



HAL
open science

Mécanismes d'adressage et de rétention de la triadine à la triade au sein du muscle squelettique

Perrine Teyssier

► **To cite this version:**

Perrine Teyssier. Mécanismes d'adressage et de rétention de la triadine à la triade au sein du muscle squelettique. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV047 . tel-02860057

HAL Id: tel-02860057

<https://theses.hal.science/tel-02860057v1>

Submitted on 8 Jun 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Perrine TEYSSIER

Thèse dirigée par le Dr **Julien FAURE**

préparée dans l'équipe « **Cellular Myology and Pathologies** »
dirigée par le Dr **Isabelle MARTY**
au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences**,
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Mécanismes d'adressage et de rétention de la triadine à la triade au sein du muscle squelettique

Thèse soutenue publiquement le **28 Novembre 2019**,
devant le jury composé de :

Mme Corinne ALBIGES-RIZO

Directrice de recherche, Université de Grenoble, Présidente

Mr Vincent GACHE

Chargé de recherche, Université de Lyon, Rapporteur

Mr Stéphane VASSILOPOULOS

Chargé de recherche, Université de Paris, Rapporteur

Mr Vincent JACQUEMOND

Directeur de recherche, Université de Lyon, Examineur

Mme Isabelle MARTY

Directrice de recherche, Université de Grenoble, Examinatrice

Mr Julien FAURE

Maître de Conférence-Praticien Hospitalier, Université de Grenoble,
Directeur de thèse



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr Vincent Gache, Dr Stéphane Vassilopoulos, Dr Vincent Jacquemond et Dr Corinne Albiges-Rizo d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

Je commencerai par un énorme merci à Isabelle pour m'avoir acceptée dans cette fabuleuse équipe 4 (la meilleure, pour reprendre les mots de certains !!!) il y a maintenant plus de 4 ans. Ces années m'ont permis de découvrir la véritable recherche avec des personnes qui se donnent à cœur pour la faire avancer du mieux possible malgré les obstacles rencontrés !! Merci d'être la personne que tu es, à qui on peut parler sans détour autant professionnellement que personnellement, qui a su me conseiller, me soutenir et me permettre de m'épanouir jour après jour.

Bien sûr que représenterait des remerciements sans parler de mon cher directeur de thèse Julien !! Un grand merci à toi aussi de m'avoir pris sous ton aile dès le début, de m'avoir fait confiance et m'avoir appris à avoir plus confiance en moi. Bien sûr je suis obligée de remercier tes idées qui fusent plus rapidement que ton ombre et qu'il faut surtout mettre au point/faire/analyser en quelques jours :D !!! Je ne doute pas que les suivants pourront toujours compter sur toutes ces idées et surtout le fameux fractionnement subcellulaire !!! Tu as beau être bien occupé avec toutes tes activités, j'ai pu compter sur toi dès que j'avais besoin de parler, tu as toujours su m'écouter et me conseiller, pour tout ça et bien plus encore, je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer toutes ces années.

Ensuite j'aimerais remercier les membres de l'équipe 4 anciens et actuels, et oui on n'est pas la meilleure équipe du monde sans avoir des membres au top !!!!

Merci à Muriel, et oui tu es partie au-delà de certains océans, mais sans toi, je n'en serai pas là où j'en suis actuellement !! Dès le départ c'est toi qui m'a formée à la pratique du muscle et tout ce qui va avec, les clonages (Ô les clonages !!!), les dissections, les marquages, les cellules qui contractent (non stop), les données perdues, les soirées au noir du microscope, mais aussi les résultats qui pètent sa mère (Ahh ça c'est quand même le meilleur !!). Même si je suis plus vieille que toi de 8 jours, ça a été toi mon maître Yoda, toujours là en soutien, merci pour tout ce qu'on a pu partager au labo mais aussi en dehors !! Je ne te souhaite que le meilleur pour ton post-doc et pour la suite de ton parcours, accroche toi, tu peux tous les dégommer je n'en doute pas !!!

Ô Julie, grande Julie représentante éternelle et pilier de l'équipe, quoi te dire à part un ENORME merci d'avoir toujours été là, comme une grande sœur, à parler de tout et de rien, pouvoir se livrer à tous niveaux, faire nos petits papotages d'étages autour d'un thé (oui oui team thé représente !!) ou d'un citron ;) , à partager des choses à l'extérieur et au sein du GIN comme une chambre en congrès, un taxi, un mojito/verre de vin, un match de coupe du monde, un repas avec notamment la découverte de l'alsace avec ces Flammekueche, Spätzle, cave à vins et autres douceurs de l'Est !! Bien évidemment je ne pourrai oublier nos moments au P2, nos supers prod' et surtout nos records de chrono mais n'oublions pas que

ce qui se passe au P2, reste au P2 :D !! Nos petites discussions vont me manquer mais elles n'en seront que plus fournies dès qu'on se reverra !!!

