of the disease (Durieux *et al.* 2010a, b, 2012; Bohm *et al.* 2012). However, a possible contribution of disturbed intracellular Ca^{2+} homeostasis was also highlighted: indeed, the resting Ca^{2+} level and releasable sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content were reported to be elevated in muscle fibres from KI-*Dnm2*^{R465W} mice, in concurrence with impaired contractile properties (Durieux *et al.* 2010a; Fraysse *et al.* 2016). Interestingly, defective intracellular Ca^{2+} homeostasis and excitation–contraction (EC) coupling are hallmarks of the centronuclear myopathy resulting from MTM1 deficiency (Al Qusairi *et al.* 2009; Kutchukian *et al.* 2016) and altered Ca^{2+} signals were also reported in muscle fibres down-expressing BIN1 (Tjondrokoesoemo *et al.* 2011). Thus, Ca^{2+} homeostasis and EC coupling may represent commonly affected targets in all CNMs. The present study aimed to contribute to resolving this issue by investigating the detailed properties of voltage clamp-activated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in muscle fibres isolated from KI-*Dnm2*^{R465W} mice. Interestingly, the results obtained demonstrate that the pathophysiological consequences of the *Dnm2* mutation on Ca^{2+} signalling and EC coupling share certain specific features with those associated with MTM1 deficiency (Kutchukian *et al.* 2016).

Methods

Ethical approval

All of the experiments and procedures were conducted in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of the University Claude Bernard – Lyon 1, the French Ministry of Agriculture (decree 87/848) and the revised European Directive 2010/63/EU and conform with the principles and regulations as described in Grundy (2015). All experiments were performed at room temperature (20–22°C).

Preparation of the muscle fibres

We used 6-month-old wild-type (WT) and heterozygous KI-*Dnm2*^{R465W} (also referred to as KI) male mice in the C57BL/6 genetic background (Durieux *et al.* 2010a). Mice were manipulated and taken care of in accordance with European recommendations on animal experimentation.

Single fibres were isolated from the flexor digitorum brevis (FDB) and interosseus muscles in accordance with previously described procedures (Jacquemond, 1997). In brief, mice were anaesthetized with isoflurane and killed by cervical dislocation. Muscles were removed and incubated for 60 min at 37°C in the presence of external Tyrode solution containing 2 mg mL⁻¹ collagenase (type 1; Sigma, St Louis, MO, USA). Single fibres were obtained by triturating the collagenase-treated muscles within the experimental chamber. Fibre diameter was estimated from direct microscopic observation of isolated fibres viewed with a 40× objective. Comparisons were always made between groups of fibres issued from the same muscle type (either FDB or interosseous). Experiments were carried out on muscle fibres isolated from the muscles of both hindlimbs from three WT and four KI mice.

Electrophysiology

We used the silicone voltage clamp technique (Jacquemond, 1997; Lefebvre *et al.* 2014). In brief, fibres from the interosseous muscles were partly insulated with silicone grease so that only a short portion (50–100 μm long) of the fibre extremity remained out of the silicone. Fibres were bathed in the standard extracellular solution used for voltage clamp. An RK-400 patch clamp amplifier (Bio-Logic, Claix, France) was used in whole-cell voltage clamp configuration in combination with an analogue–digital converter (Digidata 1440A; Axon Instruments, Foster City, CA, USA) controlled using pClamp 9 software (Axon Instruments). Voltage clamp was performed with a micropipette filled with a solution mimicking the ionic composition of the cytosolic compartment and also containing a high concentration of EGTA and the fluorescent Ca²⁺-sensitive probe rhod-2. The tip of the micropipette was inserted through the silicone, within the insulated part of the fibre, and it was gently crushed against the bottom of the chamber to ease intracellular equilibration. Analogue compensation was adjusted to further decrease the effective series resistance. Intracellular equilibration of the solution was allowed for a period of 30 min with the holding voltage held at –80 mV before initiating measurements. Membrane depolarizing steps of 0.5 s in duration were applied from a holding command potential of –80 mV. For calcium current analysis, the linear leak component of the membrane current was removed using the appropriately scaled value of the steady change in membrane current elicited by a 20 mV hyperpolarization from the holding potential. The voltage dependence of the peak current was fitted with the equation:

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

where $I(V)$ is the peak current density at the command voltage V , G_{\max} is the maximum conductance, V_{rev} is

the apparent reversal potential, $V_{0.5}$ is the half-activation potential and k is the steepness factor.

Confocal imaging and analysis

Confocal imaging was conducted with an LSM 5 Exciter microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 63× oil immersion objective (numerical aperture 1.4). For detection of rhod-2 fluorescence, excitation was from the 543 nm line of a HeNe laser and fluorescence was collected above 560 nm. Rhod-2 Ca²⁺ transients were imaged using the line-scan mode (x, t) of the system with the line parallel to the longitudinal axis of the fibres. Images were taken with a scanning frequency of 1.15 ms per line. Rhod-2 fluorescence changes were expressed as F/F_0 where F_0 is the baseline fluorescence. For imaging the t-tubule network, FDB muscle fibres were incubated for 30 min in the presence of 10 μM di-8-anepps in Tyrode solution. For Ca²⁺ sparks measurements, FDB fibres were incubated for 30 min in the presence of Tyrode solution containing 10 μM fluo-4 AM. For both di-8-anepps and fluo-4 imaging, fluorescence was collected above 505 nm with 488 nm excitation. Estimation of the t-tubule density from the di-8-anepps fluorescence was carried out from a largest possible region of interest excluding the plasma membrane, within each fibre. Two images were taken at distinct locations along each fibre. Analysis was carried out with ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Automatic thresholding with Otsu's method was used to create a binary image of the surface area occupied by t-tubules. Then, the 'skeletonize' function was used to delineate the t-tubule network. T-tubule density was expressed as the percentage of positive pixels within the region.

Analysis of Ca²⁺ sparks was carried out in accordance with procedures described previously (Csernoch *et al.* 2008; Szabó *et al.* 2010). In brief, the region of the fibre and the background was defined on the first image of each x, y image series. The averaged background fluorescence was subtracted from each pixel of all images in one series. The calcium release events were detected by the stationary wavelet method. The filtering was made by soft thresholding wavelet detection. Finally, the amplitude and full width at half-maximum (FWHM) of the sparks was calculated. Two FWHM values were calculated: perpendicular and parallel with the Z-lines. To detect the Z-lines, the frequency spectrum in each line of all images was calculated using fast Fourier transform. Finally, inverse fast Fourier transform of the frequency components correspond to sarcomeres was used to remove the Z-lines from the images. The analysis of line scan images was performed with automatic event detection software (Szabo *et al.* 2010), which calculated the amplitude (F/F_0), FWHM and the duration of the identified events.

[Ca²⁺] and Ca²⁺ release calculation

The Ca²⁺ release flux underlying the rhod-2 Ca²⁺ transients was estimated from the time derivative of the total myoplasmic Ca²⁺ ([Ca_{Tot}]) obtained from the occupancy of intracellular calcium binding sites in accordance with a procedure described previously (Pouvreau *et al.* 2006; Lefebvre *et al.* 2011). For this, changes in [Ca²⁺] were calculated from the rhod-2 signals using the pseudo-ratio equation (Cheng *et al.* 1993) assuming a basal [Ca²⁺] of 0.1 μM and a *K_d* of rhod-2 for Ca²⁺ of 1.2 μM. The model included troponin C (TN) binding sites, parvalbumin binding sites and calcium transport across the SR membrane with the same parameters as those used in Lefebvre *et al.* (2011). Ca²⁺-binding sites on EGTA provided the major contribution with a total sites concentration of 6 mM, an 'on' rate constant *k_{on}*, EGTA of 0.056 μM⁻¹ ms⁻¹ and an 'off' rate constant *k_{off}*, CaTN of 0.002 ms⁻¹.

Quantification of the spatial heterogeneity of Ca²⁺ release activation was achieved as described previously (Kutchukian *et al.* 2016) by calculating the SD of the time to peak rate of rise in the rhod-2 *F/F₀* signal along the scanned line. To reduce noise, analysis was performed on a space- and time-filtered version of the images of rate of change in rhod-2 fluorescence: for this, line-scan images of the rate of change in *F/F₀* (*dF/F₀/dt*) were resampled from 512 to 64 pixels (0.1–0.8 μm per pixel) after linear averaging in the space domain, and the time derivative was calculated with a *dt* of 4 pixels (4.6 ms). Furthermore, the value for the time to peak *dF/F₀/dt* at a given position of the line was discarded if the corresponding absolute *dF/F₀/dt* value did not exceed five times the SD of the signal amplitude measured at the same line position, after the end of the pulse.

Myosin heavy chain (MyHC) composition

Fibre typing in muscle was determined according to the expression of MyHC isoforms by immunofluorescence analysis. Seven μm thick cryosections of tibialis anterior muscle from 5-month-old mice were made using a CM3050S cryostat (Leica). For immunostaining analysis, tissue sections were blocked for 1 h in 3% bovine serum albumin IgG-free. Monoclonal antibodies against MyHC isoform slow MyHC-1 (BA-D5-s, 1/2) and MyHC-2A (SC-71-s, 1/2) were applied at room temperature for 2 h and then MyHC-2B (BF-F3-s, 1/1) was applied at 4°C overnight. All MyHC antibodies were obtained from DSHB (Iowa City, IA, USA). Sections were respectively revealed by goat anti-mouse IgG2b Cy3-conjugated AffiniPure, goat anti-mouse IgG1 DyLight 488-conjugated AffiniPur and goat anti-mouse IgM AMCA-conjugated AffiniPur (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA) and mounted in Mowiol Medium.

Image acquisition was performed using an AZ100 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and the number of each fibre type was quantified using ImageJ.

Protein extraction and western blotting

Frozen tibialis anterior muscles were homogenized on ice, using a Potter-Elvehjem homogenizer, in lysis buffer containing 50 mM of Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and NP40 1% supplemented with protease inhibitor cocktail 1% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). After centrifugation (14,000 g at 4°C for 15 min), the protein concentration in the supernatant was determined with a BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Villebon sur Yvette, France). Proteins (30 μg) were mixed with loading buffer (50 mM Tris-HCl, SDS 2%, glycerol 10%, β-mercaptoethanol 1% and bromophenol blue). Protein samples were separated on Nupage 4–12% Bis Tris gel (Life Technologies, Saint-Aubin, France) and transferred onto nitrocellulose membranes (0.45 μm pore size; Life Technologies) overnight at 100 mA at 4°C. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS) containing non-fat dry milk 5% and Tween-20 0.1% and then exposed to mouse monoclonal anti-α1 subunit of DHPR (Merck-Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) or mouse monoclonal anti-α tubulin (Sigma-Aldrich) in PBS-Tween-20 0.1% and milk 1% overnight at 4°C. Membranes were rinsed in PBS-Tween-20 0.1% and incubated for 2 h with HRP-conjugated secondary antibody (anti-mouse from Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) in PBS-Tween-20 0.1%. Chemiluminescence was detected using an ECL detection Kit (Merck-Millipore) in a G-Box imaging system (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) and signal quantification was performed using ImageJ.

Solutions

Tyrode solution contained (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 2 MgCl₂ and 10 Hepes. The extracellular solution used for voltage clamp contained (in mM) 140 TEA-methanesulphonate, 2.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 4-aminopyridine, 10 Hepes and 0.002 tetrodotoxin. The pipette solution contained (in mM) 120 K-glutamate, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 5.5 MgCl₂, 15 EGTA, 6 CaCl₂, 0.1 rhod-2, 5 glucose and 5 Hepes. Di-8-anepps and fluo-4 AM were dissolved and stored in dimethyl sulfoxide. All solutions were adjusted to pH 7.20.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Origin, version 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). For all comparisons, only muscle fibres issued from the same type of muscle (either FDB or interosseous) were used.

Data values are presented as the mean \pm SD for n fibres. Unless otherwise specified, statistical significance was determined using Student's t test ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$). Normality of datasets was checked for each statistical analysis.

Results

Mildly altered t-tubule network in KI-*Dnm2*^{R465W} muscle fibres

An altered t-tubule network is a hallmark of the CNM resulting from MTM1 deficiency and contributes to the associated failing EC coupling (Al Qusairi *et al.* 2009). It was thus of great interest to determine whether a similar process occurs in the KI-*Dnm2*^{R465W} model. Figure 1A shows representative confocal frames of di-8-annepps fluorescence from WT and KI-*Dnm2*^{R465W} fibres. The two images, together with corresponding longitudinal profiles of fluorescence intensity (Fig. 1B) along the indicated regions of interest, demonstrate that there was no striking difference reproducibly catching the eye between WT and KI fibres. Assuming two t-tubules per sarcomere, sarcomere length was estimated from the number of double-peaks within the profile length. Mean \pm SD absolute sarcomere length values were very similar in WT (1.96 ± 0.03 , $n = 29$) and KI fibres (1.98 ± 0.04 , $n = 37$, $P = 0.04$). To quantify the t-tubule density, the network was outlined as illustrated in Fig. 1C (see Methods) and expressed as a percentage of the total surface of the region. Corresponding values for t-tubule density index are shown in Fig. 1C.

The mean \pm SD density index was reduced by $\sim 10\%$ in KI (7.97 ± 0.98 , $n = 37$) compared to WT fibres

(8.67 ± 1.1 , $n = 29$, $P = 0.008$). Thus, altogether, the t-tubule network appears far less affected in this model of CNM than in the case of MTM1 deficiency (Al Qusairi *et al.* 2009). However, it should be noted that local defects in the network similar to those reported in MTM1-deficient muscle fibres (Al Qusairi *et al.* 2009; Kutchukian *et al.* 2016) were identified in three out of the 37 imaged KI fibres, with one fibre exhibiting extended alterations giving the lowest value of t-tubule density index (4.8).

Another feature of MTM1-deficiency is muscle atrophy (Buj Bello *et al.* 2002) and this was also a feature associated with impairment of contractile properties of the tibialis anterior of KI-*Dnm2*^{R465W} mice (Durieux *et al.* 2010a). We thus checked whether this was also the case for the fibres used in the present study. The mean \pm SD diameter was reduced by 8% in the KI group compared to the WT group ($42.7 \pm 8.5 \mu\text{m}$, $n = 81$, vs. $39.4 \pm 10.7 \mu\text{m}$, $n = 95$, respectively, $P = 0.03$).

Depressed CaV1.1 Ca²⁺ current density in KI-*Dnm2*^{R465W} muscle fibres

Membrane currents were measured simultaneously to rhod-2 Ca²⁺ transients in response to voltage clamp depolarizing pulses of 0.5 s duration. The mean \pm SD capacitance from WT and KI fibres measured from the change in current elicited by a 20 mV hyperpolarizing pulse from -80 mV was 2.2 ± 0.7 ($n = 22$) and 1.4 ± 0.4 nF ($n = 25$), respectively. The value was thus significantly reduced by 36% ($P < 0.0001$) in the KI fibres. Assuming that, on average, the same fibre length was voltage clamped in the two groups of fibres, this difference is quite substantial. Figure 2A shows representative traces of CaV1.1 Ca²⁺ current in response to membrane

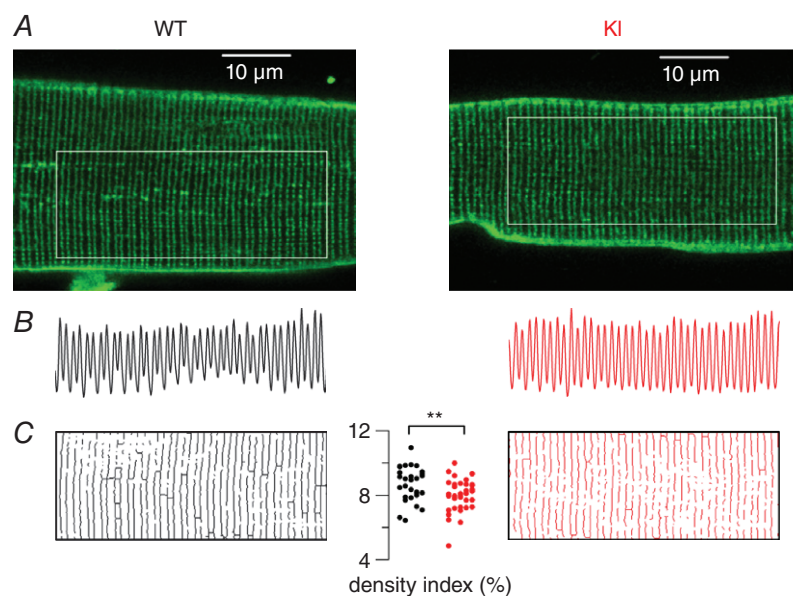


Figure 1. T-tubule network in WT and KI-*Dnm2*^{R465W} fibres

A, x,y fluorescence images of di-8-annepps staining of the t-tubule network in a WT (left) and in a KI (right) muscle fibre. The analysis shown in (B) and (C) was performed within the region of interest highlighted by a white box in each image. B, longitudinal profile of fluorescence along the corresponding region of interest shown in (A). C, outlined t-tubule network within each region of interest; thresholding was used to create a binary image of the network. The graph in the middle shows values for the t-tubule density index in the two groups of fibres, calculated as the percentage of above-threshold pixels in the regions of interest. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

depolarizing steps of increasing amplitude in a WT and in a KI muscle fibre. Figure 2B shows the mean peak current density vs. voltage relationships from 22 WT and 23 KI fibres, whereas the mean parameters obtained from fitting each individual voltage-dependence are shown in Fig. 2C. There was a severe decrease in the peak amplitude of the current, which translated into a 70% decrease of the peak conductance associated with an 11 mV negative shift of the half-activation voltage. The apparent reversal voltage also significantly differed between the two groups. However, this difference should be interpreted with caution considering that we did not measure the current at sufficiently large voltages to accurately appreciate this parameter. In any case, the results clearly highlight a severe alteration of CaV1.1-mediated Ca²⁺ entry in the diseased fibres. The time course of inactivation was estimated by fitting a single exponential function to the decaying phase of the current for membrane voltage values between 0 and +40 mV. For voltages between 0 and +30 mV, mean values for the time constant tended

to be larger in the KI than in WT fibres (by 10–30%). However differences between the two groups were not significant. For example, at +10 mV, mean \pm SD values were 55.5 ± 15.6 ms ($n = 22$) and 73.9 ± 41.7 ms ($n = 25$, $P = 0.056$) in WT and KI fibres, respectively.

To determine whether the depressed Ca²⁺ current density was the result of a reduced amount of CaV1.1 protein, a western blot analysis was performed on protein extracts from tibialis anterior muscles from WT and KI mice, with α -tubulin used as loading control. The results are presented in Fig. 2D. On average, the CaV1.1/tubulin ratio was 1.21 ± 0.31 and 0.95 ± 0.06 in extracts from 5 WT and 4 KI muscles, respectively. The difference was statistically not significant ($P = 0.15$; Mann–Whitney U test).

Altered SR Ca²⁺ release amplitude and kinetics in KI-Dnm2^{R465W} muscle fibres

Figure 3A shows rhod-2 Ca²⁺ transients elicited by membrane depolarizing steps of increasing amplitude in a WT and in a KI fibre. As routinely observed under these conditions, transients in WT fibres exhibit a fast rising phase at the onset of the pulse, followed by a slower one at low and intermediate voltages and by a more or less steady or slowly decaying phase for the largest steps. As shown in Fig. 3A, KI fibres exhibited an overall similar time-course, although the initial rise of the transients appeared to be less sharp than in the WT fibres, and the maximum level reached during the pulse was somewhat less than in the WT fibres. Figure 3B shows corresponding traces for the rate of SR Ca²⁺ release: both WT and KI fibres exhibited an early peak, the amplitude of which increased with the amplitude of the pulse, followed by a spontaneous decay down to a low level. In response to depolarizing steps of same amplitude, the peak Ca²⁺ release was lower in the KI than in the WT fibre. In addition, the time to reach the peak was increased in the KI fibre, as shown in the inset of Fig. 3B, which provides an expanded view of peak rates of Ca²⁺ release of similar peak amplitude in the WT (at $V = 0$ mV) and in the KI fibre (at $V = +40$ mV).

Mean \pm SD values for the amplitude of peak rate of Ca²⁺ release vs. voltage are shown in Fig. 3C in the two groups of fibres. Fitting the voltage dependence in each fibre with a Boltzmann function gave mean values for maximal rate, mid-voltage and steepness of $83.4 \pm 42.5 \mu\text{M ms}^{-1}$, -11.3 ± 7.1 mV and 7.4 ± 2.9 mV in WT fibres ($n = 22$) and $59.1 \pm 31.2 \mu\text{M ms}^{-1}$, -8.1 ± 7.9 mV and 8.2 ± 2.7 mV in KI fibres ($n = 24$), respectively. The mean value for maximal rate was significantly reduced in KI compared to WT fibres by $\sim 30\%$ (Fig. 3C, inset, $P = 0.03$). Figure 3D shows corresponding mean values for the total released Ca²⁺ (expressed in terms of myoplasmic volume) calculated from the time integral of the Ca²⁺ release traces. Assuming that some extent of SR Ca²⁺ depletion

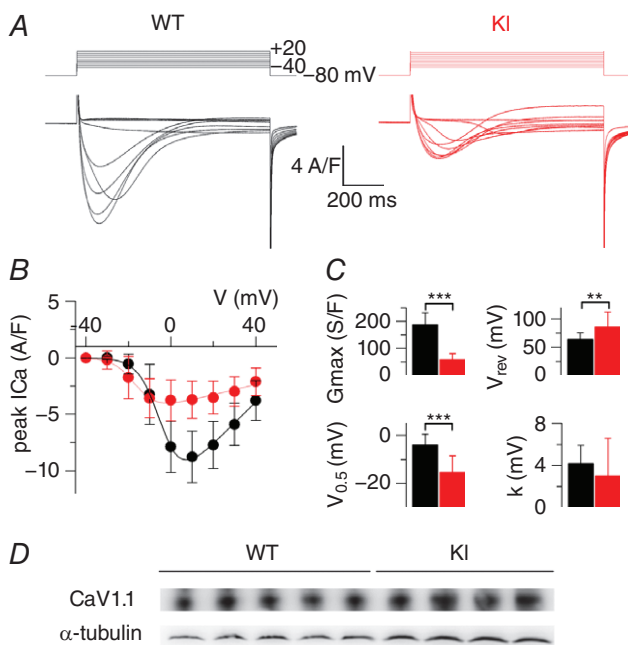


Figure 2. CaV1.1 Ca²⁺ current in WT and KI-Dnm2^{R465W} fibres. *A*, representative Ca²⁺ current traces in a WT and in a KI fibre in response to 0.5 s long depolarizing pulses from -80 mV to the range of indicated values, by 10 mV steps. *B*, mean voltage-dependence of the peak Ca²⁺ current in the two groups of fibres from measurements performed as shown in (*A*). Superimposed continuous lines show the result from fitting the mean WT and KI data points with eqn (1). *C*, mean values for the parameters obtained from fitting each current vs. voltage dataset with eqn (1) (see Methods). *D*, expression of CaV1.1 in tibialis anterior muscles: western-blot using an antibody against the $\alpha 1$ subunit of the dihydropyridine receptor was performed on protein extracts from five WT and four KI mice at 5 months of age. An α -tubulin antibody was used as loading control. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

occurs during the pulses, any severe difference in SR Ca²⁺ content between WT and KI fibres would translate into an alteration of the plateau value of total released Ca²⁺ reached for the large pulses. The results in Fig. 3D thus indicate that initial SR Ca²⁺ content was probably similar in the WT and KI fibres. Figure 3E shows mean values for time to peak Ca²⁺ release in WT and KI fibres. Mean values were larger in KI fibres by 50 to 10 ms within the -20 to +40 mV range, respectively. To test whether a change in the time course of change in membrane voltage

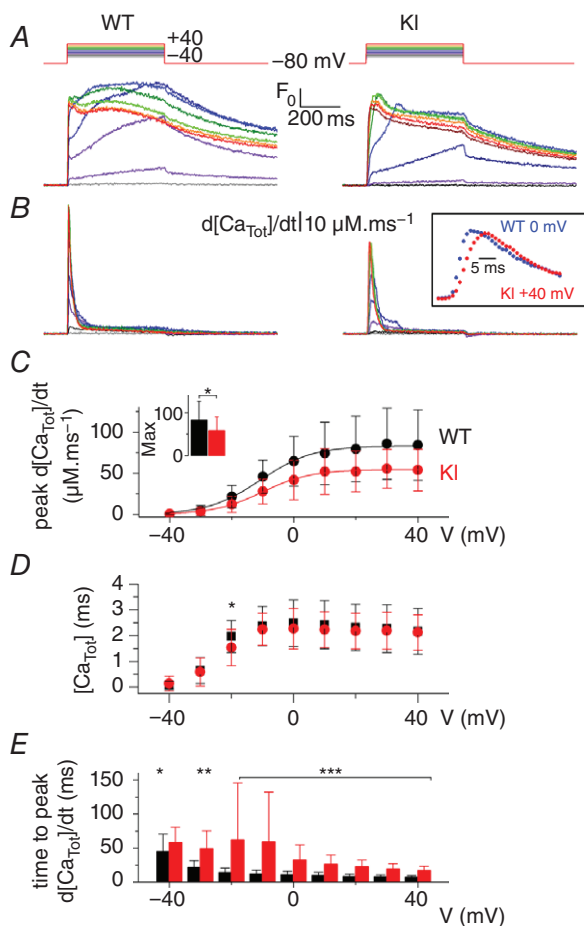


Figure 3. Voltage-activated SR Ca²⁺ release in WT and KI-Dnm2^{R465W} fibres

A, representative rhod-2 Ca²⁺ transients in a WT and in a KI fibre in response to 0.5 s long depolarizing pulses from -80 mV to the range of indicated values, by 10 mV steps. B, corresponding Ca²⁺ release flux (d[Ca_{Tot}]/dt) traces calculated as described in the Methods. C, mean voltage-dependence of the peak rate of SR Ca²⁺ release in WT and KI fibres. Superimposed continuous lines show the result from fitting the mean WT and KI data points with a Boltzmann equation. The inset shows the mean values for maximal rate of SR Ca²⁺ release in the two groups of fibres, as assessed from Boltzmann fits to data from each fibre. D, mean values for the total amount of released Ca²⁺ calculated from the time integral of the Ca²⁺ release traces, in WT and KI fibres. E, mean values for the time to peak Ca²⁺ release in WT and KI fibres. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Table 1. Fibre typing in tibialis anterior muscles from 5-month-old WT and KI-Dnm2^{R465W} mice

	WT	KI
Type I	0.33 ± 0.09	0.23 ± 0.09
Type IIa	9.42 ± 0.77	7.79 ± 2.63
Type IIb	90.25 ± 0.69	91.98 ± 2.67

Type I, IIa and IIb muscle fibres were counted after co-immunostaining of the three corresponding myosin isoforms on tibialis anterior sections. Values are indicated as the percentage of each fibre type relative to the total number of fibres (mean ± SD from four animals per genotype). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney *U* test (WT vs. KI for each fibre type). None of the mean values differed between the two groups (*P* > 0.05).

could contribute to the delayed time to peak Ca²⁺ release in KI fibres, an analysis of the time course of the capacitive current was performed. For this, the transient change in membrane current used to calculate the capacitance was fitted by a 2 exponential plus constant function. Mean ± SD values for the fast and slow time constant were 0.62 ± 0.2 ms and 4.8 ± 3.7 ms, respectively, in WT fibres and 0.36 ± 0.08 ms and 4.72 ± 1.16 ms, respectively, in KI fibres, providing no indication that a reduced speed of voltage establishment would contribute to delayed activation of ryanodine receptors in the KI fibres. Thus, altogether, voltage-activated Ca²⁺ release is depressed and slowed in KI fibres, whereas voltage-dependency and SR Ca²⁺ content are unaffected. To determine whether these Ca²⁺ release alterations could be associated with a change in fibre type composition of the muscles, the expression of MyHC isoforms was assessed by immunofluorescence analysis in tibialis anterior muscles. The results are presented in Table 1. They clearly demonstrate that there was no change in fibre type composition in the KI muscles, thus ruling out this possibility.

Spatial variability of Ca²⁺ release in KI-Dnm2^{R465W} muscle fibres

Muscle fibres from the *Mtm1*-KO mouse model of CNM were shown to exhibit spatial non uniformity of Ca²⁺ release along their longitudinal axis (Kutchukian *et al.* 2016). It was thus of interest to assess whether similar defects were detectable in the present model of *DNM2*-related CNM. Figure 4A shows a line-scan image of rhod-2 fluorescence from a WT (left) and from a KI fibre (right) taken when a pulse from -80 to -10 mV was applied. The traces underneath show the average time course of *F*/*F*₀ along the entire line of each corresponding line-scan image. Figure 4B shows corresponding images of the time derivative of the fluorescence [d(*F*/*F*₀)/dt]. The WT fibre exhibited a sharp peak, the time position of which

was very well conserved along the line (Fig. 4C, left). By contrast, the KI fibre exhibited a delayed peak for which the time position increased from the top to the bottom of the line (Fig. 4C, right). Spatial variability of the time to peak Ca^{2+} release could take several forms, as illustrated in Fig. 5, which shows $d(F/F_0)/dt$ images from three KI fibres (Fig. 5A–C) depolarized at -10 and at $+10$ mV. Each of these three fibres was from a distinct KI mouse. In all cases, the time to peak Ca^{2+} release tended to vary much more along the line at -10 mV than at $+10$ mV, irrespective of whether it appeared early or late during the pulse. Figure 5A illustrates an example where the time to peak Ca^{2+} release at -10 mV varies along the scanned line but remains close in time to the beginning of the pulse. By contrast, Fig. 5B shows an example with time to peak still varying along the line but at very late times during

the pulse. Finally, Fig. 5C shows an example where two distinct peaks are observed during the pulse.

Figure 4D shows mean values for the SD of the time to peak of the derivative in WT and KI fibres at both -10 and $+10$ mV. The mean value was substantially elevated in the KI fibres at -10 mV and to a lesser extent at $+10$ mV. Altogether, there was a clear trend for a reduced spatial synchronicity of Ca^{2+} release in KI compared to WT fibres.

Spontaneous Ca^{2+} sparks in KI-*Dnm2*^{R465W} muscle fibres

In differentiated muscle, the tight control of RYR1 channel opening by the t-tubule CaV1.1 voltage-sensors is presumed to repress Ca^{2+} -mediated activation of the channels. Consequently, Ca^{2+} sparks, which are a manifest expression of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, are very rare in intact mammalian muscle fibres under physiological conditions (Shirokova *et al.* 1998, Zhou *et al.* 2006). We tested whether the present disease situation was associated with a perturbation of this process. Figure 6A shows an example of the sum of 10 x,y confocal frames of fluo-4 fluorescence taken from a KI fibre. The resulting image was inhomogeneous as a result of transient local increases in fluorescence at various locations throughout the fibre. Figure 6B shows the baseline fluorescence-corrected confocal frame exhibiting the brightest event of this series (highlighted in the square box). This event exhibited a peak

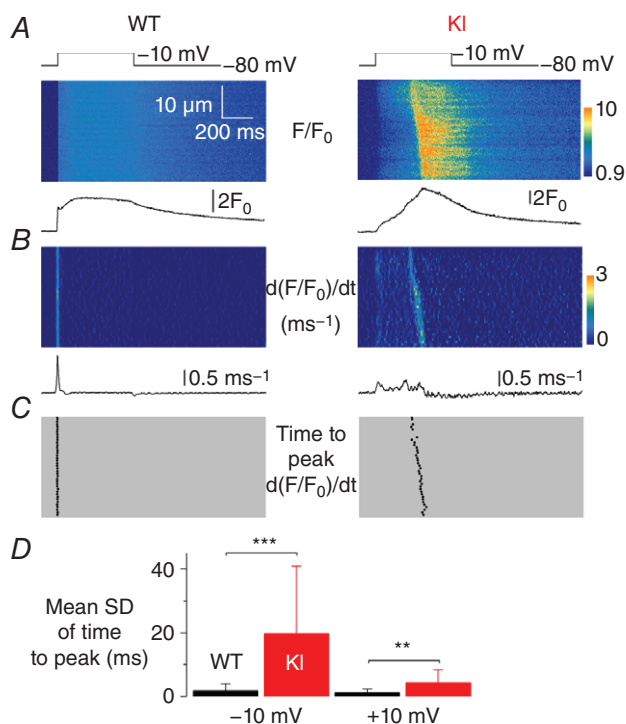


Figure 4. Spatial heterogeneity of time to peak SR Ca^{2+} release in KI-*Dnm2*^{R465} fibres

A, F/F_0 rhod-2 line-scan images taken from a WT and a KI fibre in response to a 0.5 s long depolarizing pulse from -80 to -10 mV. Traces below show the corresponding average F/F_0 signal over the full line. B, corresponding images of the rate of change in F/F_0 ($d(F/F_0)/dt$); these images were resampled from 512 to 64 pixels (0.1 – $0.8 \mu\text{m}$ per pixel) after linear averaging in the space domain, and the time derivative was calculated with a dt of 4 pixels (4.6 ms). Traces below show the average rate of change in F/F_0 over the full line. C, corresponding distribution of the time to peak rate of change in F/F_0 at each position along the scanned line. D, mean \pm SD of the time to peak rate of change in rhod-2 F/F_0 in WT ($n = 21$) and KI fibres ($n = 25$), in response to a pulse to -10 mV (left) and to $+10$ mV (right). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

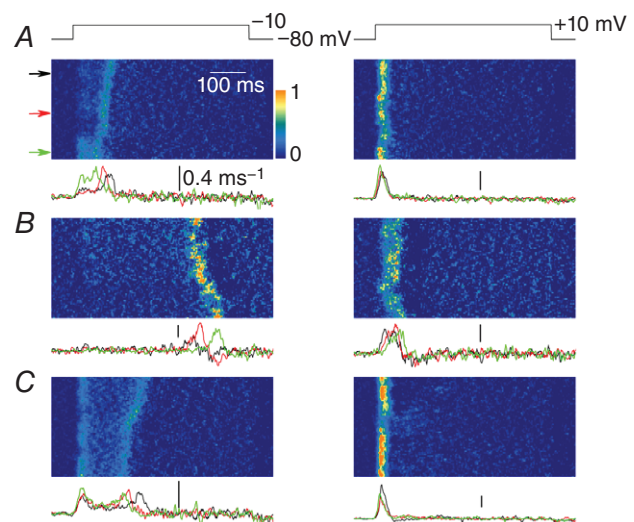


Figure 5. Examples of spatial variability of peak Ca^{2+} release rate in KI-*Dnm2*^{R465W} fibres at -10 and $+10$ mV

A–C, images of the rate of change in rhod-2 fluorescence ($d(F/F_0)/dt$) in three distinct KI fibres, respectively, stimulated by a voltage pulse from -80 to -10 mV (left) and by a voltage pulse from -80 to $+10$ mV (right). Traces underneath each image show the time course of the rate of change in F/F_0 at the three positions indicated by arrows along the line. Scale bars = 0.4 ms^{-1} . [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

amplitude of $\sim 3 F_0$ and extended spatially over $\sim 5 \mu\text{m}$ (Fig. 6C). In total, 532 Ca²⁺ sparks were detected in 28 out of 36 KI muscle fibres with a mean \pm SD frequency of $153.1 \pm 206.2 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. In comparison, only 41 events were detected in 10 out of 30 WT fibres where they appeared with a significantly lower frequency ($15.0 \pm 33.6 \text{ mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $P < 0.001$).

Figure 6D and E show the distribution of spark amplitude and FWHM in the KI fibres, respectively. The vast majority of events yielded a peak amplitude between 0.5 and $1.5 F_0$ (mean of 1.07 ± 0.55) and a FWHM between 1 and $3 \mu\text{m}$ in both the x (mean of $1.94 \pm 0.65 \mu\text{m}$, black) and y (mean of $1.79 \pm 0.62 \mu\text{m}$, grey) directions. In Fig. 6D and E, arrows indicate corresponding average values measured in WT fibres, demonstrating not only that the event frequency was enhanced in the KI fibres, but also that the amplitude and spatial spread of the events were significantly larger than those of the rare events detected in WT fibres (mean \pm SD amplitude of $0.75 \pm 0.36 F_0$ and mean \pm SD spatial spread of 1.20 ± 0.40 and $1.09 \pm 0.44 \mu\text{m}$ in the x and y directions, respectively, $P < 0.001$ for all parameters). To characterize their

temporal features, events were also detected in line-scan mode in those fibres where the frequency was the largest. Examples are shown in Fig. 7A–C, indicating the presence of either typical lone sparks (Fig. 7A, arrow) or of long-lasting lower amplitude events (Fig. 7B, arrow). The amplitude and FWHM distribution of the lone sparks are shown in Fig. 7D and E. The data originate from 272 events from 16 fibres. Mean \pm SD values for event amplitude, FWHM and duration were $1.20 \pm 0.74 F_0$, $1.33 \pm 0.85 \mu\text{m}$ and $19.7 \pm 10.1 \text{ ms}$.

Discussion

The present investigation provides novel insights into the functional features and pathogenic mechanisms involved in *DNM2*-related CNM. The results obtained demonstrate that muscle fibres from the KI-*Dnm2*^{R465W} mouse model of the disease suffer from defective Ca²⁺ homeostasis and EC coupling, which probably contributes to muscle weakness. In addition, the results highlight not only similarities but also discrepancies with other models of CNM.

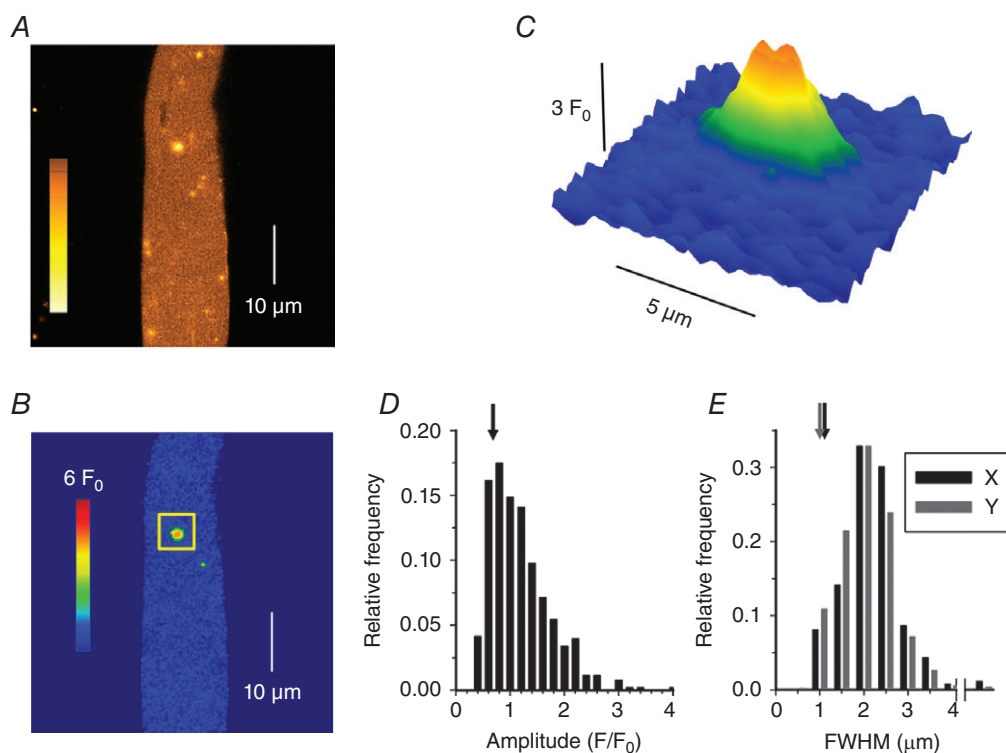


Figure 6. Ca²⁺ sparks in intact KI-*Dnm2*^{R465W} fibres

A, sum of 10 x,y confocal images of fluo-4 fluorescence from an isolated KI muscle fibre showing a localized increase in $[\text{Ca}^{2+}]$. Colour bar is in arbitrary units. B, first image from the cumulated series shown in (A) after correction for baseline fluorescence (F_0) and removal of structure elements (see Methods), expressed as F/F_0 . C, enlarged view of the individual spark highlighted by the square box in (B). Colour bar is the same for (B) and (C). D, Ca²⁺ release events amplitudes. E, FWHM of the Ca²⁺ release events, for profiles parallel (X) and perpendicular (Y) to the fibres axis. Arrows in (D) and (E) indicate the corresponding average values measured for the few events detected in WT fibres. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Most well-known CNMs result from mutations in the genes encoding MTM1, DNM2 or BIN1, with all three proteins known to be involved in membrane remodelling and trafficking events. This could provide the basis for a common pathological mechanism (Cowling *et al.* 2012), whereas nuclei mis-localization may represent an offshoot with no or less critical relevance to muscle weakness. Accordingly, it is of particular interest to assess, in all models, the features of processes identified as defective in one of them. Depressed Ca^{2+} release is a hallmark of MTM1 deficiency where it is associated with defective architecture of the t-tubule network (Al Qusairi *et al.* 2009; Kutchukian *et al.* 2016). Defects in t-tubule network linked with alterations in intracellular Ca^{2+} release were also reported following shRNA-mediated knockdown of BIN1 in adult muscle fibres (Tjondrokoesoemo *et al.* 2011). By contrast, in the present study, the majority of fibres isolated from 6-month-old KI-*Dnm2*^{R465W} mice did not yield acute destructions of the t-tubule network similar to those reported in the two other models. This is also consistent with previous observations of CaV1.1 immunostaining in muscle fibres from this same mouse model, from which no sign of alteration of the transverse striated expression pattern was detected (Durieux *et al.* 2010a). Altogether, this is evidence that critically altered maintenance of the t-tubule network

is not a pathogenic hallmark of the present *Dnm2* mutation, whereas it is in the absence of MTM1 or BIN1. Conversely, this also suggests that t-tubule disruption may be critically associated with the degree of severity of a given CNM. Still, the present analysis of the t-tubule density revealed a small but significant reduction in the KI fibres, highlighting a certain extent of reduced t-tubule development. Together with significant atrophy of the muscle fibres, this probably contributed to the observed reduced capacitance of the KI fibres compared to that of WT fibres. However, despite apparently normal integrity, the t-tubule network in KI-*Dnm2* fibres possibly suffered from subtle alterations that remained undetectable from di-8-anepps fluorescence. CNM-related *Dnm2* mutations enhance DNM2 membrane fission activity and thus may be involved in such an effect (Chin *et al.* 2015). Also, reduced t-tubule membrane folding was shown to contribute to reduced capacitance in cardiac cells deleted from BIN1 (Hong *et al.* 2014). Thus, a similar mechanism might occur in the present DNM2 CNM model.

The Ca^{2+} current density through t-tubule CaV1.1 channels was severely reduced in the KI fibres, whereas the protein level was maintained. Because there is evidence in other cell systems that dynamin protein-dependent endocytosis regulates Ca(V) channels density (Yang *et al.* 2010; Di Biase *et al.* 2011), reduced CaV1.1 membrane

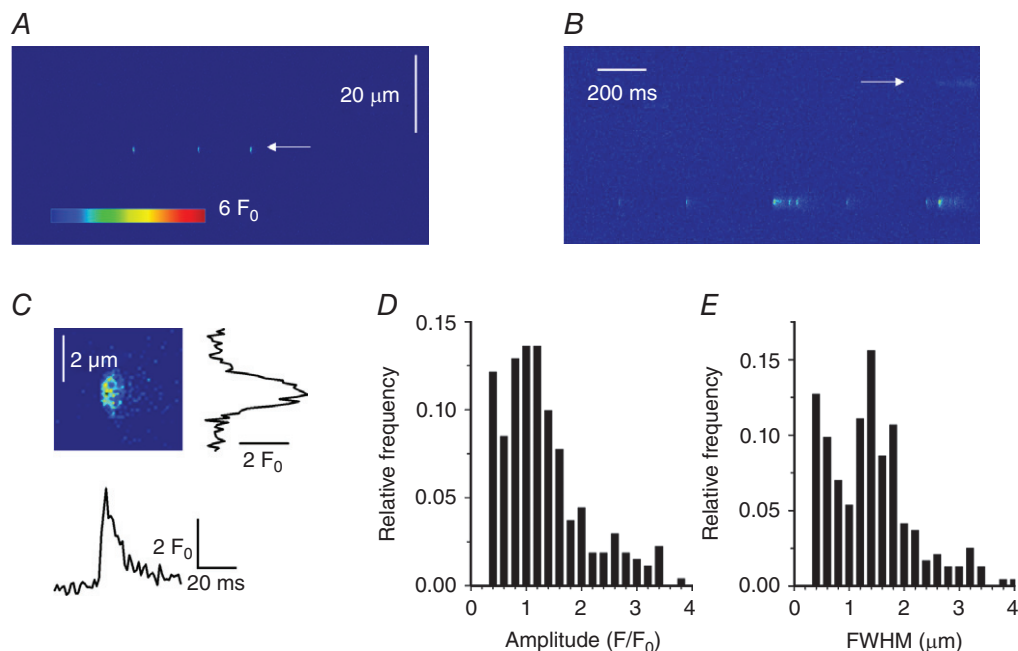


Figure 7. Ca^{2+} sparks in intact KI-*Dnm2*^{R465W} fibres detected in line-scan mode

A and B, normalized line-scan images (F/F_0) of fluo-4 fluorescence from two KI fibres showing typical calcium release events corresponding to either lone Ca^{2+} sparks (A) or a series of such events (B, bottom of the image) or long embers (B, marked by arrow). C, enlarged portion of the image in (A) displaying an individual event at increased temporal and spatial resolution. Traces on the right and underneath show the corresponding spatial distribution and time course of the fluorescence transient, respectively. D and E, amplitude and FWHM histograms, respectively, of the lone calcium sparks from DNM2 KI fibres. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

expression could be the underlying mechanism. In MTM1-deficient muscle, CaV1.1 Ca²⁺ current density is also reduced, but this is in association with altered immunostaining and a reduced protein level (Al Qusairi *et al.* 2009). Thus, in the present model, a DNM2-dependent mechanism, possibly related to its trafficking function, is responsible for the loss of Ca²⁺ channel activity in the t-tubule membrane, independent of any reduced protein level.

Voltage-activated SR Ca²⁺ release in the KI-*Dnm2*^{R465W} fibres exhibits a reduced peak amplitude and an increased time-to-peak throughout the voltage range of activation. By contrast, Fraysse *et al.* (2016) reported no difference in peak and time-to-peak Ca²⁺ transients elicited by field stimulation between WT and KI-*Dnm2*^{R465W} fibres. The difference may result from their use of the high-affinity indicator fura-2, which is kinetically limited and easily saturated under non-Ca²⁺-buffering conditions. Under these conditions, the relatively mild depression of Ca²⁺ release (by 30%) may escape being detected. The Ca²⁺ release alterations observed in the conditions employed in the present study are qualitatively similar to those reported in MTM1-deficient muscle fibres. However, quantitatively, the extent of Ca²⁺ release depression in the present study in muscle fibres from 6-month-old KI-*Dnm2*^{R465W} mice (by ~30%) was not as dramatic as that observed in muscle fibres from *Mtm1*-KO mice, reaching 60% at 4–5 weeks of age (Kutchukian *et al.* 2016). The much stronger early impairment in *Mtm1*-KO fibres compared to KI-*Dnm2*^{R465W} fibres is probably responsible for the dramatic weakness phenotype in the MTM1 mouse model and in MTM1 patients. Importantly, in the present study, the total amount of released Ca²⁺ for the largest depolarizing pulses did not differ between WT and KI-*Dnm2*^{R465W} fibres, indicating that the SR content was maintained in the diseased fibres and was probably not the reason for the reduced peak rate of Ca²⁺ release. As an underlying mechanism, disturbed DNM2 membrane fission activity, as a consequence of the mutation, may be proposed to alter or destabilize CaV1.1-RYR1 interactions and be responsible for the reduced amplitude of voltage-activated Ca²⁺ release, as well as contribute to the loss of its spatial synchronicity.

The extent of increase in time to peak Ca²⁺ release reported in the present study in KI-*Dnm2*^{R465W} fibres is remarkably similar to that reported in MTM1-deficient muscle fibres. For example, for a pulse to +10 mV, the mean values for time-to-peak Ca²⁺ release in WT and *Mtm1*-KO fibres were 10 and 28 ms, respectively (Kutchukian *et al.* 2016). For the same pulse, the mean values in WT and KI-*Dnm2*^{R465W} fibres are 9 and 26 ms, respectively. Because the disease phenotype is much more severe in the case of MTM1-deficiency, this quantitatively similar alteration probably has no critical role in the loss of muscle force. In *Mtm1*-KO fibres, this effect results, at

least in part, from contribution of Ca²⁺-activated RYR1 channels to voltage-activated Ca²⁺ release because of the presence of CaV1.1-free RYR1 channels (Kutchukian *et al.* 2016) and this process is also considered to contribute to enhanced spatial variability of Ca²⁺ release. The enhanced spatial variability of Ca²⁺ release also observed in the present study in KI-*Dnm2*^{R465W} fibres, together with the propensity for appearance of spontaneous Ca²⁺ sparks, is consistent with enhanced Ca²⁺-induced Ca²⁺ release activity. This suggests that, despite no apparent acute disruption of the t-tubule network, some RYR1 channels have lost their control by CaV1.1 voltage sensors and can be Ca²⁺-activated.