Ensuite je tiens à remercier Laurent, même si tout au long de ces années je ne t'ai connu qu'avec deux coupes de cheveux/barbes relativement soft contrairement à touuuuttt ce que j'ai pu entendre :D, ta bonne humeur et tes conseils (même si tu n'aimes que le noir sur le blanc et écris en GROS) tout au long de ces années ont été des atouts à toutes épreuves ! Après avoir « fait des bébés » ensemble (pour reprendre tes doux mots ;-)), survécu à Pint of Science, à la coiffure sympathique et original du serveur suisse de la Gordon 2017 et avoir partagés ensemble autant de petits déjeuners, viennoiseries, flans, brownies (obligée de remercier Marie Blachère au passage) et j'en passe ... je sais que plus rien ne fait peur !!

Merci Merci Merci à ma chère co-bureau depuis le début, ma chère Anne. Après être arrivées en même temps dans l'équipe et d'avoir partagées notre bureau et des michokos ou kit-kat, bounty, snikers etc etc, toutes ces années, je quitte le navire !! Mais je sais que tu prendras bien soin de notre cher Brice, qui te tiendra chaud tous les hivers à venir, que tu arriveras à prendre le contrôle et à maîtriser ton ordinateur, tout comme tu contrôleras Laurent et ses « Faut qu'on parle » ☺ !! Et surtout que plus aucune culture de cellules ni blots sur cellules ne te résisteront !!!

Merci à Caroline avec qui on a partagé notre M2 et nos années de thèse, même si dans des locaux différents ;) !! Je n'oublierai pas les JSFM à Bordeaux et ce délicieux repas de Gala savouré ensemble ☺ !!! Je te souhaite une très belle fin de thèse, une rédaction au taquet et une soutenance parfaite !

Merci aussi à Mathilde B. et Lauriane pour les moments qu'on a pu partager, je ne vous souhaite que le meilleur pour vos thèses, que vous passiez des moments riches et forts tout comme j'ai pu en passer dans cette équipe et surtout que vous vous épanouissiez pendant ces quelques années !! Mathilde, bon courage pour survivre dans le froid du bureau mais j'ai foi en Brice pour vous réchauffer cet hiver avec Anne !!! Merci également pour les moments discussions, stress, excitation, conclusions... sur GOT :D !!

Merci à Mathilde C. pour nos discussions autour de la science, bien sûr ^^ mais également en vadrouille à Paris et surtout à Bordeaux où on a lutté pendant plusieurs jours contre des nuées de moustiques ;) et aussi autour de GOT olalalala !! Je te souhaite que le meilleure pour l'avenir, que ton plan A réussisse comme tu l'espère pour ne jamais avoir affaire au plan B (même si les fleurs ça sent bon :D) !!

Merci à Alexis de m'avoir parfaitement décrit l'équipe 4 alors que j'arrivais tout juste et de m'avoir montré qu'être en thèse sans être déprimé ça existait dans la meilleure équipe du monde !!! Et puis merci de m'avoir cédé ton bureau, je suis sûre que c'est ça qui a fait toute la différence !! Je te souhaite que du positif pour la suite et que Lyon t'apporte ce que tu attends !!

Merci à Brice d'avoir été mon co-bureau pendant quelques années et derniers représentants des thésards Homme de l'équipe !! Grâce à toi je sais qu'on peut être Docteur Docteur Docteur, tout en écrivant des livres, mangeant des michokos et menant une vie de famille en France ou à l'étranger !! Je te souhaite également de t'épanouir dans ce que tu fais et de continuer dans la voie qui te convient !

Un grand merci également à Nathalie, John, Diane et Klaus pour leur gentillesse et leur accueil, et qui ont toujours su être de bons conseils et poser les bonnes questions lors de nos discussions en réunion d'équipe et en dehors !

Je tiens également à remercier la team cafèt dont les fameux membres du groupe « Big Mac Bacon Girls », Nathalie, Amélie, Céline, Floriane parce que bon il faut le reconnaître sans vous, les repas de midi, les lotos, les sushis, les burgers, les commandes deliveroo... n'auraient jamais été les mêmes !!

Merci également à Margaret, la grande prêtresse des commandes de l'équipe 4 !! Je n'oublierai jamais le fabuleux chapeau confectionné mains made in GIN que tu m'avais fait pour les catherinettes ☺ !!

Un grand merci à PIC-GIN, à Florence, à Jacques et à Yasmina, d'avoir partagé le peigne et tous ces bons moments ensemble !! Merci de m'avoir formé et appris ce qu'il fallait sur le maniement de ces bêtes que sont les microscopes, merci pour vos conseils autant sur l'analyse d'images, les statistiques, l'annulation de créneau ☺ que les pâtisseries, viennoiseries, repas, discussions échangés entre les portes des bureaux et à la cafèt !!