The similarity between certain features of altered Ca²⁺ signalling in *Mtm1*-KO fibres and in KI-*Dnm2*^{R465W} fibres prompts the need to highlight the molecular and functional links between MTM1 and DNM2: indeed, both proteins, in association with amphiphysin 2 (BIN1) are considered to be important for membrane tubulation (Royer *et al.* 2013) and a proper balance between the tubulation activity of BIN1 and the fission activity of dynamin 2 has been suggested to be critical for t-tubule maintenance; however, the details of how the three proteins, in association with phosphoinositide metabolism, ensure proper t-tubule homeostasis/maintenance are far from completely understood and the role of MTM1 in the framework is specifically unclear (Hohendahl *et al.* 2016). One other equivocal aspect of this issue is that BIN1 and MTM1 appear to concentrate in the triadic region (Rodriguez *et al.* 2014; Lee *et al.* 2002), which is consistent with a role in t-tubule membrane remodelling, whereas this is not the case for DNM2, which essentially localizes in the vicinity of the Z line (Durieux *et al.* 2010a). Thus, either there are different pools of DNM2 of distinct function, localization and concentration, or DNM2 has an indirect distant impact on t-tubule/triad organization, or DNM2 is able to translocate from the Z line region to the triadic area when needed.

By contrast to some of these somewhat uncertain molecular and cellular features, remarkably clear functional links exist between MTM1 and DNM2 at the pathological level: indeed, MTM1-deficiency is associated with overexpression of DNM2 whereas DNM2 down-expression rescues the deleterious consequences of MTM1-deficiency (Cowling *et al.* 2014). In addition, overexpression of DNM2 in normal muscle generates a myopathy phenotype (Cowling *et al.* 2011). Altogether, this is consistent with DNM2 disturbed/enhanced activity playing a role in the MTM1 pathology. Thus, some of the similarities in defective Ca²⁺ signalling between MTM1-deficient fibres and *Dnm2*^{R465W} KI fibres, including the altered time course of Ca²⁺ release, may be a result of enhanced DNM2 expression and enhanced DNM2 activity, respectively. Again, changes in the triadic

organization as a result of improperly balanced DNM2 activity may play an important role in these defects.

The Ca^{2+} sparks detected in the present study in the KI fibres occurred, on average, at a frequency one order of magnitude larger than that of the events detected in WT fibres. They also yielded a larger amplitude and spatial spread than in WT fibres. This may indicate that the underlying process does not simply correspond to enhanced activation of the mechanism that generates the erratic events in normal fibres but, instead, that a specific operating mode of the RYR1 channels was promoted in the disease condition. Saponin permeabilization is known to trigger the occurrence of Ca^{2+} sparks in mammalian muscle fibres because of disruption of the normal control of RYR1 by $\text{CaV}1.1$ (Csernoch, 2007). Absolute mean values for peak amplitude and FWHM in the x and y direction of events measured in the present study in KI fibres were similar to those of events measured with the indicator fluo-3 in saponin-permeabilized muscle fibres from control mice (1.07 vs. 1.13 F_0 , 1.94 vs. 1.92 μm and 1.79 vs. 1.76 μm in KI and in permeabilized fibres, respectively, Rodriguez *et al.* 2014). This may be taken as an indication that a similar mechanism was involved, further promoting the possibility that, despite a normal t-tubule network, RYR1 channels in the KI fibres exhibit an enhanced disposition for being activated by Ca^{2+} . The frequency of Ca^{2+} sparks reported in the present study in intact KI fibres was one order of magnitude (~ 30 times) lower than that reported in permeabilized mouse fibres (Rodriguez *et al.* 2014). Because saponin permeabilization is certainly promoting extensive disruption of RYR1 channel activity control by t-tubule $\text{CaV}1.1$ s, the present disease situation appears to be intermediate between the extreme (permeabilized fibres) and the normal (WT) situation. Finally, it is also worth noting that the present model corresponds to the second disease situation promoting spontaneous local Ca^{2+} release events in intact mammalian muscle fibres. Indeed, aberrant expression of the $\text{CaV}1.1$ e splice variant, which correlates with muscle weakness in myotonic dystrophy, is also associated with presence of such events (Sultana *et al.* 2016). Accordingly, it is possible that the occurrence of Ca^{2+} sparks in intact mammalian muscle fibres is a feature of other muscle disease conditions and that the spark frequency correlates with the extent of loss of normal control of Ca^{2+} release by t-tubule voltage and thus with the potential severity of altered EC coupling function. In the present disease model, this Ca^{2+} spark activity may have contributed to the increased resting Ca^{2+} level reported by Durieux *et al.* (2010). Conversely, however, there is a low possibility that it affects the SR calcium content. Based on morphological observations and size of sparks, an upper limit of $\sim 4 \mu\text{m}^2$ can be assumed for the area that contains one release site in an x,y image of a fibre. Because the area of the entire fibre is $\sim 3000\text{--}4000 \mu\text{m}^2$ in the image, there are close to

1000 release sites per image. If it is assumed that a spark fully depletes its local SR, the total depletion would be the number of sparks per image divided by the number of release sites in the image. Because the average number of sparks per image in DNM2 KI fibres is less than 10, the overall depletion in the SR would be less than 1%.

In conclusion, the results of the present study demonstrate that altered SR Ca^{2+} release probably contributes to the muscle weakness associated with the *Dnm2*^{R465W} CNM mutation. Detailed features of the defects are similar to those observed in MTM1-deficient muscle. However, overall preserved t-tubule architecture and a more limited extent of Ca^{2+} release depression probably make a major contribution to the milder severity of the DNM2 disease compared to MTM1-related CNM. Still, many problems remain unresolved, such as how phosphoinositide 3-kinase inhibition has a beneficial effect in MTM1-deficient muscle (Kutchukian *et al.* 2016) and whether it would also do so in models of DNM2-associated CNM. Overall, a detailed understanding of how DNM2 is involved in the regulation of Ca^{2+} homeostasis and EC coupling will require further studies, which will also probably need to take into account the role of other proteins, including N-WASP (Falcone *et al.* 2014) and SPEG (Agrawal *et al.* 2014).

References

- Agrawal PB, Pierson CR, Joshi M, Liu X, Ravenscroft G, Moghadaszadeh B, Talabere T, Viola M, Swanson LC, Haliloğlu G, Talim B, Yau KS, Allcock RJ, Laing NG, Perrella MA & Beggs AH (2014). SPEG interacts with myotubularin, and its deficiency causes centronuclear myopathy with dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **95**, 218–226.
- Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, Berbey C, Messaddeq N, Kretz C, Sanoudou D, Beggs AH, Allard B, Mandel JL, Laporte J, Jacquemond V & Buj-Bello A (2009). T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 18763–18768.
- Bitoun M, Maugren S, Jeannet PY, Lacène E, Ferrer X, Laforêt P, Martin JJ, Laporte J, Lochmüller H, Beggs AH, Fardeau M, Eymard B, Romero NB & Guicheney P (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* **37**, 1207–1209.
- Bitoun M, Bevilacqua JA, Prudhon B, Maugren S, Taratuto AL, Monges S, Lubieniecki F, Cances C, Uro-Coste E, Mayer M, Fardeau M, Romero NB & Guicheney P (2007). Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann Neurol* **62**, 666–670.
- Böhm J, Biancalana V, Dechene ET, Bitoun M, Pierson CR, Schaefer E, Karasoy H, Dempsey MA, Klein F, Dondaine N, Kretz C, Haumesser N, Poirson C, Toussaint A, Greenleaf RS, Barger MA, Mahoney LJ, Kang PB, Zanoteli E, Vissing J, Witting N, Echaniz-Laguna A, Wallgren-Pettersson C, Dowling J, Merlini L, Oldfors A, Bomme Ousager L, Melki J, Krause A, Jern C, Oliveira AS, Petit F, Jacqueline A,

- Chaussonot A, Mowat D, Leheup B, Cristofano M, Poza Aldea JJ, Michel F, Furby A, Llona JE, Van Coster R, Bertini E, Urtizbera JA, Drouin-Garraud V, Bérout C, Prudhon B, Bedford M, Mathews K, Erby LA, Smith SA, Roggenbuck J, Crowe CA, Brennan Spitale A, Johal SC, Amato AA, Demmer LA, Jonas J, Darras BT, Bird TD, Laurino M, Welt SI, Trotter C, Guicheney P, Das S, Mandel JL, Beggs AH & Laporte J (2012). Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat* **33**, 949–959.
- Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, Pellissier JF & Mandel JL (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15060–15065.
- Cao H, Garcia F & McNiven MA (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2595–2609.
- Chin YH, Lee A, Kan HW, Laiman J, Chuang MC, Hsieh ST & Liu YW (2015). Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Hum Mol Genet* **24**, 5542–5554.
- Cowling BS, Chevremont T, Prokic I, Kretz C, Ferry A, Coirault C, Koutsopoulos O, Laugel V, Romero NB & Laporte J (2014). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J Clin Invest* **124**, 1350–1363.
- Cowling BS, Toussaint A, Amoasii L, Koebel P, Ferry A, Davignon L, Nishino I, Mandel JL & Laporte J (2011). Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am J Pathol* **178**, 2224–2235.
- Cowling BS, Toussaint A, Muller J & Laporte J (2012). Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: insights from animal models. *PLoS Genet* **8**, e1002595.
- Csernoch L (2007). Sparks and embers of skeletal muscle: the exciting events of contractile activation. *Pflügers Archiv* **454**, 869–878.
- Csernoch L, Pouvreau S, Ronjat M & Jacquemond V (2008). Voltage-activated elementary calcium release events in isolated mouse skeletal muscle fibers. *J Membr Biol* **226**, 43–55.
- Di Biase V, Tuluc P, Campiglio M, Obermair GJ, Heine M & Flucher BE (2011). Surface traffic of dendritic CaV1.2 calcium channels in hippocampal neurons. *J Neurosci* **31**, 13682–13694.
- Dulhunty AF, Wei-LaPierre L, Casarotto MG & Beard NA (2017). Core skeletal muscle ryanodine receptor calcium release complex. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **44**, 3–12.
- Durieux AC, Prudhon B, Guicheney P & Bitoun M (2010b). Dynamin 2 and human diseases. *J Mol Med* **88**, 339–350.
- Durieux AC, Vassilopoulos S, Lainé J, Fraysse B, Briñas L, Prudhon B, Castells J, Freyssen D, Bonne G, Guicheney P & Bitoun M (2012). A centronuclear myopathy–dynamin 2 mutation impairs autophagy in mice. *Traffic* **13**, 869–879.
- Durieux AC, Vignaud A, Prudhon B, Viou MT, Beuvin M, Vassilopoulos S, Fraysse B, Ferry A, Lainé J, Romero NB, Guicheney P & Bitoun M (2010a). A centronuclear myopathy–dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet* **19**, 4820–4836.
- Falcone S, Roman W, Hnia K, Gache V, Didier N, Lainé J, Auradé F, Marty I, Nishino I, Charlet-Berguerand N, Romero NB, Marazzi G, Sassoon D, Laporte J & Gomes ER (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**, 1455–1475.
- Fraysse B, Guicheney P & Bitoun M (2016). Calcium homeostasis alterations in a mouse model of the dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Biol Open* **5**, 1691–1696.
- Grundy D (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology*. *J Physiol* **593**, 2547–2549.
- Hohendahl A, Roux A & Galli V (2016). Structural insights into the centronuclear myopathy-associated functions of BIN1 and dynamin 2. *J Struct Biol* **196**, 37–47.
- Hong T, Yang H, Zhang SS, Cho HC, Kalashnikova M, Sun B, Zhang H, Bhargava A, Grabe M, Olgin J, Gorelik J, Marbán E, Jan LY & Shaw RM (2014). Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia. *Nat Med* **20**, 624–632.
- Jacquemond V (1997). Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys J* **73**, 920–928.
- Jeub M, Bitoun M, Guicheney P, Kappes-Horn K, Strach K, Druschky KF, Weis J & Fischer D (2008). Dynamin 2-related centronuclear myopathy: clinical, histological and genetic aspects of further patients and review of the literature. *Clin Neuropathol* **27**, 430–438.
- Jungbluth H & Gautel M (2014). Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies. *Front Aging Neurosci* **6**, 339.
- Kutchukian C, Lo Scudato M, Tourneur Y, Poulard K, Vignaud A, Berthier C, Allard B, Lawlor MW, Buj-Bello A & Jacquemond V (2016). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca²⁺ release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 14432–14437.
- Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, Klauck SM, Poustka A & Dahl N (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* **13**, 175–182.
- Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR & De Camilli P (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193–1196.
- Lefebvre R, Legrand C, González-Rodríguez E, Groom L, Dirksen RT & Jacquemond V (2011). Defects in Ca²⁺ release associated with local expression of pathological ryanodine receptors in mouse muscle fibres. *J Physiol* **589**, 5361–5382.

- Lefebvre R, Pouvreau S, Collet C, Allard B & Jacquemond V (2014). Whole-cell voltage clamp on skeletal muscle fibers with the silicone-clamp technique. *Methods Mol Biol* **1183**, 159–170.
- Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A, Mandel JL & Laporte J (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* **39**, 1134–1139.
- Pouvreau S, Csernoch L, Allard B, Sabatier JM, De Waard M, Ronjat M & Jacquemond V (2006). Transient loss of voltage control of Ca²⁺ release in the presence of maurocalcine in skeletal muscle. *Biophys J* **91**, 2206–2215.
- Ríos E, Pizarro G & Stefani E (1992). Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* **54**, 109–133.
- Rodríguez EG, Lefebvre R, Bodnár D, Legrand C, Szentesi P, Vincze J, Poulard K, Bertrand-Michel J, Csernoch L, Buj-Bello A & Jacquemond V (2014). Phosphoinositide substrates of myotubularin affect voltage-activated Ca²⁺ release in skeletal muscle. *Pflügers Archiv* **466**, 973–985.
- Royer B, Hnia K, Gavriilidis C, Tronchère H, Tosch V & Laporte J (2013). The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep* **14**, 907–915.
- Shirokova N, García J & Ríos E (1998). Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* **512**, 377–384.
- Schneider MF (1994). Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol* **56**, 463–484.
- Sultana N, Dienes B, Benedetti A, Tuluc P, Szentesi P, Sztretye M, Rainer J, Hess MW, Schwarzer C, Obermair GJ, Csernoch L & Flucher BE (2016). Restricting calcium currents is required for correct fiber type specification in skeletal muscle. *Development* **143**, 1547–1559.
- Szabó LZ, Vincze J, Csernoch L & Szentesi P (2010). Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *J Theor Biol* **264**, 1279–1292.
- Tjondrokoesoemo A, Park KH, Ferrante C, Komazaki S, Lesniak S, Brotto M, Ko JK, Zhou J, Weisleder N & Ma J (2011). Disrupted membrane structure and intracellular Ca²⁺ signaling in adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS ONE* **6**, e25740.
- Yang T, Xu X, Kernan T, Wu V & Colecraft HM (2010). Rem, a member of the RGK GTPases, inhibits recombinant CaV1.2 channels using multiple mechanisms that require distinct conformations of the GTPase. *J Physiol* **588**, 1665–1681.
- Zhou J, Yi J, Royer L, Launikonis BS, González A, García J & Ríos E (2006). A probable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca²⁺ sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C539–C553.

Additional information

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

Author contributions

Single muscle fibre experiments were performed at Institut NeuroMyoGène, University Claude Bernard, Lyon 1. Fibre typing and immunoblot measurements were performed at the Research Centre for Myology, UPMC Univ Paris 06. Marc B and PG designed and generated the KI-*Dnm2*^{R465W} mouse model. Marc B and VJ designed the study. CK and VJ performed the electrophysiological and confocal imaging experiments. Marc B, Maud B and DT performed the MyHC and immunoblot experiments and conducted the analysis. CK, PS, BA, DT, Maud B, CB, YT, LC, Marc B and VJ contributed to the analysis and interpretation of data, as well as to the critical revisions of the manuscript. PS and LC specifically performed the calcium spark analysis. All authors approved the final version of the manuscript, agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

This work was supported by grants from CNRS, INSERM, the Université Claude Bernard – Lyon 1 and the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon: Alliance Myo-NeurALP program) to the Institut NeuroMyoGène, as well as by the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (NKFIH NK-115461 to LC) and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-14-CE12-0009 to MB), and also by a grant from the Société Française de Myologie (SFM) (to CK).

Acknowledgements

We thank the Pitié-Salpêtrière Imaging Platform (PICPS) for providing light microscopy imaging facilities.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans l'ensemble, ce travail apporte des éléments nouveaux à la connaissance des interactions fonctionnelles entre le métabolisme des PtdInsPs et le couplage EC, et leur implication dans la myopathie centronucléaire liée à l'X (XL-CNM) ainsi que dans la myopathie centronucléaire autosomique dominante (AD-CNM). D'une part ce travail établit l'implication du PtdIns(4,5) P_2 dans la régulation du couplage EC et de l'homéostasie calcique dans la fibre musculaire squelettique différenciée. D'autre part, nous mettons en évidence des altérations du couplage EC encore jamais caractérisées dans les fibres musculaires des modèles murins de la XL- et de l'AD-CNM. Enfin ce travail montre l'efficacité d'un traitement pharmacologique aux inhibiteurs de l'activité PtdIns 3-kinase sur certaines de ces altérations et sur la survie des souris modèles de la XL-CNM.

Rôle du PtdIns(4,5) P_2 dans la régulation du couplage EC

Dans cette étude, nous avons employé une approche électrophysiologique permettant la déplétion rapide des stocks de PtdIns(4,5) P_2 à la membrane plasmique de fibres musculaires exprimant une PtdIns 5-phosphatase sensible au potentiel (VSP). Il est important de mentionner que notre stratégie d'expression *in vivo* de la VSP n'a eu aucun effet sur les propriétés structurales et fonctionnelles des fibres musculaires et que par ailleurs, l'ensemble de l'étude présente l'avantage d'avoir été réalisé sur des fibres musculaires intactes dans lesquelles -l'activité des canaux est mesurée dans l'environnement natif, -le taux de PtdIns(4,5) P_2 à la membrane est susceptible de varier dans une gamme de valeurs physiologiques. La mesure des mouvements de charges intramembranaires dans les fibres musculaires de souris exprimant la Ci- ou la Dr-VSP a d'une part confirmé la présence de ces phosphatases à la membrane des tubules T, et d'autre part a confirmé la différence de sensibilité au potentiel de ces deux phosphatases (Hossain et al., 2008). De même, le PtdIns(4,5) P_2 , visualisé grâce à la sonde mRFP-PLC δ 1PH, a montré une localisation à la membrane des tubules T, en accord avec les données de la littérature.

Dans ce travail nous avons montré que l'activation de la VSP était associée à une translocation du domaine PLC δ 1PH de la membrane des tubules T vers le cytosol, cohérente avec une déplétion des stocks de PtdIns(4,5) P_2 membranaire. En parallèle, nous avons mis en évidence une altération de

l'efflux calcique du RS lors des dépolarisations activant la VSP, et ce résultat fournit pour la première fois une preuve que la réduction de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane des tubules T affecte la libération de Ca^{2+} par le RS. Plus précisément, nous avons montré qu'un délai était nécessaire entre l'activation de la phosphatase et la déphosphorylation d'une quantité suffisante de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ pour que les effets de la déplétion soient observables sur l'efflux calcique du RS.

Bien que la translocation évidente du domaine PLC δ 1PH déclenchée par de fortes dépolarisations suggère une déplétion considérable de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane, l'emploi de la sonde mRFP ne permet pas de quantifier de manière absolue cette variation. Par ailleurs, la déplétion totale du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ est impossible dans notre système d'étude, en raison de l'activité parallèle des kinases qui est conservée. Cette dernière transparaît notamment dans le caractère réversible de la déplétion des stocks de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ membranaire, dont la reconstitution s'opère avec une constante de temps de l'ordre de 10 s. Ces résultats s'accordent avec les données de plusieurs travaux indiquant que quelques centaines de ms suivant l'activation de la VSP sont nécessaires pour déphosphoryler une quantité substantielle de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, tandis que le temps nécessaire à la reconstitution des stocks varie de quelques secondes à des dizaines de secondes (voir Sakata et al., 2011). En considérant le $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ comme précurseur principal du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à la membrane plasmique, nos observations témoignent de l'efficacité de l'activité PtdIns 5-kinase présente dans la membrane des tubules T à reconstituer le stock de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Intuitivement, on peut spéculer sur la possibilité que cette efficacité soit corrélée à l'importance physiologique critique du maintien du stock membranaire de ce phosphoinositide pour la fonction de la cellule musculaire.

Nous considérons dans notre étude que l'effet observé sur le couplage EC est dû à la variation du taux de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ membranaire, d'une part en raison de nos résultats montrant une délocalisation évidente de la sonde mRFP-PLC δ 1PH, et d'autre part en raison de la littérature abondante concernant l'implication de ce $\text{PtdIns}P$ dans la régulation de nombreux canaux ioniques à la membrane plasmique (voir Hille et al., 2015). Cependant les VSP déphosphorylent également le $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ en position D5 du cycle *myo*-inositol, et se comportent comme une PtdIns 3-phosphatase envers le $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ lors de dépolarisations membranaires (Kurokawa et al., 2012). Ainsi nous ne pouvons pas complètement rejeter la possibilité que les deux autres substrats contribuent à l'effet observé. Enfin, une autre possibilité est que la production de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ concomitante à l'hydrolyse du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ puisse également moduler la fonction du couplage EC.

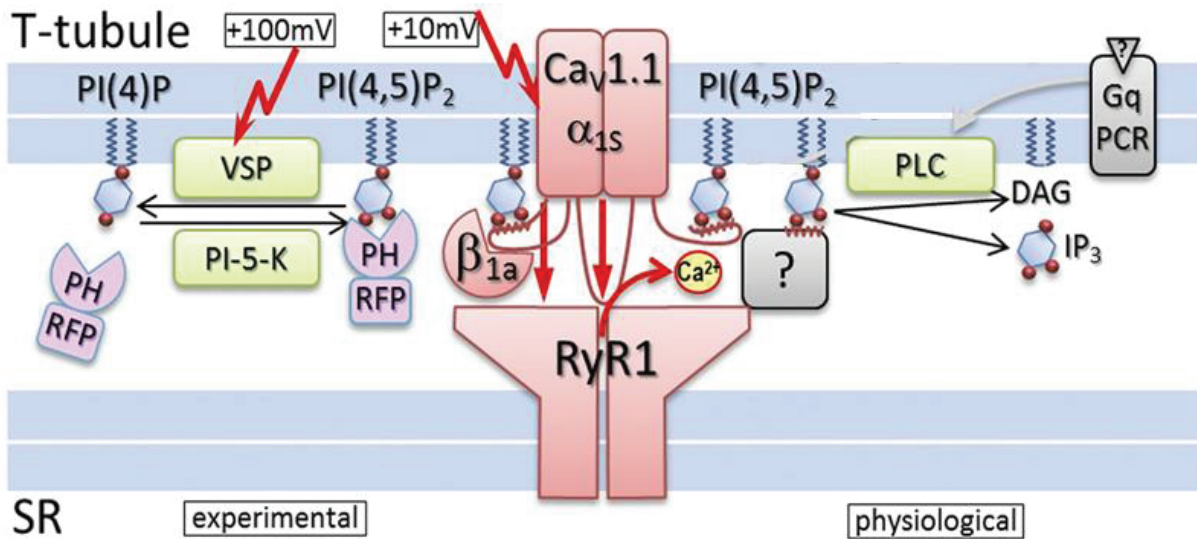


Figure 28. Modulation du couplage EC par le PtdIns(4,5)P₂.

Le complexe du couplage EC formé par le DHPR ($Ca_v1.1/\alpha_{1s}$ et β_{1a}) et RYR1 est représenté en rouge. Les outils moléculaires (la VSP et la sonde mRFP-PLC δ 1PH) que nous avons employés dans notre travail sont représentés dans la partie gauche du schéma. Les dépolarisations à +10 ou à +100 mV permettent d'activer respectivement le couplage EC uniquement ou de manière combinée à l'activation de la VSP. Les voies de signalisation possibles pouvant conduire à une déplétion du PtdIns(4,5)P₂ sont représentées dans la partie droite du schéma (voir le texte de la partie Discussion et perspectives). D'après Flucher, 2015.