Un petit mot pour remercier les doctorants du GIN actuels et anciens qui ont permis de partager des moments très agréables tout au long de ces années. Notamment à Marta, Eléa et Rebecca pour leur gentillesse dès mes premiers pas au GIN et même actuellement à l'extérieur ! Rebeccanounette on a commencé ensemble il y a pratiquement 5ans, on a survécu à notre M2 pour finir presque en même temps, malgré des chemins différents, si ça c'est pas la classe :D !! Merci également à Eve, Hélène, Adrien et Thibault avec qui on a représenté notre année de doctorants « peu fournie » et où on a pu entre autre organiser un fabuleux repas de Noël et un délicieux Punch :D !! Hélène et Eve je n'oublierai pas notre petite dégustation secrète de cidre !! Merci à Charlotte, Maximilian, Nagham, Rémi, Benoit, Christelle, Marc, Céline, Roxane et tous les autres !!!

Je tiens à remercier également Béatrice, la reine des clonages, pour toute l'aide que tu as pu m'apporter et le temps que tu m'as fait gagné, et Eric pour le temps que tu as passé à essayer de comprendre mes problèmes de triadine et de marquage faible et pour les macros que tu as su adapter à mes questions !!

Bien évidemment je me dois de remercier ma famille et mes amis pour déjà m'avoir permis de faire ces études, encore et toujours mais promis je pense m'arrêter là maintenant !! Mais aussi pour m'avoir soutenue et avoir essayé de comprendre ce que je pouvais bien leur expliquer avec mes histoires de muscles !! C'est en grande partie grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui !! Tout les mots ne pourront pas expliquer ce que je pense et ressent mais forcément des remerciements sans citer l'Homme de la situation, ne seraient pas des vrais remerciements. Alors merci à toi Joris de m'avoir soutenue dans les moments plus durs comme dans les moments joyeux, de m'avoir booster et apaiser dès que j'en avais besoin, d'avoir été et d'être là comme tu l'es. Mais faut bien reconnaître que la colle entre nous 2 n'aurait pas tenu sans notre petite glue, Joker the cat :D !!

Enfin je finirai par remercier l'AFM qui m'a permis de réaliser ma thèse et d'obtenir les résultats qui vont suivre ...

Résumé

Le muscle squelettique est un tissu complexe constitué de nombreuses cellules musculaires. Lorsqu'un motoneurone en contact avec ces cellules, émet un potentiel d'action, celui-ci se propage le long de la membrane plasmique où il permet l'activation du complexe de relâchement du calcium (CRC), la sortie massive de calcium des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (RS) dans le cytosol, et ainsi la contraction musculaire. Ce mécanisme, appelé couplage excitation-contraction, requière un site de contact spécifique entre la membrane plasmique et le RS, appelé triade. Cette dernière est composée d'une invagination de la membrane plasmique, le tubule-t, flanquée de deux citernes terminales du RS. Au sein des triades, le CRC est centré autour de deux canaux calciques, le récepteur des Dihydropyridines (DHPR) et le récepteur de la Ryanodine (RyR1), très précisément localisés face à face dans leurs membranes respectives : la membrane du tubule-t et la membrane du RS. Ainsi, quand la membrane est dépolarisée, le DHPR subit un changement de conformation permettant l'ouverture du canal RyR1 et la sortie du calcium. Le CRC contient également d'autres protéines précisément localisées à la triade comme la calséquestrine ou la triadine, ayant des rôles clés pour moduler la libération du calcium. L'initiation de la contraction dépend ainsi du contact précis entre la membrane du RS et la membrane du tubule-t et également de la localisation exclusive des protéines du CRC au sein de la triade. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents à l'organisation précise des protéines du CRC à la triade, restent inconnus.

Durant cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la triadine protéine du CRC qui servirait d'ancre aux autres protéines du CRC grâce à ses différentes interactions. Nous avons étudié les mécanismes de trafic et de rétention de la triadine au cours de la différenciation musculaire. Pour ce faire, la dynamique de la triadine a été explorée par des techniques de microscopie et en réintroduisant, grâce à des lentivirus, des chimères fluorescentes de triadine au sein de cellules musculaires différenciées.

Dans un premier temps l'étude de l'adressage et de la rétention des protéines du CRC à la triade a révélé que la triadine emprunte une voie vésiculaire pour sortir du reticulum et atteindre les triades. Cette voie de trafic vésiculaire utilise le cytosquelette de microtubules et notamment les moteurs moléculaires et pourrait être une voie spécifique au muscle squelettique. Dans un deuxième temps et dans des étapes plus tardives de la différenciation, la triadine diffuse dans les membranes du RS suivie de son accumulation aux triades. Les deux mécanismes, diffusion et trafic vésiculaire, pourraient cependant coexister dans une cellule musculaire. Dans tous les cas, une fois la triade atteinte, la triadine y est retenue grâce à son domaine transmembranaire. Durant ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de prendre part à un projet portant sur l'implication de la protéine MAP6 dans la fonction musculaire. Ce projet a permis de montrer que MAP6 est présente dans le muscle squelettique et que son absence donne lieu à une faiblesse musculaire due en partie à une diminution des relâchements calciques, ainsi qu'à une altération du réseau de microtubules et de l'organisation du RS.