La nature de la cible moléculaire du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ reste à déterminer : étant donné que la réduction du taux de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ dans la membrane du tubule T affecte la libération de Ca^{2+} par le RS, une protéine partenaire du couplage EC semble à privilégier avec, comme candidat potentiel le RYR1. En accord avec cette hypothèse, les quelques travaux menés dans les années 1990s sur des préparations fragmentaires (fibres pelées, vésicules de RS) ainsi que sur des RYR1 incorporés en bicouches lipidiques avaient suggéré que le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ pouvait favoriser la libération de calcium par le RS (Kobayashi et al., 1989; Ogawa et Harafuji, 1989; Chu et Stefani, 1991; Ohizumi et al., 1999). Bien que la réalité physiologique d'une telle régulation au niveau de la fibre musculaire intacte restait encore inexplorée, ces observations ont suggéré que le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ puisse moduler l'activité de RYR1 depuis la membrane du RS, où une population serait présente en plus faible quantité par rapport au tubule T (Chu et Stefani, 1991). En suivant cette hypothèse, nous pouvons imaginer que la VSP puisse hydrolyser le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ d'un autre compartiment membranaire, proche du tubule T, à l'instar de la phosphatase Sac1 capable de détecter et de réguler finement les taux de $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ de la membrane plasmique depuis le RE au niveau des jonctions RE-MP (Dickson et al., 2016). On pourrait également suspecter que le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ présent à la membrane du tubule T régule l'activité de RYR1 en interagissant avec sa région cytoplasmique, ou encore avec une protéine partenaire.

Une autre possibilité serait que le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ affecte la fonction du couplage EC en agissant sur le DHPR. En effet, la sous unité $\text{Ca}_v1.1$ contrôle l'ouverture de RYR1 dans le muscle squelettique, et de nombreux travaux ont mis en évidence l'implication du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ dans la régulation d'autres canaux calciques voltage-dépendants de type L ($\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$) (Suh et Hille, 2008; Hille et al., 2015). Cette possibilité a été testée dans notre travail, et n'a montré aucun effet de l'activation de la VSP sur le courant calcique à travers le DHPR. On pourrait toutefois suspecter que le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ agisse sur la fonction détecteur de potentiel de $\text{Ca}_v1.1$ ou encore sur la transmission du signal entre $\text{Ca}_v1.1$ et RYR1 (Figure 28). En accord avec ces hypothèses, une séquence riche en acide aminés chargés positivement a été identifiée dans l'extrémité C-terminale des canaux $\text{Ca}_v2.1$ comme étant capable d'interagir avec le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Rousset et al., 2004). Par ailleurs, un motif polybasique, riche en arginines, de liaison à la membrane plasmique a été identifié dans la boucle I-II de toutes les isoformes des canaux calciques de type L, et montre une sensibilité de liaison envers le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Kaur et al., 2015). Compte-tenu de la proximité entre cette région et la sous-unité régulatrice β_{1a} , il est tout à fait envisageable que la liaison du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ à ce motif stabilise l'interaction entre la boucle I-II de $\text{Ca}_v1.1$ et β_{1a} , favorisant ainsi la transmission du signal entre $\text{Ca}_v1.1$ et RYR1 lors du couplage EC (Flucher, 2015).

Enfin, nous pourrions envisager que le PtdIns(4,5) P_2 exerce son effet sur le couplage EC à travers le recrutement à la membrane du tubule T d'un partenaire moléculaire stabilisant l'interaction entre le DHPR et RYR1. Parmi les candidats potentiels, les junctophilines JP1 et JP2 s'insèrent dans la membrane du RS et stabilisent le complexe membranaire tubule T / RS d'une part en contactant le PtdIns(4,5) P_2 via leur motif « MORN », et d'autre part en se liant avec RYR1 et avec le DHPR (Phimister et al., 2007; Golini et al., 2011; van Oort et al., 2011). De manière intéressante, la modulation de l'expression de JP1 et/ou de JP2 provoque des altérations du couplage EC et de l'homéostasie calcique associées à des défauts structuraux du complexe jonctionnel membranaire (Takeshima et al., 2000; Golini et al., 2011; Van Oort et al., 2011). De même, la dysferline pourrait représenter un candidat potentiel favorisant la fonction du couplage EC à travers son interaction avec le PtdIns(4,5) P_2 à la membrane du tubule T (Therrien et al., 2009; Hofhuis et al., 2017). En effet, la dysferline est enrichie à la membrane du tubule T où elle interagit avec le PtdIns(4,5) P_2 via ses domaines C2, et son absence dans les fibres musculaires différenciées a été associée à une altération de l'homéostasie calcique induite par un stress (Kerr et al., 2013). Il sera intéressant de poursuivre ce travail par une étude plus approfondie de la cible du PtdIns(4,5) P_2 et des détails de son mécanisme d'action. A titre d'exemple, on pourrait envisager d'étudier les effets de la déplétion en PtdIns(4,5) P_2 sur la localisation de la dysferline ou de junctophilines dépourvues de leur domaine d'interaction au RS ; et par ailleurs d'étudier l'effet sur le couplage EC de l'expression de junctophilines ou de dysferlines mutées au niveau de leur domaine d'interaction avec le PtdIns(4,5) P_2 .

Un autre aspect des perspectives offertes par ce travail serait de tester s'il existe une corrélation physiologique ou pathologique d'une telle modulation des taux de PtdIns(4,5) P_2 dans la régulation du couplage EC des fibres musculaires squelettiques. En tant que précurseur de PtdIns(3,4,5) P_3 et d'Ins(1,4,5) P_3 par la PLC et la PtdIns 3-kinase de classe I respectivement, le PtdIns(4,5) P_2 représente une cible de régulation de diverses cascades de signalisation. On peut alors suspecter l'existence de conditions spécifiques dans lesquelles une sur-activation de l'une de ces enzymes puisse moduler les stocks de PtdIns(4,5) P_2 dans le but de réguler le couplage EC et l'homéostasie calcique. Par ailleurs, il a été décrit une augmentation de PtdIns(4,5) P_2 à la membrane plasmique de différents types cellulaires incluant les cellules cardiaques, provoquée par une hyper-osmolarité (Nasuhoglu et al., 2002). Une telle situation pourrait survenir dans le muscle squelettique au cours d'un exercice intense (Lindinger et al., 1992) et il serait donc intéressant d'en étudier les conséquences sur le niveau de PtdIns(4,5) P_2 et sur la fonction du couplage EC.

Enfin, comme nous le verrons dans la deuxième partie de cette discussion, des interactions fonctionnelles existent entre MTM1 et les protéines DNM2 et BIN1, connues pour se lier et/ou

interagir avec le $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ dans la membrane des tubules T (Royer et al., 2013; Wu et Baumgart, 2014). Les données de la littérature ainsi que notre présent travail révèlent une altération de l'homéostasie calcique et du couplage EC impliquée dans la faiblesse musculaire associée à différentes formes de CNM, suggérant une implication pathologique du métabolisme des PtdInsPs dans les mécanismes de contrôle de la signalisation calcique musculaire.

Altérations du couplage EC et de l'homéostasie calcique dans deux modèles de CNM

La CNM liée à l'X ainsi que les formes autosomiques dominante et récessive sont dues à des mutations principalement localisées dans les gènes codant pour MTM1, DNM2 et BIN1. D'après de nombreuses études moléculaires, cellulaires et fonctionnelles, ces trois protéines montrent une implication dans le remodelage et le trafic membranaire, suggérant un mécanisme pathologique commun à toutes les formes de CNM. Cependant, les relations fonctionnelles entre ces différentes protéines sont encore peu connues et la question de savoir si certains mécanismes sont altérés de manière spécifique et conditionnent la sévérité de chaque CNM reste ouverte. Dans ce travail, nous avons mis en évidence et caractérisé les altérations du couplage EC et de la signalisation calcique dans les fibres musculaires de deux modèles murins de la XL- et de l'AD-CNM. Alors que certains de ces défauts sont similaires entre les deux pathologies, d'autres affectent plus sévèrement les fibres déficientes en myotubularine et pourraient être déterminants dans la sévérité de la faiblesse musculaire associée à la XL-CNM.

La première différence entre ces modèles concerne la présence de désorganisations structurales dans les fibres *Mtm1* KO, caractérisées par une augmentation de la proportion de tubules longitudinaux, une réduction du nombre total de tubules par rapport aux fibres contrôles et la présence de régions subcellulaires présentant une déstructuration du réseau (Al-Qusairi et al., 2009). A l'inverse, nos résultats n'ont révélé aucune altération évidente du réseau de tubules T dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} et s'accordent avec les immunomarquages réalisés par Durieux et al. (2010) sur les fibres musculaires de ce même modèle, montrant l'expression correcte de $\text{Ca}_v1.1$ et de RYR1 à la triade. Ces observations sont en accord avec une corrélation entre l'étendue des altérations structurales et la faiblesse musculaire associée à une CNM donnée. Notre analyse a cependant révélé une légère réduction de la densité de tubules ainsi que du condensateur membranaire dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} par rapport aux fibres contrôles, suggérant la présence d'altérations subtiles, probablement associées au rôle de DNM2 dans la fission membranaire (Chin et al., 2015). De manière intéressante, les cellules cardiaques déficientes en BIN1 présentent également une

réduction du condensateur membranaire et ce défaut a été associé à une réduction du nombre de replis dans la membrane des tubules T (Hong et al., 2014). Ainsi il serait intéressant de tester si un tel défaut est présent dans les fibres KI-Dnm2^{R465W} en utilisant des approches de super-résolution ou de microscopie électronique.

Nous avons mis en évidence dans notre travail une altération du couplage EC et de l'homéostasie calcique chez les deux modèles *Mtm1* KO et KI-Dnm2^{R465W}, et ces défauts traduisent une réduction d'amplitude et un ralentissement de la libération de Ca²⁺ du RS par les canaux RYR1. Il est intéressant de noter que, si l'augmentation des cinétiques est similaire entre ces deux modèles, l'altération de l'amplitude de l'efflux calcique affecte plus sévèrement les fibres déficientes en MTM1 avec une réduction de 60 % contre 30 % dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}, par rapport aux fibres contrôles respectives. Une approche identique d'étude du couplage EC a été réalisée durant mon travail de thèse dans les fibres musculaires déficientes en SPEG, et a révélé une réduction de 50 % et un retard de l'efflux calcique du RS, associés à une réduction du nombre et à une désorganisation des structures triadiques (Huntoon et al., 2018). De même, des défauts du réseau de tubules T ont été décrits dans les fibres musculaires différenciées sous-exprimant BIN1, et sont associés à une réduction de 20 % de la libération maximale de Ca²⁺ par le RS (Tjondrokoesoemo et al., 2011). Ainsi, l'ensemble de ces données fournit une indication claire que la signalisation calcique et le couplage EC souffrent d'un défaut fonctionnel qualitativement commun dans les CNM associées à des mutations des gènes codant MTM1, DNM2, BIN1 et SPEG, associé à un niveau d'altération variable de la structure de la triade et des tubules T.

On peut suspecter que ces défauts sont directement associés au rôle de ces protéines dans la tubulation membranaire et/ou dans la maintenance du réseau de tubules, ainsi qu'aux interactions qu'il existe entre ces protéines et avec le PtdIns(4,5)P₂. En effet, SPEG ainsi que BIN1 sont des partenaires moléculaires de MTM1, et l'interaction entre MTM1 et BIN1 favorise la tubulation membranaire (Royer et al., 2013; Agrawal et al., 2014). De même, des interactions entre DNM2 et BIN1 ont été décrites, et sont renforcées par la capacité de BIN1 à regrouper localement le PtdIns(4,5)P₂ à la membrane plasmique (Picas et al., 2014). Toujours en faveur de cette hypothèse, il a été montré des interactions fonctionnelles entre DNM2 et MTM1 et un effet bénéfique d'une réduction de l'expression de DNM2 sur le phénotype *Mtm1* KO (Cowling et al., 2014). Enfin, un lien fonctionnel a été identifié entre la protéine N-WASP (pour *neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) et les protéines BIN1 et DNM2 : N-WASP interagit avec BIN1 et avec le PtdIns(4,5)P₂ à la triade et une altération de sa distribution a été observée dans les fibres musculaires sous-exprimant

DNM2 et BIN1 (Papayannopoulos et al., 2005; Falcone et al., 2014). Ce défaut est par ailleurs restauré par l'expression de la forme active de N-WASP dans ces cellules. L'ensemble de ces données met l'accent sur le rôle critique de ces interactions protéine-protéine et protéine-phosphoinositides dans la physiologie et la physiopathologie du couplage EC, même si on est encore loin de disposer d'un modèle complet dans lequel la fonction précise de chacune de ces interactions est définie.

L'une des découvertes majeures de ce travail est le caractère hétérogène du signal calcique dans les fibres *Mtm1* KO et KI-Dnm2^{R465W}. Une altération similaire a également été mise en évidence dans les fibres musculaires déficientes en SPEG, dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du Dr Agrawal (Huntoon et al., 2018). Une telle variabilité spatiale du signal calcique a déjà été rapportée dans les cardiomyocytes de divers modèles d'insuffisance cardiaque, et semble liée à une désorganisation du réseau de tubules T ou à une réduction de sa densité (Louch et al., 2006; Song et al., 2006; Heinzl et al., 2008). Ainsi l'interprétation des défauts de signalisation calcique observés dans notre étude ouvre plusieurs alternatives, pas nécessairement contradictoires, concernant les mécanismes mis en jeu.

Dans un premier temps nous pouvons supposer que les altérations localisées des transitoires calciques sont corrélées spatialement à des défauts d'ultrastructure des tubules T et cette hypothèse a été en partie vérifiée par l'analyse simultanée de l'intégrité membranaire et de la signalisation calcique dans les fibres *Mtm1* KO. De plus, l'observation d'événements calciques élémentaires au repos dans les fibres KI-Dnm2^{R465W}, combinée aux retards spatialement localisés de l'efflux calcique dans les fibres *Mtm1* KO et KI-Dnm2^{R465W} témoignent d'un phénomène de Ca²⁺ induced-Ca²⁺ release, résultant vraisemblablement d'un découplage entre certains canaux RYR1 avec les DHPRs associés. Le fait que ces altérations affectent de manière similaire les fibres *Mtm1* KO et KI-Dnm2^{R465W} suggère que le retard de l'efflux calcique du RS ne joue pas un rôle majeur dans la différence de sévérité entre les CNM associées à MTM1 et DNM2. En suivant cette hypothèse, on pourrait imaginer que le phénomène de Ca²⁺ induced-Ca²⁺ release puisse participer à compenser le défaut fonctionnel du couplage EC dans les fibres pathologiques.

Une autre alternative serait que la perturbation du métabolisme des PtdInsPs participe aux défauts du couplage EC et de signalisation calcique indépendamment des altérations structurales. Nos résultats montrant une corrélation non-systématique entre les altérations spatialement localisées de l'efflux calcique et les désorganisations structurales dans les fibres *Mtm1* KO appuient cette hypothèse. De plus, la déficience en MTMR14 chez la souris et le poisson zèbre a été associée à un déficit du couplage EC, mais sans les altérations d'architecture membranaire interne observées sur le modèle *Mtm1* KO (Shen et al., 2009; Dowling et al., 2010). Cette hypothèse est également

supportée par des travaux menés au laboratoire montrant que l'accumulation des substrats de MTM1 *via* micro-injection de PtdIns(3)P et de PtdIns(3,5)P₂ dans des fibres musculaires contrôles est associée à une diminution de l'amplitude maximale de libération de Ca²⁺ par le RS (Rodríguez et al., 2014). Pour finir, nous avons montré dans le présent travail l'effet bénéfique d'un traitement aux pan-inhibiteurs de l'activité PtdIns 3-kinase sur l'amplitude de l'efflux de Ca²⁺ du RS dans les fibres *Mtm1* KO, et sur la survie des souris déficientes en MTM1. En revanche, l'effet bénéfique *in vitro* sur la signalisation calcique n'a pas été reproduit par l'inhibition spécifique des PtdIns 3-kinases de classe III. Ce résultat est extrêmement intéressant car d'une part il suggère que l'accumulation des produits de la PtdIns 3-kinase de classe I et/ou de classe II contribue à diminuer l'efflux calcique dans les fibres musculaires déficientes en MTM1. D'autre part, il démontre que cette altération de l'homéostasie calcique n'est pas totalement irréversible, et corrige de manière substantielle la faiblesse musculaire associée à la XL-CNM.

Notre approche physiologique et pharmacologique à l'échelle de la fibre musculaire différenciée a prouvé son efficacité comme tremplin vers une étude préclinique d'un traitement pharmacologique chez la souris. Par ailleurs, les succès spectaculaires de la thérapie génique appliquée aux modèles animaux de la myopathie myotubulaire démontrent sans équivoque que la fonction musculaire peut être restaurée et la maladie guérie, et on peut imaginer qu'une approche pharmacologique pourrait également s'avérer efficace. L'utilisation de la wortmannine en recherche clinique est limitée par sa faible solubilité, son instabilité et par le fait qu'elle présente une certaine toxicité pour le foie. Cependant nos résultats, combinés aux récentes données de la littérature (Sabha et al., 2016), tendent à désigner l'inhibition de la PtdIns 3-kinase de classe IIB comme meilleure cible pour corriger la fonction du couplage EC chez les modèles de la XL-CNM. Ceci souligne les enjeux cruciaux de l'industrie pharmaceutique dans le développement de nouvelles molécules spécifiques de l'isoforme de classe IIB.

De nombreuses questions restent toutefois en suspens, notamment concernant le mécanisme de régulation du couplage EC par le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P₂. Une hypothèse probable serait que ces deux PtdInsPs s'accumulent dans la membrane du RS à proximité de RYR1 et régulent son activité par interaction directe, comme le suggèrent les travaux de Shen et al. (2009). Il serait intéressant de poursuivre ce travail avec une analyse de la distribution du PtdIns(3)P et du PtdIns(3,5)P₂ dans les fibres musculaires de souris contrôles et *Mtm1* KO, à l'aide de l'expression de bio-senseurs fluorescents spécifiques de ces PtdInsPs. Une autre perspective serait de tester si l'inhibition de

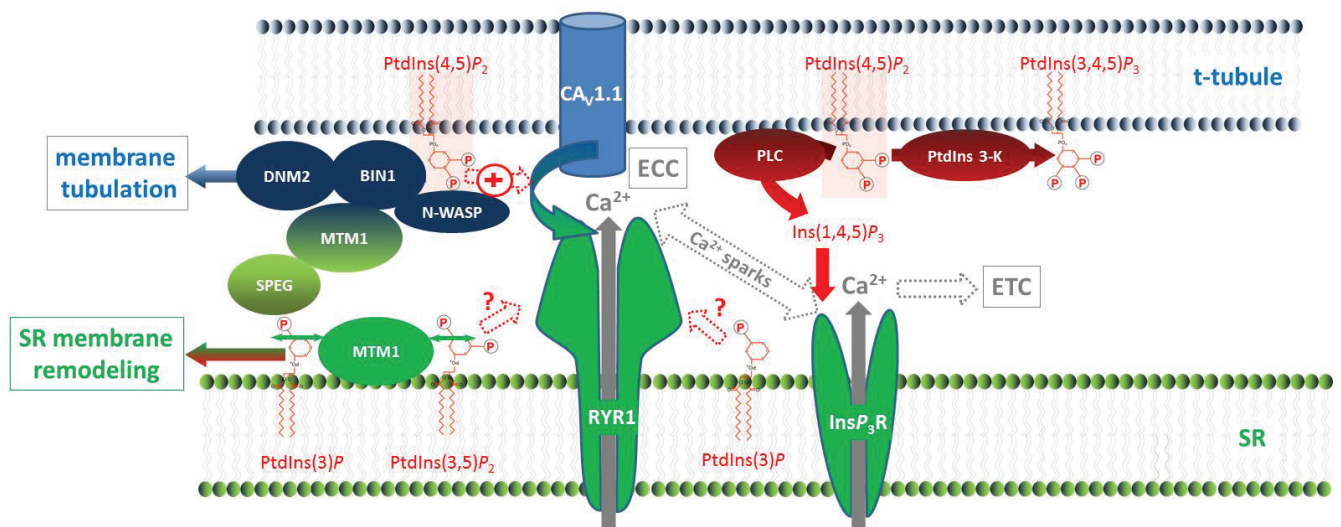


Figure 29. Schéma bilan représentant les différentes possibilités de régulation du couplage EC par le métabolisme des PtdInsPs.

D'après Csernoch et Jacquemond, 2015.

l'activité PtdIns 3-kinase est efficace sur la fonction du couplage EC chez les autres modèles de CNM associés à DNM2 et SPEG.

Dans l'ensemble, mon travail de Thèse a contribué à fournir des arguments convaincants en faveur d'un rôle du métabolisme des PtdInsPs dans la régulation du couplage EC (Figure 29), et de l'altération de cette régulation comme mécanisme important dans la détermination de la faiblesse musculaire associée aux différentes formes de CNM. Cependant, malgré toutes les données génétiques, moléculaires, cellulaires et fonctionnelles accumulées, les relations fonctionnelles entre les protéines associées aux CNM incluant MTM1, BIN1, DNM2, SPEG et RYR1 restent encore mal comprises tout autant d'ailleurs que les mécanismes physiopathologiques sous tendant ces maladies. Ce domaine de recherche est cependant extrêmement riche et dynamique à l'heure actuelle et il est certain que les années à venir verront encore des progrès importants en ce qui concerne ses aspects fondamentaux, pathologiques et thérapeutiques. Dans ce contexte, il ne fait aucun doute non plus que les approches de physiologie et de biophysique à l'échelle de la fibre musculaire isolée auront encore un rôle important à jouer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

Adams, B.A., Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S., and Beam, K.G. (1990). Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature* 346, 569–572.

Agrawal, P.B., Pierson, C.R., Joshi, M., Liu, X., Ravenscroft, G., Moghadaszadeh, B., Talabere, T., Viola, M., Swanson, L.C., Haliloğlu, G., et al. (2014). SPEG Interacts with Myotubularin, and Its Deficiency Causes Centronuclear Myopathy with Dilated Cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 218–226.

Ahern, G.P., Junankar, P.R., and Dulhunty, A.F. (1997). Subconductance states in single-channel activity of skeletal muscle ryanodine receptors after removal of FKBP12. *Biophys. J.* 72, 146–162.

Allard, B. (2018). From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: Basic aspects and related clinical disorders. *Neuromuscul. Disord.*

Allard, B., and Fuster, C. (2018). When muscle Ca²⁺ channels carry monovalent cations through gating pores: insights into the pathophysiology of type 1 hypokalemic periodic paralysis. *J. Physiol.*

Allard, B., Couchoux, H., Pouvreau, S., and Jacquemond, V. (2006). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and depletion fail to affect sarcolemmal ion channel activity in mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* 575, 69–81.

Al-Qusairi, L., Weiss, N., Toussaint, A., Berbey, C., Messaddeq, N., Kretz, C., Sanoudou, D., Beggs, A.H., Allard, B., Mandel, J.-L., et al. (2009). T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18763–18768.

Alvarado, F.J., Chen, X., and Valdivia, H.H. (2017). Ablation of the cardiac ryanodine receptor phospho-site Ser2808 does not alter the adrenergic response or the progression to heart failure in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 103, 40–47.

Amburgey, K., Tsuchiya, E., de Chastonay, S., Glueck, M., Alvarez, R., Nguyen, C.-T., Rutkowski, A., Hornyak, J., Beggs, A.H., and Dowling, J.J. (2017). A natural history study of X-linked myotubular myopathy. *Neurology* 89, 1355–1364.

Amoasii, L., Bertazzi, D.L., Tronchère, H., Hnia, K., Chicanne, G., Rinaldi, B., Cowling, B.S., Ferry, A., Klaholz, B., Payrastre, B., et al. (2012). Phosphatase-Dead Myotubularin Ameliorates X-Linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in Mice. *PLOS Genet.* 8, e1002965.

Amoasii, L., Hnia, K., Chicanne, G., Brech, A., Cowling, B.S., Müller, M.M., Schwab, Y., Koebel, P., Ferry, A., Payrastre, B., et al. (2013). Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J Cell Sci* 126, 1806–1819.

Andronache, Z., Hamilton, S.L., Dirksen, R.T., and Melzer, W. (2009). A retrograde signal from RyR1 alters DHP receptor inactivation and limits window Ca²⁺ release in muscle fibers of Y522S RyR1 knock-in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4531–4536.

Armstrong, C.M., Bezanilla, F.M., and Horowicz, P. (1972). Twitches in the presence of ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N'-tetracetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* *267*, 605–608.

Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P., and Cantley, L.C. (1989). PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* *57*, 167–175.

Azzedine, H., Bolino, A., Taïeb, T., Birouk, N., Di Duca, M., Bouhouche, A., Benamou, S., Mrabet, A., Hammadouche, T., Chkili, T., et al. (2003). Mutations in MTMR13, a New Pseudophosphatase Homologue of MTMR2 and Sbf1, in Two Families with an Autosomal Recessive Demyelinating Form of Charcot-Marie-Tooth Disease Associated with Early-Onset Glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* *72*, 1141–1153.