Abstract

Skeletal muscle is a complex tissue made up of many muscle cells. When a motor neuron in contact with muscle cells, emits an action potential, it propagates along the plasma membrane where it allows the activation of the calcium release complex (CRC), the massive calcium release of terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum (SR) in the cytosol, and thus muscle contraction. This mechanism, called excitation-contraction coupling, requires a specific site of contact between the plasma membrane and the SR, called the triad. More precisely, a triad is composed of an invagination of the plasma membrane, the T-tubule, flanked by two terminal cisternae of the SR. At the triads, the CRC is centered on two calcium channels, the Dihydropyridine Receptor (DHPR) and the Ryanodine Receptor (RyR1), very precisely located face to face in their respective membranes: the T-tubule membrane and the membrane of the SR. Thus, when the membrane is depolarized, the DHPR undergoes a conformational change allowing the opening of RyR1 channel and the release of the calcium. CRC also contains other triad-specific proteins such as calsequestrin or triadin, which have key roles in modulating calcium release. Initiation of contraction thus depends on the precise contact between the SR membranes and the T-tubule membranes and also the exclusive localization of the CRC proteins at the triads. Nevertheless, the mechanisms underlying the precise organization of CRC proteins to the triad remain unknown.

During this work, we focused on triadin, a CRC protein that would anchor other CRC proteins through the different interactions it has with RyR1, with calsequestrin and also with microtubules. We studied the mechanisms of trafficking and retention of triadin during muscle differentiation. To do this, the dynamics of triadin was explored by microscopy techniques and by reintroducing, using lentivirus, fluorescent triadin chimeras into differentiated muscle cells.

Firstly, the study of CRC proteins targeting and retention in the triad revealed that triadin take a vesicular pathway to exit the reticulum and reach the triads. This vesicular trafficking pathway use the microtubule cytoskeleton and in particular the molecular motors and could be a pathway specific to skeletal muscle. In a second step and in later stages of differentiation, triadin diffuse into SR membranes followed by its accumulation at the triads. Both mechanisms, diffusion and vesicular trafficking, could, however, coexist in a muscle cell. In all cases, once the triad is reached, triadin is retained thanks to its transmembrane domain. Moreover, I also had the opportunity to take part in a project on the involvement of the MAP6 protein in muscle function. This project has shown that MAP6 is present in skeletal muscle and that its absence leads to muscle weakness associated with a decrease in calcium releases, as well as an impairment of the microtubule network and the organization of SR.

Abréviations

4CmC : Chloro-méta-Crésol	MG53 : mitsugumine 53
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	MOI : Multiplicity of Infection
ADP : Adénosine DiPhosphate	MT : Microtubule
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	MTOC : MicroTubule Organizing Centers
ATP : Adenosine TriPhosphate	Noco : Nocodazole
ATPase : Capacité à hydrolyser l'ATP	PA : Potentiel d'action
BFA : Brefeldine A	PAGFP : Photoactivatable GFP
BMP : Bone morphogenic Proteins	PBS : Phosphate Buffer Saline
BSA : Bovine Serum Albumin	PCR : Polymerase Chain Reaction
Ca²⁺ : ions calcium	PFA : ParaFormAldéhyde
CamKII : Calmoduline Kinase II	PM : Plasma membrane
CICR : Calcium-Induced-Calcium-Release	PS : Pénicilline-Streptomycine
CLIMP-63 : cytoskeleton-linking membrane protein 63	PSM : Poste de Sécurité Microbienne
COPI/COPII : Coat Protein complex	RACE : Rapide Amplification of cDNA Ends
COS7 : CV-1 (Simian) Origin containing SV40 cells	RE ou ER : Réticulum endoplasmique
CRC : Complexe de relâchement du Calcium	REL : RE lisse
CT : Citerne terminale	RER : RE rugueux
DHPR : Récepteur des dihydropyridine	ROI : Region of Interest
DMEM : Dulbecco's modification of eagle medium	ROS : Reactive Oxygen Species
DMSO : Diméthylsulfoxyde	RS ou SR : réticulum sarcoplasmique
DNM2 : dynamine 2	RyR : Récepteur de la Ryanodine
DTT : Dithiothréitol	Sec61β : sous unité β de Sec61
EDL : Extensor Digitorum Longus	Sec61^{N-T95} : Chimère Sec61 β /T95
EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique	Sec61^{TM-T95} : Chimère Sec61 β /T95 Δ Cter
ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation	SEM : Standard Error of Mean
ERES : ER Exit Sites	SERCA : Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase
ERGIC : ER/Golgi Intermediate Compartment	siRNA : small interfering RNA
FBS : Foetal Bovine Serum	SOCE : Store-Operated Calcium Entry
FDB : Flexor Digitorum Brevis	STIM : STromal Interaction Molecule
FRAP : Fluorescence Recovery After photobleaching	STOP : Stable Tubule-Only Polypeptide
GDP : Guanosine DiPhosphate	T32 : Isoforme de la triadine Trisk 32
GFP : Green Fluorescence Protein	T49 : Isoforme de la triadine Trisk 49
GTP : Guanosine TriPhosphate	T51 : Isoforme de la triadine Trisk 51
HEK293 : Human Embryonic Kidney cells	T95 : Isoforme de la triadine Trisk 95
HIV : Human Immunodeficiency Virus	T95ΔCter : Mutant de troncation de la triadine
HM : Hyperthermie Maligne	T95ΔCter^{TM-Sec61} : Chimère Sec61 β /T95 Δ Cter
i.c. ou c.i. : intervalle de confiance	TAC : Tip Attachment Complex
JPH : Junctophiline	TRDN : gène de la triadine
kDa : Kilo-daltons	Trisk : TRladin SKeletal muscle
KEKE : domaine riche en lysine et glutamate	Tubule-t : Tubule transverse
KO : Knock-Out	TVPC : Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique
LTA : Latrunculine A	UV : Ultra violet
MAP : Microtubule Associated Protein	VICR : Voltage-Induced-Calcium-Release
mBCD : Méthyl- β -CycloDextrine	VSVG : Vesicular Stomatitis Virus G protein
MetOH : méthanol	WT : Wild-Type
MG29 : mitsugumine 29	