- B -

Balla, T. (2013). Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation. *Physiol. Rev.* *93*, 1019–1137.

Balnave, C.D., and Allen, D.G. (1998). Evidence for Na⁺/Ca²⁺ exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *274*, C940–C946.

Bannister, R.A. (2016). Bridging the myoplasmic gap II: more recent advances in skeletal muscle excitation–contraction coupling. *J. Exp. Biol.* *219*, 175–182.

Bannister, R.A., and Beam, K.G. (2013). Ca_v1.1: The atypical prototypical voltage-gated Ca²⁺ channel. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 1587–1597.

Bárány, M. (1967). ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening. *J. Gen. Physiol.* *50*, 197–218.

Barone, V., Randazzo, D., Re, V.D., Sorrentino, V., and Rossi, D. (2015). Organization of junctional sarcoplasmic reticulum proteins in skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *36*, 501–515.

Batty, I.H., van der Kaay, J., Gray, A., Telfer, J.F., Dixon, M.J., and Downes, C.P. (2007). The control of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate concentrations by activation of the Src homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 2, SHIP2. *Biochem. J.* *407*, 255–266.

Beam, K.G., and Bannister, R.A. (2010). Looking for answers to EC coupling's persistent questions. *J. Gen. Physiol.* *136*, 7.

Beam, K.G., Knudson, C.M., and Powell, J.A. (1986). A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature* *320*, 168–170.

- Beam, T.A., Loudermilk, E.F., and Kisor, D.F. (2017). Pharmacogenetics and pathophysiology of CACNA1S mutations in malignant hyperthermia. *Physiol. Genomics*.
- Beard, N.A., Sakowska, M.M., Dulhunty, A.F., and Laver, D.R. (2002). Calsequestrin Is an Inhibitor of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Biophys. J.* *82*, 310–320.
- Beard, N.A., Laver, D.R., and Dulhunty, A.F. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *85*, 33–69.
- Beggs, A.H., Böhm, J., Snead, E., Kozlowski, M., Maurer, M., Minor, K., Childers, M.K., Taylor, S.M., Hitte, C., Mickelson, J.R., et al. (2010). MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14697–14702.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor/calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* *15*, 325–330.
- Benedetti, B., Tuluc, P., Mastroia, V., Dlaska, C., and Flucher, B.E. (2015). Physiological and Pharmacological Modulation of the Embryonic Skeletal Muscle Calcium Channel Splice Variant CaV1.1e. *Biophys. J.* *108*, 1072–1080.
- Beqollari, D., Romberg, C.F., Filipova, D., Meza, U., Papadopoulos, S., and Bannister, R.A. (2015). Rem uncouples excitation–contraction coupling in adult skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* *146*, 97–108.
- Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., and Müntener, M. (2000). Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiol. Rev.* *80*, 1215–1265.
- Berger, P., Bonneick, S., Willi, S., Wymann, M., and Suter, U. (2002). Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with Charcot–Marie–Tooth disease type 4B1. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1569–1579.
- Berger, P., Berger, I., Schaffitzel, C., Tersar, K., Volkmer, B., and Suter, U. (2006). Multi-level regulation of myotubularin-related protein-2 phosphatase activity by myotubularin-related protein-13/set-binding factor-2. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 569–579.
- Berridge, M.J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1793*, 933–940.
- Berthier, C., Kutchukian, C., Bouvard, C., Okamura, Y., and Jacquemond, V. (2015). Depression of voltage-activated Ca²⁺ release in skeletal muscle by activation of a voltage-sensing phosphatase. *J. Gen. Physiol.* *145*, 315–330.
- Bevilacqua, J.A., Bitoun, M., Biancalana, V., Oldfors, A., Stoltenburg, G., Claeys, K.G., Lacène, E., Brochier, G., Manéré, L., Laforêt, P., et al. (2009). “Necklace” fibers, a new histological marker of late-onset MTM1-related centronuclear myopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *117*, 283.
- Biancalana, V., Caron, O., Gallati, S., Baas, F., Kress, W., Novelli, G., D’Apice, M.R., Lagier-Tourenne, C., Buj-Bello, A., Romero, N.B., et al. (2003). Characterisation of mutations in 77 patients with X-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype. *Hum. Genet.* *112*, 135–142.

Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P.-Y., Lacène, E., Ferrer, X., Laforêt, P., Martin, J.-J., Laporte, J., Lochmüller, H., Beggs, A.H., et al. (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* *37*, 1207–1209.

Bitoun, M., Bevilacqua, J.A., Prudhon, B., Maugenre, S., Taratuto, A.L., Monges, S., Lubieniecki, F., Cances, C., Uro-Coste, E., Mayer, M., et al. (2007). Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann. Neurol.* *62*, 666–670.

Bitoun, M., Durieux, A.-C., Prudhon, B., Bevilacqua, J.A., Herledan, A., Sakanyan, V., Urtizbera, A., Cartier, L., Romero, N.B., and Guicheney, P. (2009). Dynamin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis. *Hum. Mutat.* *30*, 1419–1427.

Blaauw, B., Del Piccolo, P., Rodriguez, L., Hernandez Gonzalez, V.-H., Agatea, L., Solagna, F., Mammano, F., Pozzan, T., and Schiaffino, S. (2012). No evidence for inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ release in isolated fibers of adult mouse skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* *140*, 235–241.

Blagoveshchenskaya, A., Cheong, F.Y., Rohde, H.M., Glover, G., Knödler, A., Nicolson, T., Boehmelt, G., and Mayinger, P. (2008). Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *J Cell Biol* *180*, 803–812.

Blondeau, F., Laporte, J., Bodin, S., Superti-Furga, G., Payrastre, B., and Mandel, J.-L. (2000). Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2223–2229.

Böhm, J., Yiş, U., Ortaç, R., Çakmakçı, H., Kurul, S.H., Dirik, E., and Laporte, J. (2010). Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation. *Orphanet J. Rare Dis.* *5*, 35.

Böhm, J., Biancalana, V., DeChene, E.T., Bitoun, M., Pierson, C.R., Schaefer, E., Karasoy, H., Dempsey, M.A., Klein, F., Dondaine, N., et al. (2012). Mutation Spectrum in the Large GTPase Dynamin 2, and Genotype–Phenotype Correlation in Autosomal Dominant Centronuclear Myopathy. *Hum. Mutat.* *33*, 949–959.

Böhm, J., Vasli, N., Maurer, M., Cowling, B., Shelton, G.D., Kress, W., Toussaint, A., Prokic, I., Schara, U., Anderson, T.J., et al. (2013). Altered Splicing of the BIN1 Muscle-Specific Exon in Humans and Dogs with Highly Progressive Centronuclear Myopathy. *PLOS Genet.* *9*, e1003430.

Böhm, J., Biancalana, V., Malfatti, E., Dondaine, N., Koch, C., Vasli, N., Kress, W., Strittmatter, M., Taratuto, A.L., Gonorazky, H., et al. (2014). Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain* *137*, 3160–3170.

Bolino, A., Muglia, M., Conforti, F.L., LeGuern, E., Salih, M.A.M., Georgiou, D.-M., Christodoulou, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Mandich, P., Schenone, A., et al. (2000). Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat. Genet.* *25*, 17–19.

Bolino, A., Bolis, A., Previtali, S.C., Dina, G., Bussini, S., Dati, G., Amadio, S., Carro, U.D., Mruk, D.D., Feltri, M.L., et al. (2004). Disruption of Mtmr2 produces CMT4B1-like neuropathy with myelin unfolding and impaired spermatogenesis. *J Cell Biol* *167*, 711–721.

Bolis, A., Coviello, S., Bussini, S., Dina, G., Pardini, C., Previtali, S.C., Malaguti, M., Morana, P., Carro, U.D., Feltri, M.L., et al. (2005). Loss of Mtmr2 Phosphatase in Schwann Cells But Not in Motor Neurons Causes Charcot-Marie-Tooth Type 4B1 Neuropathy with Myelin Outfoldings. *J. Neurosci.* *25*, 8567–8577.

Boncompagni, S., Thomas, M., Lopez, J.R., Allen, P.D., Yuan, Q., Kranias, E.G., Franzini-Armstrong, C., and Perez, C.F. (2012). Triadin/Junctin Double Null Mouse Reveals a Differential Role for Triadin and Junctin in Anchoring CASQ to the jSR and Regulating Ca²⁺ Homeostasis. *PLOS ONE* *7*, e39962.

Braubach, P., Orynbayev, M., Andronache, Z., Hering, T., Landwehrmeyer, G.B., Lindenberg, K.S., and Melzer, W. (2014). Altered Ca²⁺ signaling in skeletal muscle fibers of the R6/2 mouse, a model of Huntington's disease. *J. Gen. Physiol.* *144*, 393–413.

Brillantes, A.-M.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriašová, E., Moschella, M.C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E., and Marks, A.R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* *77*, 513–523.

Brini, M., and Carafoli, E. (2011). The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.

Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J.J., and Pessah, I.N. (1992). Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J. Biol. Chem.* *267*, 23560–23567.

Buj-Bello, A., Biancalana, V., Moutou, C., Laporte, J., and Mandel, J.-L. (1999). Identification of novel mutations in the MTM1 gene causing severe and mild forms of X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.* *14*, 320–325.

Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.-F., and Mandel, J.-L. (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15060–15065.

Buj-Bello, A., Fougereuse, F., Schwab, Y., Messaddeq, N., Spehner, D., Pierson, C.R., Durand, M., Kretz, C., Danos, O., Douar, A.-M., et al. (2008). AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 2132–2143.

Butler, M.H., David, C., Ochoa, G.-C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., and Camilli, P.D. (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*, 1355–1367.

- C -

Calderón, J.C., Bolaños, P., Torres, S.H., Rodríguez-Arroyo, G., and Caputo, C. (2009). Different fibre populations distinguished by their calcium transient characteristics in enzymatically dissociated murine flexor digitorum brevis and soleus muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *30*, 125–137.

Calì, T., Brini, M., and Carafoli, E. (2017). Chapter Six - Regulation of Cell Calcium and Role of Plasma Membrane Calcium ATPases. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, L. Galluzzi, ed. (Academic Press), pp. 259–296.

Callaway, C., Seryshev, A., Wang, J.P., Slavik, K.J., Needleman, D.H., Cantu, C., Wu, Y., Jayaraman, T., Marks, A.R., and Hamilton, S.L. (1994). Localization of the high and low affinity [3H]ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.* *269*, 15876–15884.

Campa, C.C., Margaria, J.P., Derle, A., Giudice, M.D., Santis, M.C.D., Gozzelino, L., Copperi, F., Bosia, C., and Hirsch, E. (2018). Rab11 activity and PtdIns(3) P turnover removes recycling cargo from endosomes. *Nat. Chem. Biol.* *1*.

Campbell, K.P., Franzini-Armstrong, C., and Shamoo, A.E. (1980). Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Identification of the “sarcoplasmic reticulum feet” associated with heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* *602*, 97–116.

Cannon, S.C. (2010). Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle. *J. Physiol.* *588*, 1887–1895.

Cao, H., Garcia, F., McNiven, M.A., and Bonifacino, J.S. (1998). Differential Distribution of Dynamin Isoforms in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* *9*, 2595–2609.

Carpenter, D., Ringrose, C., Leo, V., Morris, A., Robinson, R.L., Halsall, P.J., Hopkins, P.M., and Shaw, M.-A. (2009). The role of CACNA1S in predisposition to malignant hyperthermia. *BMC Med. Genet.* *10*, 104.

Casas, M., Figueroa, R., Jorquera, G., Escobar, M., Molgó, J., and Jaimovich, E. (2010). IP₃-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* *136*, 455–467.

Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 521–555.

Catterall, W.A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.

Censier, K., Urwyler, A., Zorzato, F., and Treves, S. (1998). Intracellular calcium homeostasis in human primary muscle cells from malignant hyperthermia-susceptible and normal individuals. Effect Of overexpression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors. *J. Clin. Invest.* *101*, 1233–1242.

Ceyhan-Birsoy, O., Agrawal, P.B., Hidalgo, C., Schmitz-Abe, K., DeChene, E.T., Swanson, L.C., Soemedi, R., Vasli, N., Iannaccone, S.T., Shieh, P.B., et al. (2013). Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology* *81*, 1205–1214.

Chaussade, C., Pirola, L., Bonnafous, S., Blondeau, F., Brenz-Verca, S., Tronchère, H., Portis, F., Rusconi, S., Payrastre, B., Laporte, J., et al. (2003). Expression of Myotubularin by an Adenoviral Vector Demonstrates Its Function as a Phosphatidylinositol 3-Phosphate [PtdIns(3)P] Phosphatase in Muscle Cell Lines: Involvement of PtdIns(3)P in Insulin-Stimulated Glucose Transport. *Mol. Endocrinol.* *17*, 2448–2460.

- Chelu, M.G., Goonasekera, S.A., Durham, W.J., Tang, W., Lueck, J.D., Riehl, J., Pessah, I.N., Zhang, P., Bhattacharjee, M.B., Dirksen, R.T., et al. (2005). Heat- and anesthesia-induced malignant hyperthermia in an RyR1 knock-in mouse. *FASEB J.* *20*, 329–330.
- Chen, S.R., Li, X., Ebisawa, K., and Zhang, L. (1997). Functional characterization of the recombinant type 3 Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) expressed in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 24234–24246.
- Cheng, H., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* *262*, 740–744.
- Cheng, W., Altafaj, X., Ronjat, M., and Coronado, R. (2005). Interaction between the dihydropyridine receptor Ca²⁺ channel β -subunit and ryanodine receptor type 1 strengthens excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 19225–19230.
- Childers, M.K., Joubert, R., Poulard, K., Moal, C., Grange, R.W., Doering, J.A., Lawlor, M.W., Rider, B.E., Jamet, T., Danièle, N., et al. (2014). Gene Therapy Prolongs Survival and Restores Function in Murine and Canine Models of Myotubular Myopathy. *Sci. Transl. Med.* *6*, 220ra10.
- Chin, Y.-H., Lee, A., Kan, H.-W., Laiman, J., Chuang, M.-C., Hsieh, S.-T., and Liu, Y.-W. (2015). Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 5542–5554.
- Choi, R.H., Koenig, X., and Launikonis, B.S. (2017). Dantrolene requires Mg²⁺ to arrest malignant hyperthermia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 4811–4815.
- Chu, A., and Stefani, E. (1991). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced Ca²⁺ release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum terminal cisternal membranes. Ca²⁺ flux and single channel studies. *J. Biol. Chem.* *266*, 7699–7705.
- Chun, L.G., Ward, C.W., and Schneider, M.F. (2003). Ca²⁺ sparks are initiated by Ca²⁺ entry in embryonic mouse skeletal muscle and decrease in frequency postnatally. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*
- Claeys, K.G., Maisonobe, T., Böhm, J., Laporte, J., Hezode, M., Romero, N.B., Brochier, G., Bitoun, M., Carlier, R.Y., and Stojkovic, T. (2010). Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation. *Neurology* *74*, 519–521.
- Collet, C., and Jacquemond, V. (2002). Sustained release of calcium elicited by membrane depolarization in ryanodine-injected mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* *82*, 1509–1523.
- Collet, C., Pouvreau, S., Csernoch, L., Allard, B., and Jacquemond, V. (2004). Calcium signaling in isolated skeletal muscle fibers investigated under “silicone voltage-clamp” conditions. *Cell Biochem. Biophys.* *40*, 225–236.
- Collins, J.H. (1991). Sequence analysis of the ryanodine receptor: Possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *178*, 1288–1290.
- Conti, A., Gorza, L., and Sorrentino, V. (1996). Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles. *Biochem. J.* *316*, 19–23.

Cowling, B.S., Toussaint, A., Amoasii, L., Koebel, P., Ferry, A., Davignon, L., Nishino, I., Mandel, J.-L., and Laporte, J. (2011). Increased Expression of Wild-Type or a Centronuclear Myopathy Mutant of Dynamin 2 in Skeletal Muscle of Adult Mice Leads to Structural Defects and Muscle Weakness. *Am. J. Pathol.* *178*, 2224–2235.

Cowling, B.S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N.B., and Laporte, J. (2014). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 1350–1363.

Csernoch, L. (2007). Sparks and embers of skeletal muscle: the exciting events of contractile activation. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *454*, 869–878.

Csernoch, L., Zhou, J., Stern, M.D., Brum, G., and Ríos, E. (2004). The elementary events of Ca²⁺ release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle. *J. Physiol.* *557*, 43–58.

Csernoch, L., Pouvreau, S., Ronjat, M., and Jacquemond, V. (2008). Voltage-activated elementary calcium release events in isolated mouse skeletal muscle fibers. *J. Membr. Biol.* *226*, 43–55.

Csernoch, L., and Jacquemond, V. (2015). Phosphoinositides in Ca²⁺ signaling and excitation–contraction coupling in skeletal muscle: an old player and newcomers. *J Muscle Res Cell Motil* *36*, 491–499.

- D -

Dainese, M., Quarta, M., Lyfenko, A.D., Paolini, C., Canato, M., Reggiani, C., Dirksen, R.T., and Protasi, F. (2009). Anesthetic- and heat-induced sudden death in calsequestrin-1-knockout mice. *FASEB J.* *23*, 1710–1720.

Dang, H., Li, Z., Skolnik, E.Y., and Fares, H. (2004). Disease-related Myotubularins Function in Endocytic Traffic in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* *15*, 189–196.

Dayal, A., Schrötter, K., Pan, Y., Föhr, K., Melzer, W., and Grabner, M. (2017). The Ca²⁺ influx through the mammalian skeletal muscle dihydropyridine receptor is irrelevant for muscle performance. *Nat. Commun.* *8*.

Des Georges, A., Clarke, O.B., Zalk, R., Yuan, Q., Condon, K.J., Grassucci, R.A., Hendrickson, W.A., Marks, A.R., and Frank, J. (2016). Structural basis for gating and activation of RyR1. *Cell* *167*, 145–157.e17.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651–657.

Dickson, E.J., Jensen, J.B., Vivas, O., Kruse, M., Traynor-Kaplan, A.E., and Hille, B. (2016). Dynamic formation of ER–PM junctions presents a lipid phosphatase to regulate phosphoinositides. *J Cell Biol* *213*, 33–48.

Dietze, B., Henke, J., Eichinger, H.M., Lehmann-Horn, F., and Melzer, W. (2000). Malignant hyperthermia mutation Arg615Cys in the porcine ryanodine receptor alters voltage dependence of Ca²⁺ release. *J. Physiol.* 526, 507–514.

DiFranco, M., Capote, J., and Vergara, J.L. (2005). Optical Imaging and Functional Characterization of the Transverse Tubular System of Mammalian Muscle Fibers using the Potentiometric Indicator di-8-ANEPPS. *J. Membr. Biol.* 208, 141–153.

Dowling, J.J., Vreede, A.P., Low, S.E., Gibbs, E.M., Kuwada, J.Y., Bonnemann, C.G., and Feldman, E.L. (2009). Loss of Myotubularin Function Results in T-Tubule Disorganization in Zebrafish and Human Myotubular Myopathy. *PLOS Genet.* 5, e1000372.

Dowling, J.J., Low, S.E., Busta, A.S., and Feldman, E.L. (2010). Zebrafish MTMR14 is required for excitation–contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2668–2681.

Dowling, J.J., Joubert, R., Low, S.E., Durban, A.N., Messaddeq, N., Li, X., Dulin-Smith, A.N., Snyder, A.D., Marshall, M.L., Marshall, J.T., et al. (2012). Myotubular myopathy and the neuromuscular junction: a novel therapeutic approach from mouse models. *Dis. Model. Mech.* 5, 852–859.

Dulhunty, A.F., Wei-LaPierre, L., Casarotto, M.G., and Beard, N.A. (2017). Core skeletal muscle ryanodine receptor calcium release complex. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44, 3–12.

Durieux, A.-C., Vignaud, A., Prudhon, B., Viou, M.T., Beuvin, M., Vassilopoulos, S., Fraysse, B., Ferry, A., Lainé, J., Romero, N.B., et al. (2010). A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4820–4836.

Durieux, A.-C., Vassilopoulos, S., Lainé, J., Fraysse, B., Briñas, L., Prudhon, B., Castells, J., Freyssenet, D., Bonne, G., Guicheney, P., et al. (2012). A Centronuclear Myopathy – Dynamin 2 Mutation Impairs Autophagy in Mice. *Traffic* 13, 869–879.

- E -

Edström, L., and Kugelberg, E. (1968). Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 31, 424–433.

Efremov, R.G., Leitner, A., Aebersold, R., and Raunser, S. (2015). Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* 517, 39–43.

Eltit, J.M., García, A.A., Hidalgo, J., Liberona, J.L., Chiong, M., Lavandero, S., Maldonado, E., and Jaimovich, E. (2006). Membrane Electrical Activity Elicits Inositol 1,4,5-Trisphosphate-dependent Slow Ca²⁺ Signals through a Gβγ/Phosphatidylinositol 3-Kinase γ Pathway in Skeletal Myotubes. *J. Biol. Chem.* 281, 12143–12154.

Eltit, J.M., Bannister, R.A., Moua, O., Altamirano, F., Hopkins, P.M., Pessah, I.N., Molinski, T.F., López, J.R., Beam, K.G., and Allen, P.D. (2012). Malignant hyperthermia susceptibility arising from altered resting coupling between the skeletal muscle L-type Ca²⁺ channel and the type 1 ryanodine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 7923–7928.

Elverman, M., Goddard, M.A., Mack, D., Snyder, J.M., Lawlor, M.W., Meng, H., Beggs, A.H., Buj-Bello, A., Poulard, K., Marsh, A.P., et al. (2017). Long-term effects of systemic gene therapy in a canine model of myotubular myopathy. *Muscle Nerve* *56*, 943–953.

Escobar, A.L., Velez, P., Kim, A.M., Cifuentes, F., Fill, M., and Vergara, J.L. (1997). Kinetic properties of DM-nitrophen and calcium indicators: rapid transient response to flash photolysis. *Pflüg. Arch.* *434*, 615–631.

Estrada, M., Liberona, J.L., Miranda, M., and Jaimovich, E. (2000). Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *279*, E132–E139.

Estrada, M., Espinosa, A., Müller, M., and Jaimovich, E. (2003). Testosterone Stimulates Intracellular Calcium Release and Mitogen-Activated Protein Kinases Via a G Protein-Coupled Receptor in Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology* *144*, 3586–3597.

Euden, J., Mason, S.A., Viero, C., Thomas, N.L., and Williams, A.J. (2013). Investigations of the Contribution of a Putative Glycine Hinge to Ryanodine Receptor Channel Gating. *J. Biol. Chem.* *288*, 16671–16679.

- F -

Fabiato, A. (1985). Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* *85*, 247–289.

Fabrizi, G.M., Ferrarini, M., Cavallaro, T., Cabrini, I., Cerini, R., Bertolasi, L., and Rizzuto, N. (2007). Two novel mutations in dynamin-2 cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* *69*, 291–295.

Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., Haucke, V., Noé, F., and Daumke, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* *477*, 556–560.

Faggioni, M., Kryshtal, D.O., and Knollmann, B.C. (2012). Calsequestrin Mutations and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Pediatr. Cardiol.* *33*, 959–967.

Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I., Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., et al. (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*, 1455–1475.

Felder, E., and Franzini-Armstrong, C. (2002). Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 1695–1700.