Sommaire

Remerciements	1
Résumé	5
Abstract	6
Abréviations	7
Sommaire	9
Introduction	17
Chapitre 1 : Le Muscle squelettique	19
I. Généralités	21
II. Le muscle squelettique	21
1) La structure du muscle squelettique	21
2) La différenciation myogénique.....	22
3) L'organisation d'une fibre musculaire	24
a) Les myofibrilles et les sarcomères	24
b) Rôle des myofilaments lors de la contraction musculaire	26
4) La contraction.....	27
a) La jonction neuromusculaire	27
b) La triade et le couplage excitation-contraction	28
c) Le complexe de relâchement du calcium	30
Au sein du muscle squelettique	30
Au sein du muscle cardiaque	30
5) La formation de la triade.....	31
a) Le reticulum sarcoplasmique	31
b) Le tubule-t	34
Chapitre 2 : Les protéines du Complexe de Relâchements du Calcium	39
I. Les protéines majeures : deux canaux calciques	41
1) Le Récepteur des Dihydropyridines (DHPR)	41
a) Topologie.....	41
b) Interaction DHPR-RyR1	43
c) Modèles animaux et mutations.....	44

2) Le Récepteur de la Ryanodine	45
a) Les différentes isoformes.....	45
b) Topologie et structure 3D.....	46
c) Agents régulant l'activité de RyR	48
d) Modèle animal KO RyR1	48
II. Les protéines régulatrices	49
1) FKBP12.....	49
2) La Calmoduline	50
3) La Calséquestrine	51
a) Les isoformes	51
b) Les différents rôles de la calséquestrine	51
c) Modèles animaux et mutations.....	53
d) Modifications post-traductionnelles	54
4) La Junctine.....	55
5) La Triadine	56
a) Les différentes isoformes.....	56
b) Domaines fonctionnels et interactions protéiques	57
c) Fonctions de la triadine	59
d) Les modèles animaux triadine KO et les mutations retrouvées chez l'Homme.....	60
Chapitre 3 : Le réseau de microtubules et les MAPs associées.....	63
I. Structure et dynamique des microtubules dans les cellules non différenciées.....	65
1) Structure	65
2) Dynamique.....	67
3) Modifications post-traductionnelles.....	69
4) Les protéines associées aux microtubules (MAPs)	71
a) Les protéines des bouts (+)	71
b) Les MAPs structurales	73
c) Les MAPs déstabilisatrices	75
d) Les moteurs moléculaires	76
II. Les microtubules et le reticulum.....	79
III. Organisation et rôle des microtubules dans le muscle	81
1) Organisation.....	81
2) Rôles du réseau de microtubules	82
a) Myogenèse	82
b) Protéines régulatrices	85

Chapitre 4 : Le reticulum et la voie de biosynthèse	87
I. La voie de biosynthèse au sein de cellules eucaryotes non différenciées	89
1) Organisation du reticulum	89
2) La voie de biosynthèse.....	91
a) Les domaines du reticulum	92
L'enveloppe nucléaire	92
Le reticulum lisse et le reticulum rugueux.....	92
b) Le compartiment intermédiaire ou ERGIC	95
c) L'appareil de Golgi.....	98
3) Les points de contacts.....	99
II. Le reticulum et la voie de biosynthèse des cellules musculaires différenciées.....	100
1) Organisation du reticulum	100
2) La voie de biosynthèse.....	103
III. Adressage et rétention des protéines du complexe de relâchement de calcium à la triade	106
1) Protéine du tubule-t : le DHPR	106
2) Les protéines du reticulum sarcoplasmique.....	108
a) Protéine de la lumière du RS : la calséquestrine.....	108
b) Protéines membranaires du RS.....	109
Objectifs de thèse	113
Matériel et Méthodes	115
I. Modèles animaux et éthique	117
1) Ethique.....	117
2) Lignée de souris KO triadine	117
3) Lignée de souris KO MAP6	117
4) Lignée de souris KO RYR1	117
II. Biologie moléculaire.....	118
1) Les plasmides	118
2) Les clonages.....	119
3) Extraction d'ARN, RT-PCR et 5' RACE	120
a) Extraction d'ARN et RT-PCR	120
b) 5' RACE.....	121
III. Les cellules.....	122
1) Lignées cellulaires.....	122
a) Culture.....	122

b) Congélation	122
c) Transfection	122
2) Cultures primaires	123
a) Dissection et stockage	123
b) Ensemencement et culture	123
c) Transduction et différenciation	124
d) Transfection et différenciation	125
3) Electroporation et fibres dissociées	125
a) Electroporation	125
b) Préparation des fibres dissociées	126
IV. Les lentivirus	126
1) Principe et fonctionnement	126
2) Production	127
3) Titration	127
V. Immunomarquages et anticorps	128
1) Anticorps primaires	128
2) Anticorps secondaires	129
3) Immunomarquage	129
VI. Microscopie et analyses	130
1) Traitements pharmacologiques	130
2) Imagerie confocale	130
a) Immunomarquages et analyse de colocalisation	130
b) Cellules vivantes	131
Spinning-Disk Confocal	131
Confocal Zeiss LSM 710	131
Résultats	135
Partie 1 : Trafic de la triadine au début de la différenciation musculaire	137
I. Caractérisation du modèle cellulaire	139
1) Les clusters de triadine sont mobiles dès le début de la différenciation	139
2) Caractérisation des clusters de triadine	142
a) Dès 16h, les clusters de T95 colocalisent avec des protéines de la triade	142
b) A 16h les sarcomères et le cytosquelette ne sont pas organisés	145
c) A 16h, les clusters de T95 pourraient représenter un transport vésiculaire	146
d) Les clusters de triadine sont-ils associés aux tubules-t ?	147
e) Comparaison du trafic de la triadine avec le trafic de RyR1 et du DHPR	152

II. Implication du cytosquelette	157
1) Les filaments d'actine	157
2) Implication du cytosquelette de microtubules	157
a) Les clusters de triadine utilisent les microtubules pour se déplacer	157
b) Les clusters de triadine ne se lient pas aux bouts (+) des microtubules pour leurs déplacements	158
c) Les mouvements des clusters de triadine sont dépendant des moteurs moléculaires	161
III. Voie de biosynthèse muscle-spécifique	165
1) La triadine et VSVG emprunteraient la même voie de sécrétion.....	165
2) Les clusters triadine emprunteraient une voie muscle spécifique	167
IV. Conclusions partie 1	175
Partie 2 : Adressage et rétention de la triadine à la triade	177
I. Caractérisation du modèle cellulaire	179
II. Dynamique de la triadine	181
1) La triadine est dynamique dans les membranes du RS.....	181
a) La triadine est dynamique quel que soit le stade de différenciation.....	181
b) La partie luminale de la triadine restreint sa dynamique à DIF3	184
2) La triadine diffuse avant d'être retenue dans les triades	185
3) Dans un muscle adulte, la triadine diffuse également avant d'être retenue dans les triades	187
III. Rétention de la triadine à la triade.....	189
1) Le RyR n'est pas impliqué dans la dynamique de T95 au début de la différenciation	189
2) Le domaine transmembranaire de la triadine est nécessaire pour sa bonne localisation à la triade	191
IV. Conclusions partie 2	195
Partie 3 : Le rôle de la protéine MAP6 dans la fonction musculaire.....	197
Discussions et perspectives	201
I. Au début de la différenciation musculaire, les clusters de triadine emprunteraient une voie muscle spécifique.....	203
1) Que représente les clusters de triadine : pré-triade et/ou vésicules ?	203
2) Les clusters de triadine représenteraient un trafic vésiculaire utilisant le cytosquelette de microtubules	207
3) Mise en évidence d'une voie de biosynthèse spécifique du muscle.....	213
II. Diffusion et rétention de la triadine à la triade	217

1) La triadine est dynamique dans les membranes du RS.....	217
2) La triadine diffuse dans les membranes du RS avant de s'ancrer dans les triades..	218
3) Implication des domaines de la triadine dans sa localisation à la triade	219
III. Bilan des mécanismes de trafic de la triadine tout au long de la différenciation musculaire	221
Publications	223
Références	227

After all, muscle moves the world.

Charles Scott Sherrington.

Introduction

Le muscle squelettique est un tissu complexe constitué de nombreuses cellules musculaires. Lorsqu'un motoneurone en contact avec ces cellules, émet un potentiel d'action, celui-ci se propage le long de la membrane plasmique où il permet l'activation du complexe de relâchement du calcium, la sortie massive de calcium des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol, et ainsi la contraction musculaire.