- Ferrantini, C., Coppini, R., Sacconi, L., Tosi, B., Zhang, M.L., Wang, G.L., Vries, E. de, Hoppenbrouwers, E., Pavone, F., Cerbai, E., et al. (2014). Impact of detubulation on force and kinetics of cardiac muscle contraction. *J. Gen. Physiol.* *143*, 783–797.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* *441*, 179–185.
- Fessenden, J.D., Wang, Y., Moore, R.A., Chen, S.R., Allen, P.D., and Pessah, I.N. (2000). Divergent functional properties of ryanodine receptor types 1 and 3 expressed in a myogenic cell line. *Biophys. J.* *79*, 2509–2525.
- Fessenden, J.D., Perez, C.F., Goth, S., Pessah, I.N., and Allen, P.D. (2003). Identification of a Key Determinant of Ryanodine Receptor Type 1 Required for Activation by 4-Chloro-m-cresol. *J. Biol. Chem.* *278*, 28727–28735.
- Fischer, D., Herasse, M., Bitoun, M., Barragán-Campos, H.M., Chiras, J., Laforêt, P., Fardeau, M., Eymard, B., Guicheney, P., and Romero, N.B. (2006). Characterization of the muscle involvement in dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Brain* *129*, 1463–1469.
- Flucher, B.E. (2015). How is SR calcium release in muscle modulated by PIP(4,5)2? *The Journal of General Physiology* *145*, 361–364.
- Föhr, U.G., Weber, B.R., Müntener, M., Staudenmann, W., Hughes, G.J., Frutiger, S., Banville, D., Schäfer, B.W., and Heizmann, C.W. (1993). Human α and β parvalbumins. *Eur. J. Biochem.* *215*, 719–727.
- Foster, F.M. (2003). The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J. Cell Sci.* *116*, 3037–3040.
- Fougerat, A., Gayral, S., Malet, N., Briand-Mesange, F., Breton-Douillon, M., and Laffargue, M. (2009). Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis? *Clinical Science* *116*, 791–804.
- Fourest-Lieuvin, A., Rendu, J., Osseni, A., Pernet-Gallay, K., Rossi, D., Oddoux, S., Brocard, J., Sorrentino, V., Marty, I., and Fauré, J. (2012). Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J Cell Sci* *125*, 3443–3453.
- Franzini-Armstrong, C., and Peachey, L.D. (1981). Striated muscle-contraction and control mechanisms. *J Cell Biol* *91*, 166s-186s.
- Franzini-Armstrong, C. (1999). The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J.*
- Franzini-Armstrong, C. (2018). The relationship between form and function throughout the history of excitation–contraction coupling. *J. Gen. Physiol.* *150*, 189–210.
- Franzini-Armstrong, C., and Nunzi, G. (1983). Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *4*, 233–252.
- Fraysse, B., Guicheney, P., and Bitoun, M. (2016). Calcium homeostasis alterations in a mouse model of the Dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Biol. Open* *5*, 1691–1696.

Freise, D., Held, B., Wissenbach, U., Pfeifer, A., Trost, C., Himmerkus, N., Schweig, U., Freichel, M., Biel, M., Hofmann, F., et al. (2000). Absence of the γ Subunit of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Increases L-type Ca^{2+} Currents and Alters Channel Inactivation Properties. *J. Biol. Chem.* *275*, 14476–14481.

Frost, A., Unger, V.M., and De Camilli, P. (2009). The BAR Domain Superfamily: Membrane-Molding Macromolecules. *Cell* *137*, 191–196.

Fruen, B.R., Mickelson, J.R., and Louis, C.F. (1997). Dantrolene Inhibition of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release by Direct and Specific Action at Skeletal Muscle Ryanodine Receptors. *J. Biol. Chem.* *272*, 26965–26971.

Fry, M.J. (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res. BCR* *3*, 304–312.

Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., Leon, S. de, Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J., and MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* *253*, 448–451.

Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., and Allard, B. (2017). Elevated resting H^{+} current in the R1239H type 1 hypokalaemic periodic paralysis mutated Ca^{2+} channel. *J. Physiol.* *595*, 6417–6428.

- G -

Gallant, E.M., and Lentz, L.R. (1992). Excitation-contraction coupling in pigs heterozygous for malignant hyperthermia. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *262*, C422–C426.

Garcia, J., Tanabe, T., and Beam, K.G. (1994). Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptors. *J. Gen. Physiol.* *103*, 125–147.

Gibbs, E.M., Davidson, A.E., Telfer, W.R., Feldman, E.L., and Dowling, J.J. (2014). The myopathy-causing mutation DNM2-S619L leads to defective tubulation in vitro and in developing zebrafish. *Dis. Model. Mech.* *7*, 157–161.

Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.-M., Parton, R.G., and Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* *19*, 4577–4588.

Gilly, H., Musat, I., Fricker, R., Bittner, R.E., Steinbereithner, K., and Kress, H. (1997). Classification of Malignant Hyperthermia-equivocal Patients by 4-chloro-m-cresol. *Anesth. Analg.* *85*, 149–154.

Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S.F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E.O., Bagriantsev, S.N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013). $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Dependent and Ca^{2+} -Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins. *Cell* *153*, 1494–1509.

Golini, L., Chouabe, C., Berthier, C., Cusimano, V., Fornaro, M., Bonvallet, R., Formoso, L., Giacomello, E., Jacquemond, V., and Sorrentino, V. (2011). Junctophilin 1 and 2 Proteins Interact with the L-type Ca²⁺ Channel Dihydropyridine Receptors (DHPRs) in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 286, 43717–43725.

Gomes, A.V., Potter, J.D., and Szczesna-Cordary, D. (2002). The Role of Troponins in Muscle Contraction. *IUBMB Life* 54, 323–333.

González-Jamett, A.M., Baez-Matus, X., Olivares, M.J., Hinostroza, F., Guerra-Fernández, M.J., Vasquez-Navarrete, J., Bui, M.T., Guicheney, P., Romero, N.B., Bevilacqua, J.A., et al. (2017). Dynamin-2 mutations linked to Centronuclear Myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Sci. Rep.* 7, 4580.

Goonasekera, S.A., Beard, N.A., Groom, L., Kimura, T., Lyfenko, A.D., Rosenfeld, A., Marty, I., Dulhunty, A.F., and Dirksen, R.T. (2007). Triadin Binding to the C-Terminal Luminal Loop of the Ryanodine Receptor is Important for Skeletal Muscle Excitation–Contraction Coupling. *J. Gen. Physiol.* 130, 365–378.

Grabner, M., Dirksen, R.T., Suda, N., and Beam, K.G. (1999). The II-III Loop of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Is Responsible for the Bi-directional Coupling with the Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 21913–21919.

Grabs, D., Slepnev, V.I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L.C., and Camilli, P.D. (1997). The SH3 Domain of Amphiphysin Binds the Proline-rich Domain of Dynamin at a Single Site That Defines a New SH3 Binding Consensus Sequence. *J. Biol. Chem.* 272, 13419–13425.

Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A., Coronado, R., et al. (1996). Absence of the β subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the α 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13961–13966.

Grundy, D. (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology*. *J. Physiol.* 593, 2547–2549.

Gupta, V.A., Hnia, K., Smith, L.L., Gundry, S.R., McIntire, J.E., Shimazu, J., Bass, J.R., Talbot, E.A., Amoasii, L., Goldman, N.E., et al. (2013). Loss of Catalytically Inactive Lipid Phosphatase Myotubularin-related Protein 12 Impairs Myotubularin Stability and Promotes Centronuclear Myopathy in Zebrafish. *PLOS Genet.* 9, e1003583.

Gurung, R., Tan, A., Ooms, L.M., McGrath, M.J., Huysmans, R.D., Munday, A.D., Prescott, M., Whisstock, J.C., and Mitchell, C.A. (2003). Identification of a Novel Domain in Two Mammalian Inositol-polyphosphate 5-Phosphatases That Mediates Membrane Ruffle Localization. *J. Biol. Chem.* 278, 11376–11385.

- H -

Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H., and Imoto, K. (1992). Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 312, 229–235.

- Hammond, G.R.V., and Balla, T. (2015). Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 746–758.
- Harada, K., Truong, A.B., Cai, T., and Khavari, P.A. (2005). The Class II Phosphoinositide 3-Kinase C2 β Is Not Essential for Epidermal Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 11122–11130.
- Hashimoto, Y., Shirane, M., and Nakayama, K.I. (2018). TMEM55B contributes to lysosomal homeostasis and amino acid-induced mTORC1 activation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 23, 418–434.
- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., and Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 356, 441–443.
- Heinz, L.P., Kopec, W., de Groot, B.L., and Fink, R.H.A. (2018). In silico assessment of the conduction mechanism of the Ryanodine Receptor 1 reveals previously unknown exit pathways. *Sci. Rep.* 8.
- Heinzel, F.R., Bito, V., Biesmans, L., Wu, M., Detre, E., Wegner, F. von, Claus, P., Dymarkowski, S., Maes, F., Bogaert, J., et al. (2008). Remodeling of T-Tubules and Reduced Synchrony of Ca²⁺ Release in Myocytes From Chronically Ischemic Myocardium. *Circ. Res.* 102, 338–346.
- Heizmann, C.W., Berchtold, M.W., and Rowlerson, A.M. (1982). Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7243–7247.
- Henley, J.R., Krueger, E.W.A., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (1998). Dynamin-mediated Internalization of Caveolae. *J. Cell Biol.* 141, 85–99.
- Herman, G.E., Finegold, M., Zhao, W., de Gouyon, B., and Metzberg, A. (1999). Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy. *J. Pediatr.* 134, 206–214.
- Hernández-Ochoa, E.O., Olojo, R.O., Rebbeck, R.T., Dulhunty, A.F., and Schneider, M.F. (2014). β 1a490–508, a 19-Residue Peptide from C-Terminal Tail of Cav1.1 β 1a Subunit, Potentiates Voltage-Dependent Calcium Release in Adult Skeletal Muscle Fibers. *Biophys. J.* 106, 535–547.
- Hill, A.V. (1949). The onset of contraction. *Proc R Soc Lond B* 136, 242–254.
- Hille, B., Dickson, E.J., Kruse, M., Vivas, O., and Suh, B.-C. (2015). Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 844–856.
- Hnia, K., Tronchère, H., Tomczak, K.K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A.H., Payrastre, B., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2011). Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 121, 70–85.
- Hnia, K., Kretz, C., Amoasii, L., Böhm, J., Liu, X., Messaddeq, N., Qu, C.-K., and Laporte, J. (2012). Primary T-tubule and autophagy defects in the phosphoinositide phosphatase Jumpy/MTMR14 knockout mice muscle. *Adv. Biol. Regul.* 52, 98–107.
- Hodgkin, A.L., and Horowicz, P. (1960). Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol.* 153, 386–403.

Hofhuis, J., Bersch, K., Büssenschütt, R., Drzymalski, M., Liebetanz, D., Nikolaev, V.O., Wagner, S., Maier, L.S., Gärtner, J., Klinge, L., et al. (2017). Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *J Cell Sci* 130, 841–852.

Hohendahl, A., Roux, A., and Galli, V. (2016). Structural insights into the centronuclear myopathy-associated functions of BIN1 and dynamin 2. *J. Struct. Biol.* 196, 37–47.

Hong, T., Yang, H., Zhang, S.-S., Cho, H.C., Kalashnikova, M., Sun, B., Zhang, H., Bhargava, A., Grabe, M., Olgin, J., et al. (2014). Cardiac Spliced BIN1 Folds T-tubule Membrane, Controlling Ion Flux and Limiting Arrhythmia. *Nat. Med.* 20, 624–632.

Hopkins, P.M., Ellis, F.R., and Halsall, P.J. (1991). Evidence for related myopathies in exertional heat stroke and malignant hyperthermia. *Lancet Lond. Engl.* 338, 1491–1492.

Horstick, E.J., Linsley, J.W., Dowling, J.J., Hauser, M.A., McDonald, K.K., Ashley-Koch, A., Saint-Amant, L., Satish, A., Cui, W.W., Zhou, W., et al. (2013). Stac3 is a component of the excitation–contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nat. Commun.* 4, 1952.

Hossain, M.I., Iwasaki, H., Okochi, Y., Chahine, M., Higashijima, S., Nagayama, K., and Okamura, Y. (2008). Enzyme Domain Affects the Movement of the Voltage Sensor in Ascidian and Zebrafish Voltage-sensing Phosphatases. *J. Biol. Chem.* 283, 18248–18259.

Hou, T.T., Johnson, J.D., and Rall, J.A. (1991). Parvalbumin content and Ca²⁺ and Mg²⁺ dissociation rates correlated with changes in relaxation rate of frog muscle fibres. *J. Physiol.* 441, 285–304.

Hsieh, C.-M., Fukumoto, S., Layne, M.D., Maemura, K., Charles, H., Patel, A., Perrella, M.A., and Lee, M.-E. (2000). Striated Muscle Preferentially Expressed Genes α and β Are Two Serine/Threonine Protein Kinases Derived from the Same Gene as the Aortic Preferentially Expressed Gene-1. *J. Biol. Chem.* 275, 36966–36973.

Huntoon, V., Widrick, J.J., Sanchez, C., Rosen, S.M., Kutchukian, C., Cao, S., Pierson, C.R., Liu, X., Perrella, M.A., Beggs, A.H., et al. (2018). SPEG-deficient skeletal muscles exhibit abnormal triad and defective calcium handling. *Hum. Mol. Genet.*

Huxley, A.F., and Niedergerke, R. (1954). Structural Changes in Muscle During Contraction: Interference Microscopy of Living Muscle Fibres. *Nature* 173, 971–973.

Huxley, A.F., and Taylor, R.E. (1958). Local activation of striated muscle fibres. *J. Physiol.* 144, 426–441.

Huxley, H., and Hanson, J. (1954). Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature* 173, 973–976.

- I -

Idevall-Hagren, O., and De Camilli, P. (2015). Detection and manipulation of phosphoinositides. *Biochim Biophys Acta* 1851, 736–745.

Ihle, N.T., Williams, R., Chow, S., Chew, W., Berggren, M.I., Paine-Murrieta, G., Minion, D.J., Halter, R.J., Wipf, P., Abraham, R., et al. (2004). Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 763–772.

Ijuin, T., Mochizuki, Y., Fukami, K., Funaki, M., Asano, T., and Takenawa, T. (2000). Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* *275*, 10870–10875.

Ijuin, T., Yu, Y.E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., and Takenawa, T. (2008). Increased Insulin Action in SKIP Heterozygous Knockout Mice. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5184–5195.

Ikemoto, N., Antoniu, B., Kang, J.J., Meszaros, L.G., and Ronjat, M. (1991). Intravesicular calcium transient during calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 5230–5237.

Ivetac, I., Gurung, R., Hakim, S., Horan, K.A., Sheffield, D.A., Binge, L.C., Majerus, P.W., Tiganis, T., and Mitchell, C.A. (2009). Regulation of PI(3)K/Akt signalling and cellular transformation by inositol polyphosphate 4-phosphatase-1. *EMBO Rep.* *10*, 487–493.

- J -

Jacquemond, V. (1997). Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* *73*, 920–928.

Jaimovich, E., Reyes, R., Liberona, J.L., and Powell, J.A. (2000). IP₃ receptors, IP₃ transients, and nucleus-associated Ca²⁺ signals in cultured skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *278*, C998–C1010.

James, N.G., Digman, M.A., Ross, J.A., Barylko, B., Wang, L., Li, J., Chen, Y., Mueller, J.D., Gratton, E., Albanesi, J.P., et al. (2014). A mutation associated with centronuclear myopathy enhances the size and stability of dynamin 2 complexes in cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*.

Jayaraman, T., Brillantes, A.M., Timerman, A.P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Marks, A.R. (1992). FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* *267*, 9474–9477.

Jeub, M., Bitoun, M., Guicheney, P., Kappes-Horn, K., Strach, K., Druschky, K.F., Weis, J., and Fischer, D. (2008). Dynamin 2-related centronuclear myopathy: clinical, histological and genetic aspects of further patients and review of the literature. *Clin. Neuropathol.* *27*, 430–438.

Jiang, M., Zhang, M., Howren, M., Wang, Y., Tan, A., Balijepalli, R.C., Huizar, J.F., and Tseng, G.-N. (2016). JPH-2 interacts with Ca²⁺-handling proteins and ion channels in dyads: Contribution to premature ventricular contraction-induced cardiomyopathy. *Heart Rhythm* *13*, 743–752.

Jones, S.M., Howell, K.E., Henley, J.R., Cao, H., and McNiven, M.A. (1998). Role of Dynamin in the Formation of Transport Vesicles from the Trans-Golgi Network. *Science* *279*, 573–577.

Jongh, K.S.D., Warner, C., and Catterall, W.A. (1990). Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* *265*, 14738–14741.

Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., Jaimovich, E., and Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *J. Cell Sci.* *126*, 1189–1198.

Joubert, R., Vignaud, A., Le, M., Moal, C., Messaddeq, N., and Buj-Bello, A. (2013). Site-specific Mtm1 mutagenesis by an AAV-Cre vector reveals that myotubularin is essential in adult muscle. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 1856–1866.

Jungbluth, H. (2007). Central core disease. *Orphanet J. Rare Dis.* *2*, 25.

Jungbluth, H., Zhou, H., Sewry, C.A., Robb, S., Treves, S., Bitoun, M., Guicheney, P., Buj-Bello, A., Bönnemann, C., and Muntoni, F. (2007). Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscul. Disord.* *17*, 338–345.

Jungbluth, H., Treves, S., Zorzato, F., Sarkozy, A., Ochala, J., Sewry, C., Phadke, R., Gautel, M., and Muntoni, F. (2018). Congenital myopathies: disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. *Nat. Rev. Neurol.* *14*, 151–167.

Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., Elbaz, A., Heine, R., Gregg, R.G., Hogan, K., Powers, P.A., Lapie, P., Vale-Santos, J.E., and Weissenbach, J. (1994). A calcium channel mutation causing hypokalemic periodic paralysis. *Hum. Mol. Genet.* *3*, 1415–1419.

Jurkat-Rott, K., Weber, M.-A., Fauler, M., Guo, X.-H., Holzherr, B.D., Paczulla, A., Nordsborg, N., Joechle, W., and Lehmann-Horn, F. (2009). K⁺-dependent paradoxical membrane depolarization and Na⁺ overload, major and reversible contributors to weakness by ion channel leaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4036–4041.

- K -

Katso, R.M., Pardo, O.E., Palamidessi, A., Franz, C.M., Marinov, M., De Laurentiis, A., Downward, J., Scita, G., Ridley, A.J., Waterfield, M.D., et al. (2006). Phosphoinositide 3-Kinase C2 β Regulates Cytoskeletal Organization and Cell Migration via Rac-dependent Mechanisms. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3729–3744.

Kaur, G., Pinggera, A., Ortner, N.J., Lieb, A., Sinnegger-Brauns, M.J., Yarov-Yarovoy, V., Obermair, G.J., Flucher, B.E., and Striessnig, J. (2015). A Polybasic Plasma Membrane Binding Motif in the I-II Linker Stabilizes Voltage-gated CaV1.2 Calcium Channel Function. *J. Biol. Chem.* *290*, 21086–21100.

Ke, T., Gomez, C.R., Mateus, H.E., Castano, J.A., and Wang, Q.K. (2009). Novel CACNA1S mutation causes autosomal dominant hypokalemic periodic paralysis in a South American family. *J. Hum. Genet.* *54*, 660–664.

Kenniston, J.A., and Lemmon, M.A. (2010). Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J.* *29*, 3054–3067.

Kerr, J.P., Ziman, A.P., Mueller, A.L., Muriel, J.M., Kleinhans-Welte, E., Gumerson, J.D., Vogel, S.S., Ward, C.W., Roche, J.A., and Bloch, R.J. (2013). Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 20831–20836.

- Kessels, M.M., Engqvist-Goldstein, Å.E.Y., Drubin, D.G., and Qualmann, B. (2001). Mammalian Abp1, a Signal-Responsive F-Actin-Binding Protein, Links the Actin Cytoskeleton to Endocytosis via the Gtpase Dynamin. *J. Cell Biol.* *153*, 351–366.
- Kim, S.-A., Taylor, G.S., Torgersen, K.M., and Dixon, J.E. (2002). Myotubularin and MTMR2, Phosphatidylinositol 3-Phosphatases Mutated in Myotubular Myopathy and Type 4B Charcot-Marie-Tooth Disease. *J. Biol. Chem.* *277*, 4526–4531.
- Kim, S.-A., Vacratsis, P.O., Firestein, R., Cleary, M.L., and Dixon, J.E. (2003). Regulation of myotubularin-related (MTMR)2 phosphatidylinositol phosphatase by MTMR5, a catalytically inactive phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 4492–4497.
- Kirsch, W.G., Uttenweiler, D., and Fink, R.H.A. (2001). Spark- and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* *537*, 379–389.
- Kisseleva, M.V., Wilson, M.P., and Majerus, P.W. (2000). The Isolation and Characterization of a cDNA Encoding Phospholipid-specific Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase. *J. Biol. Chem.* *275*, 20110–20116.
- Klein, M.G., Cheng, H., Santana, L.F., Jiang, Y.-H., Lederer, W.J., and Schneider, M.F. (1996). Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* *379*, 455–458.
- Klein, M.G., Lacampagne, A., and Schneider, M.F. (1997). Voltage dependence of the pattern and frequency of discrete Ca²⁺ release events after brief repriming in frog skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 11061–11066.
- Kobayashi, M., Muroyama, A., and Ohizumi, Y. (1989). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *163*, 1487–1491.
- Koenig, J.H., and Ikeda, K. (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J. Neurosci.* *9*, 3844–3860.
- Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T., and Sabe, H. (2004). Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* *23*, 4413–4422.
- Kosaka, T., and Ikeda, K. (1983). Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in drosophila. *J. Neurobiol.* *14*, 207–225.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., and Rodriguez-Boulan, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat. Cell Biol.* *2*, 125–127.
- Kurebayashi, N., and Ogawa, Y. (2004). Depletion of Ca²⁺ in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca²⁺ entry into mouse skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* *533*, 185–199.
- Kurokawa, T., Takasuga, S., Sakata, S., Yamaguchi, S., Horie, S., Homma, K.J., Sasaki, T., and Okamura, Y. (2012). 3' Phosphatase activity toward phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [PI(3,4)P₂] by voltage-sensing phosphatase (VSP). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 10089–10094.

Kutchukian, C., Lo Scudato, M., Tourneur, Y., Poulard, K., Vignaud, A., Berthier, C., Allard, B., Lawlor, M.W., Buj-Bello, A., and Jacquemond, V. (2016). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca²⁺ release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 14432–14437.

Kutchukian, C., Szentesi, P., Allard, B., Trochet, D., Beuvin, M., Berthier, C., Tourneur, Y., Guicheney, P., Csernoch, L., Bitoun, M., et al. (2017). Impaired excitation-contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2R465W mouse model of centronuclear myopathy. *J. Physiol.* *595*, 7369–7382.

- L -

Lacampagne, A., Lederer, W.J., Schneider, M.F., and Klein, M.G. (1996). Repriming and activation alter the frequency of stereotyped discrete Ca²⁺ release events in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* *497*, 581–588.

Lambley, C.R., Murphy, R.M., McKenna, M.J., and Lamb, G.D. (2013). Endogenous and maximal sarcoplasmic reticulum calcium content and calsequestrin expression in type I and type II human skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* *591*, 6053–6068.

Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*.

Laporte, J., Hu, L.J., Kretz, C., Mandel, J.-L., Kioschis, P., Coy, J.F., Klauck, S.M., Poustka, A., and Dahl, N. (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* *13*, 169–175.

Laporte, J., Blondeau, F., Buj-Bello, A., Tentler, D., Kretz, C., Dahl, N., and Mandel, J.-L. (1998). Characterization of the Myotubularin Dual Specificity Phosphatase Gene Family from Yeast to Human. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1703–1712.

Laporte, J., Biancalana, V., Tanner, S.M., Kress, W., Schneider, V., Wallgren-Pettersson, C., Herger, F., Buj-Bello, A., Blondeau, F., Liechti-Gallati, S., et al. (2000). MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mutat.* *15*, 393–409.

Laporte, J., Blondeau, F., Buj-Bello, A., and Mandel, J.-L. (2001). The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism. *Trends Genet.* *17*, 221–228.

Laver, D.R., Lenz, G.K.E., and Lamb, G.D. (2001). Regulation of the calcium release channel from rabbit skeletal muscle by the nucleotides ATP, AMP, IMP and adenosine. *J. Physiol.* *537*, 763–778.

Lawlor, M.W., Armstrong, D., Viola, M.G., Widrick, J.J., Meng, H., Grange, R.W., Childers, M.K., Hsu, C.P., O’Callaghan, M., Pierson, C.R., et al. (2013). Enzyme replacement therapy rescues weakness and improves muscle pathology in mice with X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 1525–1538.

Lee, C.S., Dagnino-Acosta, A., Yarotsky, V., Hanna, A., Lyfenko, A., Knoblauch, M., Georgiou, D.K., Poché, R.A., Swank, M.W., Long, C., et al. (2015). Ca²⁺ permeation and/or binding to CaV1.1 fine-tunes skeletal muscle Ca²⁺ signaling to sustain muscle function. *Skelet. Muscle* *5*.

- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.-C., Farsad, K., Wenk, M.R., and Camilli, P.D. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle. *Science* 297, 1193–1196.
- Lee, Y.-R., Chen, M., and Pandolfi, P.P. (2018). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1.
- Lefebvre, R., Legrand, C., González-Rodríguez, E., Groom, L., Dirksen, R.T., and Jacquemond, V. (2011). Defects in Ca²⁺ release associated with local expression of pathological ryanodine receptors in mouse muscle fibres. *J. Physiol.* 589, 5361–5382.
- Lefebvre, R., Legrand, C., Groom, L., Dirksen, R.T., and Jacquemond, V. (2013). Ca²⁺ Release in Muscle Fibers Expressing R4892W and G4896V Type 1 Ryanodine Receptor Disease Mutants. *PLOS ONE* 8, e54042.
- Legrand, C., Giacomello, E., Berthier, C., Allard, B., Sorrentino, V., and Jacquemond, V. (2008). Spontaneous and voltage-activated Ca²⁺ release in adult mouse skeletal muscle fibres expressing the type 3 ryanodine receptor. *J. Physiol.* 586, 441–457.
- Lemmon, M.A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 99–111.
- Leong, P., and MacLennan, D.H. (1998). A 37-Amino Acid Sequence in the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Interacts with the Cytoplasmic Loop between Domains II and III in the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 7791–7794.
- Lewis, K.M., Ronish, L.A., Ríos, E., and Kang, C. (2015). Characterization of Two Human Skeletal Calsequestrin Mutants Implicated in Malignant Hyperthermia and Vacuolar Aggregate Myopathy. *J. Biol. Chem.* 290, 28665–28674.
- Li, F.-F., Li, Q.-Q., Tan, Z.-X., Zhang, S.-Y., Liu, J., Zhao, E., Yu, G.-C., Zhou, J., Zhang, L.-M., and Liu, S.-L. (2012). A Novel Mutation in CACNA1S Gene Associated with Hypokalemic Periodic Paralysis Which has a Gender Difference in the Penetrance. *J. Mol. Neurosci.* 46, 378–383.
- Li, L., Mirza, S., Richardson, S.J., Gallant, E.M., Thekkedam, C., Pace, S.M., Zorzato, F., Liu, D., Beard, N.A., and Dulhunty, A.F. (2015). A new cytoplasmic interaction between junctin and ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. *J. Cell Sci.* 128, 951–963.
- Li, N., Chiang, D.Y., Wang, S., Wang, Q., Sun, L., Voigt, N., Respress, J.L., Ather, S., Skapura, D.G., Jordan, V.K., et al. (2014). Ryanodine-Receptor Mediated Calcium Leak Drives Progressive Development of an Atrial Fibrillation Substrate in a Transgenic Mouse Model. *Circulation* 129, 1276–1285.
- Li, X., Wang, X., Zhang, X., Zhao, M., Tsang, W.L., Zhang, Y., Yau, R.G.W., Weisman, L.S., and Xu, H. (2013). Genetically encoded fluorescent probe to visualize intracellular phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate localization and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 21165–21170.
- Lin, H.C., Barylko, B., Achiriloaie, M., and Albanesi, J.P. (1997). Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate-dependent Activation of Dynamins I and II Lacking the Proline/Arginine-rich Domains. *J. Biol. Chem.* 272, 25999–26004.

Lindinger, M.I., Heigenhauser, G.J., McKelvie, R.S., and Jones, N.L. (1992). Blood ion regulation during repeated maximal exercise and recovery in humans. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 262, R126–R136.

Liou, J., Kim, M.L., Do Heo, W., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., and Meyer, T. (2005). STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Curr. Biol.* 15, 1235–1241.

Liu, Y.-W., Surka, M.C., Schroeter, T., Lukiyanchuk, V., and Schmid, S.L. (2008). Isoform and Splice-Variant Specific Functions of Dynamin-2 Revealed by Analysis of Conditional Knock-Out Cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 5347–5359.

Logothetis, D.E., Petrou, V.I., Adney, S.K., and Mahajan, R. (2010). Channelopathies linked to plasma membrane phosphoinositides. *Pflugers Arch.* 460, 321–341.

Louch, W.E., Mørk, H.K., Sexton, J., Strømme, T.A., Laake, P., Sjaastad, I., and Sejersted, O.M. (2006). T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *J. Physiol.* 574, 519–533.

Löw, C., Weininger, U., Lee, H., Schweimer, K., Neundorf, I., Beck-Sickingler, A.G., Pastor, R.W., and Balbach, J. (2008). Structure and Dynamics of Helix-0 of the N-BAR Domain in Lipid Micelles and Bilayers. *Biophys. J.* 95, 4315–4323.

Loy, R.E., Orynbayev, M., Xu, L., Andronache, Z., Apostol, S., Zvaritch, E., MacLennan, D.H., Meissner, G., Melzer, W., and Dirksen, R.T. (2011). Muscle weakness in Ryr1I4895T/WT knock-in mice as a result of reduced ryanodine receptor Ca²⁺ ion permeation and release from the sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 137, 43–57.

Lu, N., Shen, Q., Mahoney, T.R., Neukomm, L.J., Wang, Y., and Zhou, Z. (2012). Two PI 3-Kinases and One PI 3-Phosphatase Together Establish the Cyclic Waves of Phagosomal PtdIns(3)P Critical for the Degradation of Apoptotic Cells. *PLOS Biol.* 10, e1001245.

Ludtke, S.J., Serysheva, I.I., Hamilton, S.L., and Chiu, W. (2005). The Pore Structure of the Closed RyR1 Channel. *Struct. Lond. Engl.* 1993 13, 1203–1211.

Lytton, J. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem. J.* 406, 365–382.

- M -

Ma, J. (1993). Block by ruthenium red of the ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 102, 1031–1056.

MacKenzie, A.E., Korneluk, R.G., Zorzato, F., Fujii, J., Phillips, M., Iles, D., Wieringa, B., Leblond, S., Bailly, J., Willard, H.F., et al. (1990). The human ryanodine receptor gene: Its mapping to 19q13.1, placement in a chromosome 19 linkage group, and exclusion as the gene causing myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 1082–1089.

- MacLennan, D.H., and Wong, P.T.S. (1971). Isolation of a Calcium-Sequestering Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 1231–1235.
- Maffucci, T., and Falasca, M. (2014). New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 1378–1382.
- Maier, O., Knoblich, M., and Westermann, P. (1996). Dynamin II Binds to the Trans-Golgi Network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *223*, 229–233.
- Majerus, P.W., Kisseleva, M.V., and Norris, F.A. (1999). The Role of Phosphatases in Inositol Signaling Reactions. *J. Biol. Chem.* *274*, 10669–10672.
- Marty, I. (2015). Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J. Physiol.* *593*, 3261–3266.
- Marty, I., and Fauré, J. (2016). Excitation-Contraction Coupling Alterations in Myopathies. *J. Neuromuscul. Dis.* *3*, 443–453.
- 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. U. S. A.* *91*, 2270–2274.
- Marx, S.O., Ondrias, K., and Marks, A.R. (1998). Coupled Gating Between Individual Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channels (Ryanodine Receptors). *Science* *281*, 818–821.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Roseblit, N., and Marks, A.R. (2000). PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts. *Cell* *101*, 365–376.
- Matecki, S., Dridi, H., Jung, B., Saint, N., Reiken, S.R., Scheuermann, V., Mrozek, S., Santulli, G., Umanskaya, A., Petrof, B.J., et al. (2016). Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic weakness during mechanical ventilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 9069–9074.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.* *11*, 385–396.
- McCrea, H.J., and De Camilli, P. (2009). Mutations in Phosphoinositide Metabolizing Enzymes and Human Disease. *Physiol. Bethesda Md* *24*, 8–16.
- McEntagart, M., Parsons, G., Buj-Bello, A., Biancalana, V., Fenton, I., Little, M., Krawczak, M., Thomas, N., Herman, G., Clarke, A., et al. (2002). Genotype–phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul. Disord.* *12*, 939–946.
- Mei, Y., Xu, L., Mowrey, D.D., Giraldez, R.M., Wang, Y., Pasek, D.A., Dokholyan, N.V., and Meissner, G. (2015). Channel Gating Dependence on Pore Lining Helix Glycine Residues in Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* *290*, 17535–17545.
- Meissner, G. (1984). Adenine nucleotide stimulation of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *259*, 2365–2374.
- Meissner, G. (2017). The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J. Gen. Physiol.* *149*, 1065–1089.

Meissner, G., Darling, E., and Eveleth, J. (1986). Kinetics of rapid calcium release by sarcoplasmic reticulum. Effects of calcium, magnesium, and adenine nucleotides. *Biochemistry (Mosc.)* *25*, 236–244.

Miller, S., Tavshanjian, B., Oleksy, A., Perisic, O., Houseman, B.T., Shokat, K.M., and Williams, R.L. (2010). Shaping Development of Autophagy Inhibitors with the Structure of the Lipid Kinase Vps34. *Science* *327*, 1638–1642.

Mochizuki, Y., and Majerus, P.W. (2003). Characterization of myotubularin-related protein 7 and its binding partner, myotubularin-related protein 9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 9768–9773.

Monnier, N., Procaccio, V., Stieglitz, P., and Lunardi, J. (1997). Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 1316–1325.

Mooren, O.L., Kotova, T.I., Moore, A.J., and Schafer, D.A. (2009). Dynamin2 GTPase and Cortactin Remodel Actin Filaments. *J. Biol. Chem.* *284*, 23995–24005.

Morioka, S., Nigorikawa, K., Okada, E., Tanaka, Y., Kasuu, Y., Yamada, M., Kofuji, S., Takasuga, S., Nakanishi, H., Sasaki, T., et al. (2018). TMEM55a localizes to macrophage phagosomes to downregulate phagocytosis. *J Cell Sci* *131*, jcs213272.

Muller, A.J., Baker, J.F., DuHadaway, J.B., Ge, K., Farmer, G., Donover, P.S., Meade, R., Reid, C., Grzanna, R., Roach, A.H., et al. (2003). Targeted Disruption of the Murine Bin1/Amphiphysin II Gene Does Not Disable Endocytosis but Results in Embryonic Cardiomyopathy with Aberrant Myofibril Formation. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 4295–4306.

Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., and Okamura, Y. (2005). Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* *435*, 1239–1243.

Murray, J.T., Panaretou, C., Stenmark, H., Miaczynska, M., and Backer, J.M. (2002). Role of Rab5 in the Recruitment of hVps34/p150 to the Early Endosome. *Traffic* *3*, 416–427.

- N -

Nakada, T., Kashihara, T., Komatsu, M., Kojima, K., Takeshita, T., and Yamada, M. (2018). Physical interaction of junctophilin and the CaV1.1 C terminus is crucial for skeletal muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 4507–4512.

Nakai, J., Imagawa, T., Hakamat, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., and Numa, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett.* *271*, 169–177.

Nakai, J., Dirksen, R.T., Nguyen, H.T., Pessah, I.N., Beam, K.G., and Allen, P.D. (1996). Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* *380*, 72–75.

Nandurkar, H.H., Layton, M., Laporte, J., Selan, C., Corcoran, L., Caldwell, K.K., Mochizuki, Y., Majerus, P.W., and Mitchell, C.A. (2003). Identification of myotubularin as the lipid phosphatase catalytic subunit associated with the 3-phosphatase adapter protein, 3-PAP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 8660–8665.

Nasuhoglu, C., Feng, S., Mao, Y., Shammatt, I., Yamamoto, M., Earnest, S., Lemmon, M., and Hilgemann, D.W. (2002). Modulation of cardiac PIP2 by cardioactive hormones and other physiologically relevant interventions. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *283*, C223–C234.

Negorev, D., Riethman, H., Wechsler-Reya, R., Sakamuro, D., Prendergast, G.C., and Simon, D. (1996). The Bin1 Gene Localizes to Human Chromosome 2q14 by PCR Analysis of Somatic Cell Hybrids and Fluorescence in Situ Hybridization. *Genomics* *33*, 329–331.

Nelson, B.R., Wu, F., Liu, Y., Anderson, D.M., McAnally, J., Lin, W., Cannon, S.C., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Skeletal muscle-specific T-tubule protein STAC3 mediates voltage-induced Ca²⁺ release and contractility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 11881–11886.

Nemoto, Y., Kearns, B.G., Wenk, M.R., Chen, H., Mori, K., Alb, J.G., Camilli, P.D., and Bankaitis, V.A. (2000). Functional Characterization of a Mammalian Sac1 and Mutants Exhibiting Substrate-specific Defects in Phosphoinositide Phosphatase Activity. *J. Biol. Chem.* *275*, 34293–34305.

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.

Niu, J., Yang, W., Yue, D.T., Inoue, T., and Ben-Johny, M. (2018). Duplex signaling by CaM and Stac3 enhances CaV1.1 function and provides insights into congenital myopathy. *J. Gen. Physiol.* *jgp.201812005*.

- O -

Obermair, G.J., Kugler, G., Baumgartner, S., Tuluc, P., Grabner, M., and Flucher, B.E. (2005). The Ca²⁺ Channel $\alpha 2\delta$ -1 Subunit Determines Ca²⁺ Current Kinetics in Skeletal Muscle but Not Targeting of $\alpha 1S$ or Excitation-Contraction Coupling. *J. Biol. Chem.* *280*, 2229–2237.

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.

Ogawa, Y., and Harafuji, H. (1989). Ca-Release by Phosphoinositides from Sarcoplasmic Reticulum of Frog Skeletal Muscle. *J. Biochem. (Tokyo)* *106*, 864–867.

Ogawa, Y., Kurebayashi, N., and Murayama, T. (1999). Ryanodine receptor isoforms in excitation-contraction coupling. *Adv. Biophys.* *36*, 27–64.

Ohizumi, Y., Hirata, Y., Suzuki, A., and Kobayashi, M. (1999). Two novel types of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *77*, 276–285.

Ohta, T., Ohmichi, M., Hayasaka, T., Mabuchi, S., Saitoh, M., Kawagoe, J., Takahashi, K., Igarashi, H., Du, B., Doshida, M., et al. (2006). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in vivo ovarian cancer models. *Endocrinology* *147*, 1761–1769.

van Oort, R.J., Garbino, A., Wang, W., Dixit, S.S., Landstrom, A.P., Gaur, N., De Almeida, A.C., Skapura, D.G., Rudy, Y., Burns, A.R., et al. (2011). Disrupted Junctional Membrane Complexes and Hyperactive Ryanodine Receptors Following Acute Junctophilin Knockdown in Mice. *Circulation* *123*, 979–988.

Ostwald, T.J., and MacLennan, D.H. (1974). Isolation of a High Affinity Calcium-binding Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* *249*, 974–979.

Otsu, K., Nishida, K., Kimura, Y., Kuzuya, T., Hori, M., Kamada, T., and Tada, M. (1994). The point mutation Arg615-->Cys in the Ca²⁺ release channel of skeletal sarcoplasmic reticulum is responsible for hypersensitivity to caffeine and halothane in malignant hyperthermia. *J. Biol. Chem.* *269*, 9413–9415.

- P -

Paolini, C., Protasi, F., and Franzini-Armstrong, C. (2004). The Relative Position of RyR Feet and DHPR Tetrads in Skeletal Muscle. *J. Mol. Biol.* *342*, 145–153.

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.

Paolini, C., Quarta, M., Wei-LaPierre, L., Michelucci, A., Nori, A., Reggiani, C., Dirksen, R.T., and Protasi, F. (2015). Oxidative stress, mitochondrial damage, and cores in muscle from calsequestrin-1 knockout mice. *Skelet. Muscle* *5*.

Papayannopoulos, V., Co, C., Prehoda, K.E., Snapper, S., Taunton, J., and Lim, W.A. (2005). A Polybasic Motif Allows N-WASP to Act as a Sensor of PIP2 Density. *Mol. Cell* *17*, 181–191.

Parrish, W.R., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2004). Essential Role for the Myotubularin-related Phosphatase Ymr1p and the Synaptojanin-like Phosphatases Sjl2p and Sjl3p in Regulation of Phosphatidylinositol 3-Phosphate in Yeast. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3567–3579.

Paul-Pletzer, K., Yamamoto, T., Bhat, M.B., Ma, J., Ikemoto, N., Jimenez, L.S., Morimoto, H., Williams, P.G., and Parnes, J. (2002). Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* *277*, 34918–34923.

Perálvarez-Marín, A., Tae, H., Board, P.G., Casarotto, M.G., Dulhunty, A.F., and Samsó, M. (2011). 3D Mapping of the SPRY2 Domain of Ryanodine Receptor 1 by Single-Particle Cryo-EM. *PLOS ONE* *6*, e25813.

Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430–442.

Perni, S., Close, M., and Franzini-Armstrong, C. (2013). Novel Details of Calsequestrin Gel Conformation in Situ. *J. Biol. Chem.* 288, 31358–31362.

Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* 303, 495–499.

Phimister, A.J., Lango, J., Lee, E.H., Ernst-Russell, M.A., Takeshima, H., Ma, J., Allen, P.D., and Pessah, I.N. (2007). Conformation-dependent Stability of Junctophilin 1 (JP1) and Ryanodine Receptor Type 1 (RyR1) Channel Complex Is Mediated by Their Hyper-reactive Thiols. *J. Biol. Chem.* 282, 8667–8677.

Picas, L., Viaud, J., Schauer, K., Vanni, S., Hnia, K., Fraissier, V., Roux, A., Bassereau, P., Gaits-Iacovoni, F., Payrastre, B., et al. (2014). BIN1/M-Amphiphysin2 induces clustering of phosphoinositides to recruit its downstream partner dynamin. *Nat. Commun.* 5, 5647.

Pierson, C.R., Dulin-Smith, A.N., Durban, A.N., Marshall, M.L., Marshall, J.T., Snyder, A.D., Naiyer, N., Gladman, J.T., Chandler, D.S., Lawlor, M.W., et al. (2012). Modeling the human MTM1 p.R69C mutation in murine Mtm1 results in exon 4 skipping and a less severe myotubular myopathy phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 21, 811–825.

Polster, A., Perni, S., Bichraoui, H., and Beam, K.G. (2015). Stac adaptor proteins regulate trafficking and function of muscle and neuronal L-type Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 602–606.

Pouvreau, S., Allard, B., Berthier, C., and Jacquemond, V. (2004). Control of intracellular calcium in the presence of nitric oxide donors in isolated skeletal muscle fibres from mouse. *J. Physiol.* 560, 779–794.

Pouvreau, S., Royer, L., Yi, J., Brum, G., Meissner, G., Ríos, E., and Zhou, J. (2007). Ca²⁺ sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5235–5240.

Prakriya, M., and Lewis, R.S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 95, 1383–1436.

Protasi, F., Paolini, C., Canato, M., Reggiani, C., and Quarta, M. (2011). Lessons from calsequestrin-1 ablation in vivo: much more than a Ca²⁺ buffer after all. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 32, 257–270.

Ptáček, L.J., Tawil, R., Griggs, R.C., Engel, A.G., Layzer, R.B., Kwieciński, H., McManis, P.G., Santiago, L., Moore, M., and Fouad, G. (1994). Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 77, 863–868.

- R -

Raess, M.A., Friant, S., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2017a). WANTED – Dead or alive: Myotubularins, a large disease-associated protein family. *Adv. Biol. Regul.* 63, 49–58.

Raess, M.A., Cowling, B.S., Bertazzi, D.L., Kretz, C., Rinaldi, B., Xuereb, J.-M., Kessler, P., Romero, N.B., Payraastre, B., Friant, S., et al. (2017b). Expression of the neuropathy-associated MTMR2 gene rescues MTM1-associated myopathy. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 3736–3748.

Rakowski, R.F., Best, P.M., and James-Kracke, M.R. (1985). Voltage dependence of membrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *6*, 403–433.

Raymackers, J.M., Gailly, P., Schoor, M.C.-V., Pette, D., Schwaller, B., Hunziker, W., Celio, M.R., and Gillis, J.M. (2000). Tetanus relaxation of fast skeletal muscles of the mouse made parvalbumin deficient by gene inactivation. *J. Physiol.* *527*, 355–364.

Razzaq, A., Robinson, I.M., McMahon, H.T., Skepper, J.N., Su, Y., Zelhof, A.C., Jackson, A.P., Gay, N.J., and O’Kane, C.J. (2001). Amphiphysin is necessary for organization of the excitation–contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* *15*, 2967–2979.

Rebeck, R.T., Karunasekara, Y., Gallant, E.M., Board, P.G., Beard, N.A., Casarotto, M.G., and Dulhunty, A.F. (2011). The β 1a Subunit of the Skeletal DHPR Binds to Skeletal RyR1 and Activates the Channel via Its 35-Residue C-Terminal Tail. *Biophys. J.* *100*, 922–930.

Reddish, F.N., Miller, C.L., Gorkhali, R., and Yang, J.J. (2017). Calcium Dynamics Mediated by the Endoplasmic/Sarcoplasmic Reticulum and Related Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.

Reifler, A., Li, X., Archambeau, A.J., McDade, J.R., Sabha, N., Michele, D.E., and Dowling, J.J. (2014). Conditional knockout of *pik3c3* causes a murine muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* *184*, 1819–1830.

Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S.E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Roseblit, N., et al. (2003). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *160*, 919–928.

Reubold, T.F., Faelber, K., Plattner, N., Posor, Y., Ketel, K., Curth, U., Schlegel, J., Anand, R., Manstein, D.J., Noé, F., et al. (2015). Crystal structure of the dynamin tetramer. *Nature* *525*, 404–408.

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.

Ríos, E. (2018). Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *J. Gen. Physiol.* *150*, 521–537.

Rios, E., and Brum, G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation–contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* *325*, 717–720.

Rios, E., and Pizarro, G. (1988). Voltage Sensors and Calcium Channels of Excitation-Contraction Coupling. *Physiology*.

Ríos, E., Pizarro, G., and Stefani, E. (1992). Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* *54*, 109–133.

Robb, S.A., Sewry, C.A., Dowling, J.J., Feng, L., Cullup, T., Lillis, S., Abbs, S., Lees, M.M., Laporte, J., Manzur, A.Y., et al. (2011). Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies. *Neuromuscul. Disord.* *21*, 379–386.

- Robin, G., and Allard, B. (2015). Voltage-gated Ca²⁺ influx through L-type channels contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in skeletal muscle. *J. Physiol.* *593*, 4781–4797.
- Robinson, F.L., and Dixon, J.E. (2006). Myotubularin phosphatases: policing 3-phosphoinositides. *Trends Cell Biol.* *16*, 403–412.
- Robinson, F.L., Niesman, I.R., Beiswenger, K.K., and Dixon, J.E. (2008). Loss of the inactive myotubularin-related phosphatase Mtmr13 leads to a Charcot–Marie–Tooth 4B2-like peripheral neuropathy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 4916–4921.
- Rodgers, S.J., Ferguson, D.T., Mitchell, C.A., and Ooms, L.M. (2017). Regulation of PI3K effector signalling in cancer by the phosphoinositide phosphatases. *Biosci. Rep.* *37*, BSR20160432.
- Rodríguez, E.G., Lefebvre, R., Bodnár, D., Legrand, C., Szentesi, P., Vincze, J., Poulard, K., Bertrand-Michel, J., Csernoch, L., Buj-Bello, A., et al. (2014). Phosphoinositide substrates of myotubularin affect voltage-activated Ca²⁺ release in skeletal muscle. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *466*, 973–985.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* *370*, 527–532.
- Romero, N.B. (2010). Centronuclear myopathies: A widening concept. *Neuromuscul. Disord.* *20*, 223–228.
- Romero, N.B., and Bitoun, M. (2011). Centronuclear Myopathies. *Semin. Pediatr. Neurol.* *18*, 250–256.
- Rommel, C., Camps, M., and Ji, H. (2007). PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 191–201.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., et al. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* *169*, 435–445.
- Rossi, D., Vezzani, B., Galli, L., Paolini, C., Toniolo, L., Pierantozzi, E., Spinozzi, S., Barone, V., Pegoraro, E., Bello, L., et al. (2014). A mutation in the CASQ1 gene causes a vacuolar myopathy with accumulation of sarcoplasmic reticulum protein aggregates. *Hum. Mutat.* *35*, 1163–1170.
- Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q.-Y., and Meissner, G. (1988). Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* *267*, 75–86.
- Rousset, M., Cens, T., Gouin-Charnet, A., Scamps, F., and Charnet, P. (2004). Ca²⁺ and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Stabilize a G β -sensitive State of CaV2 Ca²⁺ Channels. *J. Biol. Chem.* *279*, 14619–14630.
- Royer, B., Hnia, K., Gavriilidis, C., Tronchère, H., Tosch, V., and Laporte, J. (2013). The myotubularin–amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep.* *14*, 907–915.
- Royer, L., Pouvreau, S., and Ríos, E. (2008). Evolution and modulation of intracellular calcium release during long-lasting, depleting depolarization in mouse muscle. *J. Physiol.* *586*, 4609–4629.

Rüdel, R., Lehmann-Horn, F., Ricker, K., and Küther, G. (1984). Hypokalemic periodic paralysis: in vitro investigation of muscle fiber membrane parameters. *Muscle Nerve* 7, 110–120.

- S -

Sabha, N., Volpatti, J.R., Gonorazky, H., Reifler, A., Davidson, A.E., Li, X., Eltayeb, N.M., Dall'Armi, C., Di Paolo, G., Brooks, S.V., et al. (2016). PIK3C2B inhibition improves function and prolongs survival in myotubular myopathy animal models. *J. Clin. Invest.* 126, 3613–3625.

Sakata, S., Hossain, M.I., and Okamura, Y. (2011). Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. *J. Physiol.* 589, 2687–2705.

Salviati, G., Betto, R., Danieli Betto, D., and Zeviani, M. (1984). Myofibrillar-protein isoforms and sarcoplasmic-reticulum Ca²⁺-transport activity of single human muscle fibres. *Biochem. J.* 224, 215–225.

Samsó, M. (2017). A guide to the 3D structure of the ryanodine receptor type 1 by cryoEM. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 26, 52–68.

Samsó, M., Wagenknecht, T., and Allen, P. (2005). Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 539–544.

Samsó, M., Shen, X., and Allen, P.D. (2006). Structural Characterization of the RyR1–FKBP12 Interaction. *J. Mol. Biol.* 356, 917–927.

Samsó, M., Feng, W., Pessah, I.N., and Allen, P.D. (2009). Coordinated Movement of Cytoplasmic and Transmembrane Domains of RyR1 upon Gating. *PLOS Biol.* 7, e1000085.

Schafer, D.A., Weed, S.A., Binns, D., Karginov, A.V., Parsons, J.T., and Cooper, J.A. (2002). Dynamin2 and Cortactin Regulate Actin Assembly and Filament Organization. *Curr. Biol.* 12, 1852–1857.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol. Rev.*

Schmid, A.C., Wise, H.M., Mitchell, C.A., Nussbaum, R., and Woscholski, R. (2004). Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Lett.* 576, 9–13.

Schneider, M.F. (1999). Ca²⁺ Sparks in Frog Skeletal Muscle: Generation by One, Some, or Many SR Ca²⁺ Release Channels? *J. Gen. Physiol.* 113, 365–372.

Schneider, M.F., and Chandler, W.K. (1973). Voltage Dependent Charge Movement in Skeletal Muscle: a Possible Step in Excitation–Contraction Coupling. *Nature* 242, 244–246.

Schredelseker, J., Shrivastav, M., Dayal, A., and Grabner, M. (2010). Non–Ca²⁺-conducting Ca²⁺ channels in fish skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5658.

- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., and Emr, S.D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88–91.
- Schwaller, B., Dick, J., Dhoot, G., Carroll, S., Vrbova, G., Nicotera, P., Pette, D., Wyss, A., Bluethmann, H., Hunziker, W., et al. (1999). Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am. J. Physiol.* 276, C395-403.
- Senderek, J., Bergmann, C., Weber, S., Ketelsen, U.-P., Schorle, H., Rudnik-Schöneborn, S., Büttner, R., Buchheim, E., and Zerres, K. (2003). Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum. Mol. Genet.* 12, 349–356.
- Sewry, C.A., and Wallgren-Pettersson, C. (2017). Myopathology in congenital myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 43, 5–23.
- Shen, J., Yu, W.-M., Brotto, M., Scherman, J.A., Guo, C., Stoddard, C., Nosek, T.M., Valdivia, H.H., and Qu, C.-K. (2009). Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca²⁺ homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 11, 769–776.
- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J.R., Jones, L.R., Kobayashi, Y.M., Wang, Y., Kerrick, W.G.L., Caswell, A.H., Potter, J.D., Miller, T., et al. (2007). Triadins Modulate Intracellular Ca²⁺ Homeostasis but Are Not Essential for Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 282, 37864–37874.
- Shirokova, N., García, J., and Ríos, E. (1998). Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 512, 377–384.
- Shirokova, N., Shirokov, R., Rossi, D., González, A., Kirsch, W.G., García, J., Sorrentino, V., and Ríos, E. (1999). Spatially segregated control of Ca²⁺ release in developing skeletal muscle of mice. *J. Physiol.* 521, 483–495.
- Shomer, N.H., Mickelson, J.R., and Louis, C.F. (1994). Caffeine stimulation of malignant hyperthermia-susceptible sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 267, C1253–C1261.
- Smirnova, E., Shurland, D.-L., Newman-Smith, E.D., Pishvae, B., and Blied, A.M. van der (1999). A Model for Dynamin Self-assembly Based on Binding Between Three Different Protein Domains. *J. Biol. Chem.* 274, 14942–14947.
- Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1985). Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels. *Nature* 316, 446–449.
- Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca²⁺ and ATP and modulation by Mg²⁺. *J. Gen. Physiol.* 88, 573–588.
- Smith, L.L., Gupta, V.A., and Beggs, A.H. (2014). Bridging integrator 1 (Bin1) deficiency in zebrafish results in centronuclear myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3566–3578.

- Sokolow, S., Manto, M., Gailly, P., Molgó, J., Vandebrouck, C., Vanderwinden, J.-M., Herchuelz, A., and Schurmans, S. (2004). Impaired neuromuscular transmission and skeletal muscle fiber necrosis in mice lacking Na/Ca exchanger 3. *J. Clin. Invest.* *113*, 265–273.
- Song, L.-S., Sobie, E.A., McCulle, S., Lederer, W.J., Balke, C.W., and Cheng, H. (2006). Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 4305–4310.
- Stack, J.H., and Emr, S.D. (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J. Biol. Chem.* *269*, 31552–31562.
- Stamm, D.S., Aylsworth, A.S., Stajich, J.M., Kahler, S.G., Thorne, L.B., Speer, M.C., and Powell, C.M. (2008). Native American myopathy: Congenital myopathy with cleft palate, skeletal anomalies, and susceptibility to malignant hyperthermia. *Am. J. Med. Genet. A.* *146A*, 1832–1841.
- Stange, M., Xu, L., Balshaw, D., Yamaguchi, N., and Meissner, G. (2003). Characterization of Recombinant Skeletal Muscle (Ser-2843) and Cardiac Muscle (Ser-2809) Ryanodine Receptor Phosphorylation Mutants. *J. Biol. Chem.* *278*, 51693–51702.
- Stern, M.D., Pizarro, G., and Ríos, E. (1997). Local Control Model of Excitation–Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* *110*, 415–440.
- Stienen, G.J., Blangé, T., and Treijtel, B.W. (1985). Tension development and calcium sensitivity in skinned muscle fibres of the frog. *Pflugers Arch.* *405*, 19–23.
- Suh, B.-C., and Hille, B. (2008). PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? *Annu. Rev. Biophys.* *37*, 175–195.
- Suko, J., Maurer-Fogy, I., Plank, B., Bertel, O., Wyskovsky, W., Hohenegger, M., and Hellmann, G. (1993). Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor-calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1175*, 193–206.
- Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2001). Classes of Thiols That Influence the Activity of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel. *J. Biol. Chem.* *276*, 15625–15630.
- Sweeney, H.L., and Hammers, D.W. (2018). Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *10*, a023200.
- Sweitzer, S.M., and Hinshaw, J.E. (1998). Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation. *Cell* *93*, 1021–1029.
- Szabó, L.Z., Vincze, J., Csernoch, L., and Szentesi, P. (2010). Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *J. Theor. Biol.* *264*, 1279–1292.
- Szentesi, P., Collet, C., Sárközi, S., Szegedi, C., Jona, I., Jacquemond, V., Kovács, L., and Csernoch, L. (2001). Effects of Dantrolene on Steps of Excitation-Contraction Coupling in Mammalian Skeletal Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* *118*, 355–376.
- Szpyt, J., Lorenzon, N., Perez, C.F., Norris, E., Allen, P.D., Beam, K.G., and Samsó, M. (2012). Three-Dimensional Localization of the α and β Subunits and of the II-III Loop in the Skeletal Muscle L-type Ca²⁺ Channel. *J. Biol. Chem.* *287*, 43853–43861.

- Tadini-Buoninsegni, F., Smeazzetto, S., Gualdani, R., and Moncelli, M.R. (2018). Drug Interactions With the Ca²⁺-ATPase From Sarco(Endo)Plasmic Reticulum (SERCA). *Front. Mol. Biosci.* 5.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L., and Camilli, P.D. (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-γS in nerve terminals. *Nature* 374, 186–190.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V., and Camilli, P.D. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 1, 33–39.
- Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., et al. (1989). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339, 439–445.
- Takeshima, H., Lino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H., and Noda, T. (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369, 556–559.
- 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.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A., and Numa, S. (1988). Restoration of excitation–contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336, 134–139.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Adams, B.A., Niidome, T., and Numa, S. (1990). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation–contraction coupling. *Nature* 346, 567–569.
- Tasfaout, H., Buono, S., Guo, S., Kretz, C., Messaddeq, N., Booten, S., Greenlee, S., Monia, B.P., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2017). Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat. Commun.* 8, 15661.
- Taylor, G.S., Maehama, T., and Dixon, J.E. (2000). Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8910–8915.
- Teranishi, F., Takahashi, N., Gao, N., Akamo, Y., Takeyama, H., Manabe, T., and Okamoto, T. (2009). Phosphoinositide 3-kinase inhibitor (wortmannin) inhibits pancreatic cancer cell motility and migration induced by hyaluronan in vitro and peritoneal metastasis in vivo. *Cancer Sci.* 100, 770–777.
- The European Malignant Hyperpyrexia Group (1984). A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br. J. Anaesth.* 56, 1267–1269.
- Therrien, C., Di Fulvio, S., Pickles, S., and Sinnreich, M. (2009). Characterization of Lipid Binding Specificities of Dysferlin C2 Domains Reveals Novel Interactions with Phosphoinositides. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 2377–2384.

Tian, X., Liu, Y., Liu, Y., Wang, R., Wagenknecht, T., Liu, Z., and Chen, S.R.W. (2013). Ligand-dependent Conformational Changes in the Clamp Region of the Cardiac Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 4066–4075.

Tjondrokoesoemo, A., Park, K.H., Ferrante, C., Komazaki, S., Lesniak, S., Brotto, M., Ko, J.-K., Zhou, J., Weisleder, N., and Ma, J. (2011). Disrupted membrane structure and intracellular Ca²⁺ signaling in adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS One* 6, e25740.

Tjondrokoesoemo, A., Li, N., Lin, P.-H., Pan, Z., Ferrante, C.J., Shirokova, N., Brotto, M., Weisleder, N., and Ma, J. (2013). Type 1 Inositol (1,4,5)-Trisphosphate Receptor Activates Ryanodine Receptor 1 to Mediate Calcium Spark Signaling in Adult Mammalian Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 288, 2103–2109.

Tong, J., Oyamada, H., Demarex, N., Grinstein, S., McCarthy, T.V., and MacLennan, D.H. (1997). Caffeine and Halothane Sensitivity of Intracellular Ca²⁺ Release Is Altered by 15 Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Mutations Associated with Malignant Hyperthermia and/or Central Core Disease. *J. Biol. Chem.* 272, 26332–26339.

Topel, D.G., Bicknell, E.J., Preston, K.S., Christian, L.L., and Matsushima, C.Y. (1968). Porcine stress syndrome. *Mod. Vet. Pract.* 49, 40.

Tosch, V., Rohde, H.M., Tronchère, H., Zanoteli, E., Monroy, N., Kretz, C., Dondaine, N., Payrastre, B., Mandel, J.-L., and Laporte, J. (2006). A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂ phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3098–3106.

Tronchère, H., Laporte, J., Pendaries, C., Chaussade, C., Liaubet, L., Pirola, L., Mandel, J.-L., and Payrastre, B. (2004). Production of Phosphatidylinositol 5-Phosphate by the Phosphoinositide 3-Phosphatase Myotubularin in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 7304–7312.

Tsugorka, A., Rios, E., and Blatter, L.A. (1995). Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269, 1723–1726.

Tsujita, K., Itoh, T., Ijuin, T., Yamamoto, A., Shisheva, A., Laporte, J., and Takenawa, T. (2004). Myotubularin Regulates the Function of the Late Endosome through the GRAM Domain-Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Interaction. *J. Biol. Chem.* 279, 13817–13824.

- U - V -

Ungewickell, A., Hugge, C., Kisseleva, M., Chang, S.-C., Zou, J., Feng, Y., Galyov, E.E., Wilson, M., and Majerus, P.W. (2005). The identification and characterization of two phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 4-phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18854–18859.

Van der Blik, A.M., and Meyerowitz, E.M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Nature* 351, 411–414.

Van Petegem, F. (2015). Ryanodine Receptors: Allosteric Ion Channel Giants. *J. Mol. Biol.* 427, 31–53.

Velichkova, M., Juan, J., Kadandale, P., Jean, S., Ribeiro, I., Raman, V., Stefan, C., and Kiger, A.A. (2010). *Drosophila* Mtm and class II PI3K coregulate a PI(3)P pool with cortical and endolysosomal functions. *J. Cell Biol.* 190, 407–425.

Venot, Q., Blanc, T., Rabia, S.H., Berteloot, L., Ladraa, S., Duong, J.-P., Blanc, E., Johnson, S.C., Huguin, C., Boccara, O., et al. (2018). Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Nature* 558, 540–546.

Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R.A., Tosch, V., Delgado, M.A., Proikas-Cezanne, T., Laporte, J., and Deretic, V. (2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. *EMBO J.* 28, 2244–2258.

Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., et al. (2006). CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science* 312, 1220–1223.

- W -

Wang, L., Barylko, B., Byers, C., Ross, J.A., Jameson, D.M., and Albanesi, J.P. (2010). Dynamin 2 Mutants Linked to Centronuclear Myopathies Form Abnormally Stable Polymers. *J. Biol. Chem.* 285, 22753–22757.

Wang, Q., Liu, M., Xu, C., Tang, Z., Liao, Y., Du, R., Li, W., Wu, X., Wang, X., Liu, P., et al. (2005). Novel CACNA1S mutation causes autosomal dominant hypokalemic periodic paralysis in a Chinese family. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 83, 203–208.

Wang, S., Trumble, W.R., Liao, H., Wesson, C.R., Dunker, A.K., and Kang, C.H. (1998). Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat. Struct. Biol.* 5, 476–483.

Wang, Y., Li, X., Duan, H., Fulton, T.R., Eu, J.P., and Meissner, G. (2009). Altered stored calcium release in skeletal myotubes deficient of triadin and junctin. *Cell Calcium* 45, 29–37.

Ward, C.W., Schneider, M.F., Castillo, D., Protasi, F., Wang, Y., Wayne Chen, S.R., and Allen, P.D. (2000). Expression of ryanodine receptor RyR3 produces Ca²⁺ sparks in dyspedic myotubes. *J. Physiol.* 525, 91–103.

Ward, C.W., Reiken, S., Marks, A.R., Marty, I., Vassort, G., and Lacampagne, A. (2003). Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB J.* 17, 1517–1519.

Warnock, D.E., Hinshaw, J.E., and Schmid, S.L. (1996). Dynamin Self-assembly Stimulates Its GTPase Activity. *J. Biol. Chem.* 271, 22310–22314.

Warnock, D.E., Baba, T., and Schmid, S.L. (1997). Ubiquitously Expressed Dynamin-II Has a Higher Intrinsic GTPase Activity and a Greater Propensity for Self-assembly Than Neuronal Dynamin-I. *Mol. Biol. Cell* 8, 2553–2562.

- Wei, L., Gallant, E.M., Dulhunty, A.F., and Beard, N.A. (2009). Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 2214–2224.
- Weiss, R.G., O’Connell, K.M.S., Flucher, B.E., Allen, P.D., Grabner, M., and Dirksen, R.T. (2004). Functional analysis of the R1086H malignant hyperthermia mutation in the DHPR reveals an unexpected influence of the III-IV loop on skeletal muscle EC coupling. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*
- Wenk, M.R., Lucast, L., Paolo, G.D., Romanelli, A.J., Suchy, S.F., Nussbaum, R.L., Cline, G.W., Shulman, G.I., McMurray, W., and Camilli, P.D. (2003). Phosphoinositide profiling in complex lipid mixtures using electrospray ionization mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* *21*, 813–817.
- Wiessner, M., Roos, A., Munn, C.J., Viswanathan, R., Whyte, T., Cox, D., Schoser, B., Sewry, C., Roper, H., Phadke, R., et al. (2017). Mutations in INPP5K, Encoding a Phosphoinositide 5-Phosphatase, Cause Congenital Muscular Dystrophy with Cataracts and Mild Cognitive Impairment. *Am. J. Hum. Genet.* *100*, 523–536.
- van Wijngaarden, G.K., Fleury, P., Bethlem, J., and Meijer, A.E. (1969). Familial “myotubular” myopathy. *Neurology* *19*, 901–908.
- Wium, E., Dulhunty, A.F., and Beard, N.A. (2016). Three residues in the luminal domain of triadin impact on Trisk 95 activation of skeletal muscle ryanodine receptors. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* *468*, 1985–1994.
- Wu, T., and Baumgart, T. (2014). BIN1 Membrane Curvature Sensing and Generation Show Autoinhibition Regulated by Downstream Ligands and PI(4,5)P₂. *Biochemistry (Mosc.)* *53*, 7297–7309.
- Wu, F., Mi, W., Hernández-Ochoa, E.O., Burns, D.K., Fu, Y., Gray, H.F., Struyk, A.F., Schneider, M.F., and Cannon, S.C. (2012). A calcium channel mutant mouse model of hypokalemic periodic paralysis. *J. Clin. Invest.* *122*, 4580–4591.
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., and Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* *537*, 191–196.
- Wu, T., Shi, Z., and Baumgart, T. (2014). Mutations in BIN1 Associated with Centronuclear Myopathy Disrupt Membrane Remodeling by Affecting Protein Density and Oligomerization. *PLOS ONE* *9*, e93060.
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.-N., Codogno, P., and Shen, H.-M. (2010). Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* *285*, 10850–10861.

- X - Y - Z

Xiao, B., Jiang, M.T., Zhao, M., Yang, D., Sutherland, C., Lai, F.A., Walsh, M.P., Warltier, D.C., Cheng, H., and Chen, S.R.W. (2005). Characterization of a Novel PKA Phosphorylation Site, Serine-2030, Reveals No PKA Hyperphosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor in Canine Heart Failure. *Circ. Res.* *96*, 847–855.

Xie, Z., Fang, M., Rivas, M.P., Faulkner, A.J., Sternweis, P.C., Engebrecht, J., and Bankaitis, V.A. (1998). Phospholipase D activity is required for suppression of yeast phosphatidylinositol transfer protein defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 12346–12351.

Xu, L., Tripathy, A., Pasek, D.A., and Meissner, G. (1998). Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *853*, 130–148.

Yan, Z., Bai, X., Yan, C., Wu, J., Li, Z., Xie, T., Peng, W., Yin, C., Li, X., Scheres, S.H.W., et al. (2015). Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature* *517*, 50–55.

Yin, C.-C., Blayney, L.M., and Lai, F.A. (2005). Physical coupling between ryanodine receptor-calcium release channels. *J. Mol. Biol.* *349*, 538–546.

Zalk, R., Clarke, O.B., des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J., and Marks, A.R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* *517*, 44–49.

Zhang, P., and Hinshaw, J.E. (2001). Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat. Cell Biol.* *3*, 922–926.

Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H.-F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 9357–9362.

Zhao, W., Qiu, Y., and Kong, D. (2017). Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* *7*, 27–37.

Zhou, H., Yamaguchi, N., Xu, L., Wang, Y., Sewry, C., Jungbluth, H., Zorzato, F., Bertini, E., Muntoni, F., Meissner, G., et al. (2006). Characterization of recessive RYR1 mutations in core myopathies. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 2791–2803.

Zhou, H., Lillis, S., Loy, R.E., Ghassemi, F., Rose, M.R., Norwood, F., Mills, K., Al-Sarraj, S., Lane, R.J.M., Feng, L., et al. (2010). Multi-minicore disease and atypical periodic paralysis associated with novel mutations in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscul. Disord.* *NMD* *20*, 166–173.

Ziman, A.P., Ward, C.W., Rodney, G.G., Lederer, W.J., and Bloch, R.J. (2010). Quantitative Measurement of Ca²⁺ in the Sarcoplasmic Reticulum Lumen of Mammalian Skeletal Muscle. *Biophys. J.* *99*, 2705–2714.

Zorzato, F., Scutari, E., Tegazzin, V., Clementi, E., and Treves, S. (1993). Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release. *Mol. Pharmacol.* *44*, 1192–1201.

Zou, J., Zhang, C., Marjanovic, J., Kisseleva, M.V., Majerus, P.W., and Wilson, M.P. (2012). Myotubularin-related protein (MTMR) 9 determines the enzymatic activity, substrate specificity, and role in autophagy of MTMR8. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 9539–9544.

Zucchi, R., and Ronca-Testoni, S. (1997). The Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Channel/Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States. *Pharmacol. Rev.* *49*, 1–52.

Züchner, S., Nouredine, M., Kennerson, M., Verhoeven, K., Claeys, K., Jonghe, P.D., Merory, J., Oliveira, S.A., Speer, M.C., Stenger, J.E., et al. (2005). Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Genet.* *37*, 289–294.

Zullo, A., Textor, M., Elischer, P., Mall, S., Alt, A., Klingler, W., and Melzer, W. (2018). Voltage modulates halothane-triggered Ca²⁺ release in malignant hyperthermia-susceptible muscle. *J. Gen. Physiol.* *150*, 111–125.

Signalisation calcique et couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique : modulation par certains phosphoinositides et altérations associées dans deux myopathies centronucléaires

Le couplage excitation-contraction (EC) du muscle squelettique est dû à un efflux de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytosol en réponse à une dépolarisation de la membrane plasmique, ce qui déclenche l'activation des myofilaments. Des mutations dans le gène codant pour la phosphoinositide (PtdInsP) 3-phosphatase myotubularine (MTM1) sont associées à la myopathie centronucléaire liée à l'X (XL-CNM), caractérisée par une faiblesse musculaire très sévère limitant l'espérance de vie de quelques mois à quelques années. Un modèle murin déficient en MTM1 (*Mtm1* KO) a été généré et reproduit les principales caractéristiques de la maladie humaine. Une altération du couplage EC a été rapportée dans les fibres *Mtm1* KO et joue probablement un rôle critique dans la faiblesse musculaire associée à la XL-CNM, cependant la fonction exacte de MTM1 et les mécanismes pathologiques de la XL-CNM restent peu connus.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a visé à comprendre les interactions fonctionnelles entre les PtdInsPs et l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique, avec un intérêt spécifique pour les implications pathologiques. L'étude du couplage EC et de l'homéostasie calcique s'est basée sur une combinaison d'électrophysiologie et de détection du calcium en microscopie confocale, sur fibres musculaires isolées de souris sauvages et transgéniques.

Dans un premier temps, nous avons testé les conséquences d'une réduction rapide du taux de PtdIns(4,5) P_2 dans la membrane plasmique sur la fonction du couplage EC. Pour cela, nous avons exprimé dans les fibres musculaires de souris sauvages une PtdInsP phosphatase sensible au potentiel, la Ci-VSP. Nos résultats ont montré une altération de l'efflux calcique du RS en réponse à de fortes dépolarisations activant la phosphatase, démontrant l'implication du PtdIns(4,5) P_2 dans la régulation du couplage EC et de l'homéostasie calcique.

Dans un deuxième temps, une caractérisation complète des défauts de signalisation calcique et du couplage EC a été réalisée dans les fibres musculaires isolées de souris *Mtm1* KO. Nos résultats montrent que l'efflux calcique est d'amplitude réduite, est retardé et est spatialement hétérogène. L'inhibition pharmacologique de l'activité PtdInsP 3-kinase améliore ces défauts *in vitro* et la survie des souris *in vivo*, suggérant que l'accumulation des substrats de MTM1 participe au défaut du couplage EC. Ces résultats montrent par ailleurs le bénéfice thérapeutique d'une approche pharmacologique aux inhibiteurs d'activité PtdInsP 3-kinase. Enfin, nous avons testé si ces altérations du couplage EC étaient communes à la XL-CNM et à une forme plus modérée (autosomique dominante) de la CNM, associée à des mutations dans le gène *DNM2*. La même étude du couplage EC a été réalisée les fibres musculaires du modèle murin KI-*Dnm2*^{R465W} et a révélé certaines altérations similaires à celles reportées dans le modèle *Mtm1* KO (par exemple le retard de l'efflux calcique) pouvant contribuer à la faiblesse musculaire. Cependant, d'autres défauts (altérations structurales, réduction de l'efflux calcique) affectent plus sévèrement le modèle *Mtm1* KO, et pourraient être déterminants dans la différence de sévérité entre les deux formes de CNM.

DISCIPLINE : Physiologie

MOTS-CLES : Muscle squelettique ; Couplage excitation-Contraction ; Phosphoinositides ; Myopathie myotubulaire ; Myopathie centronucléaire ; Calcium

Institut NeuroMyoGène
CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - Université Claude Bernard Lyon 1
8 avenue Rockefeller
69008 Lyon