La contraction musculaire dépend donc de l'organisation précise de différentes structures musculaires (complexe protéique, réticulum, membrane plasmique, jonction neuromusculaire...) les unes par rapport aux autres. Ces structures sont mises en place progressivement tout au long du développement et de la différenciation musculaire et les protéines les composant sont acheminées de leur lieu de synthèse à leur compartiment final afin de permettre une contraction musculaire correcte.

Mon travail de thèse s'est alors inscrit dans l'idée de comprendre les mécanismes d'organisation des protéines du complexe de relâchement du calcium, présentes au sein du muscle. C'est pourquoi, cette introduction générale se divise en quatre chapitres permettant de faire le point sur l'état actuel de la recherche concernant le muscle, l'organisation des structures majeures comme le réticulum et la membrane plasmique, ainsi que la dynamique des protéines du complexe de relâchement du calcium.

Chapitre 1 : Le Muscle squelettique

I. Généralités

Les muscles composant près de 40% de notre masse corporelle se divisent en trois grandes familles : les muscles lisses, squelettiques et le muscle cardiaque. Les muscles striés désignent le muscle cardiaque et les muscles squelettique.

Les muscles squelettiques représentent la grande majorité des muscles du corps. Ils se distinguent des autres types de muscles de part leur contraction volontaire et leur composition en longues cellules multinucléées appelées fibres musculaires (Figure 1).

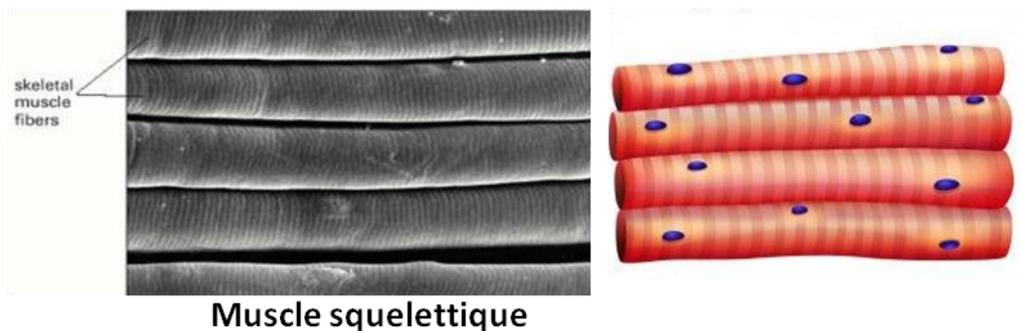


Figure 1 : Le muscle squelettique. A gauche est représenté une image en microscopie électronique à balayage ainsi qu'un schéma (à droite) représentant tous deux des cellules du muscle squelettique. Les striations sont visibles. *D'après Molecular biology of the cell, 2nd Edition 1989, Garland Publishing, Inc. New York & London.*

II. Le muscle squelettique

1) La structure du muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont rattachés au squelette par les tendons et sont constitués de différentes couches de tissus conjonctifs. L'épimysium entoure l'ensemble du muscle, le périmysium se situe tout autour des faisceaux de fibres musculaires et enfin l'endomysium entoure chacune des fibres musculaires (Figure 2). Ces différents tissus conjonctifs ont pour rôle de mettre en contact les différentes parties du muscle et ainsi de permettre la mobilisation d'un ou de plusieurs faisceaux de fibres musculaires.

La fibre musculaire est la cellule musculaire. Elle est de forme cylindrique avec une taille pouvant aller jusqu'à 50 cm de longueur et 100 μm de diamètre. Chaque fibre musculaire est composée de myofibrilles et comporte plusieurs noyaux c'est pourquoi on parle de cellules multinucléées (Figure 3).

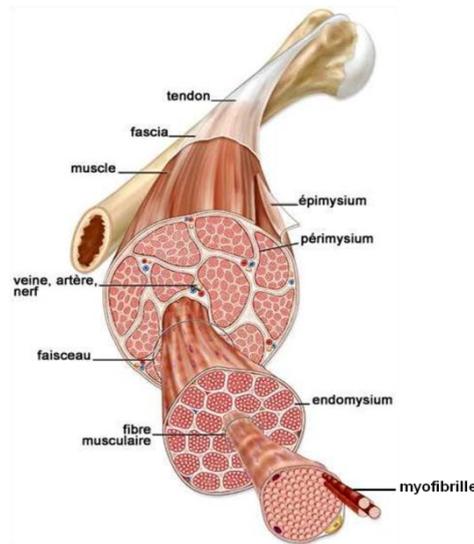


Figure 2 : Structure du muscle squelettique. Adapté du site <http://academic.kellogg.cc.mi.us>

2) La différenciation myogénique

C'est à partir du mésoderme d'un embryon et plus particulièrement des somites (Kieny et al., 1988) que des progéniteurs permettent de donner naissance à la corde, aux tissus conjonctifs et musculaires. Pour le muscle squelettique les précurseurs musculaires sont les myoblastes, cellules mononucléées qui fusionnent entre elles pour former les myotubes (Draeger et al., 1987). Ces derniers se différencient en fibres musculaires matures avec les noyaux qui ont migré à la périphérie et l'appareil contractile des myofibrilles qui est précisément organisé au centre de la fibre musculaire (Figure 3).

Les myofibrilles commenceraient à se former à la périphérie de la cellule musculaire. Cette formation se fait progressivement depuis la membrane plasmique de la cellule et c'est à ce niveau-là que les protéines myofibrillaires (myosine, actine, titine, α -actinine, etc) sont ajoutées aux myofibrilles existantes (Morkin, 1970). Au tout début

de la différenciation, c'est la myosine non musculaire de type II qui est exprimée. C'est elle qui compose les filaments épais de myosine des pré-myofibrilles (Rhee et al., 1994). L' α -actinine représente les futures lignes Z des sarcomères et est présente sous forme de points denses espacés régulièrement le long des pré-myofibrilles (Sanger et al., 1986).

Au fur et à mesure de la différenciation musculaire, la myosine spécifique du muscle remplace la myosine non musculaire, les points denses d' α -actinine fusionnent pour former les lignes Z et d'autres protéines myofibrillaires comme la titine s'expriment. Ces changements permettent d'aboutir à des myofibrilles matures composées de sarcomères fonctionnels (Dabiri et al., 1997; Rhee et al., 1994). Des cellules satellites sont également trouvées sous la lame basale en contact direct avec la fibre musculaire (Figure 3). Ce sont des cellules progénitrices qui sont dans un état de quiescence mais qui ont la capacité de se diviser et de régénérer la fibre musculaire lors d'une lésion de cette dernière (Relaix and Zammit, 2012).

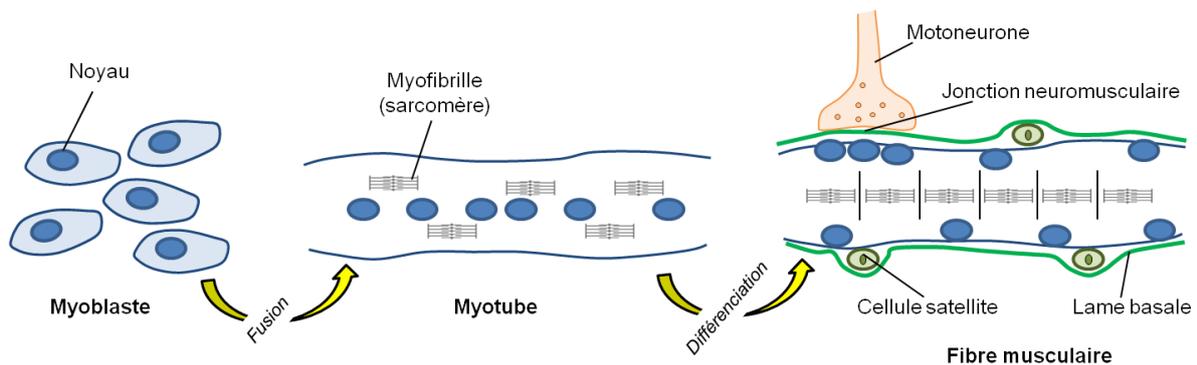


Figure 3 : La différenciation myogénique. Représentation schématique de la myogenèse d'une fibre musculaire. Dans un premier temps les myoblastes vont fusionner entre eux pour donner naissance à un myotube. Les noyaux sont alors alignés au centre du myotube et les myofibrilles composées de sarcomères (unité contractile) sont immatures et non organisées. Dans un deuxième temps, le myotube se différencie en une fibre musculaire. A ce stade là, les noyaux migrent à la périphérie de la fibre et les myofibrilles matures sont précisément organisées au centre de la fibre. Les fibres musculaires sont également innervées par un motoneurone permettant la transmission du message nerveux à partir de la jonction neuromusculaire. Les cellules satellites quiescentes peuvent être recrutées à tout moment pour régénérer la fibre musculaire. *Adapté de : Le Muscle Squelettique, Juin 2003, Repères Savoir et Comprendre, AFM.*

Chez l'Homme ce n'est que vers la neuvième semaine de la vie embryonnaire que les axones des motoneurones viennent innover les fibres musculaires (Hesselmans et al., 1993), créant la jonction neuromusculaire et permettant la transmission du message nerveux à la base de la contraction.

3) L'organisation d'une fibre musculaire

a) Les myofibrilles et les sarcomères

Au sein de chaque myofibrille on trouve un enchainement de plusieurs sarcomères, structure contractile du muscle donnant l'aspect strié à ces derniers (Figure 4). Chacun des sarcomères est précisément localisés par rapport à son voisin de telle sorte que les lignes Z soient au même niveau.

Un sarcomère est délimité par deux lignes Z lui conférant une longueur d'environ 2,5 μm , longueur pouvant être modifiée suivant le niveau de contraction/relaxation du muscle. Il est composé d'une multitude de protéines nécessaires à son maintien et à son fonctionnement dont 70% sont l'actine et la myosine qui composent les filaments fins et épais, respectivement (Figure 4).

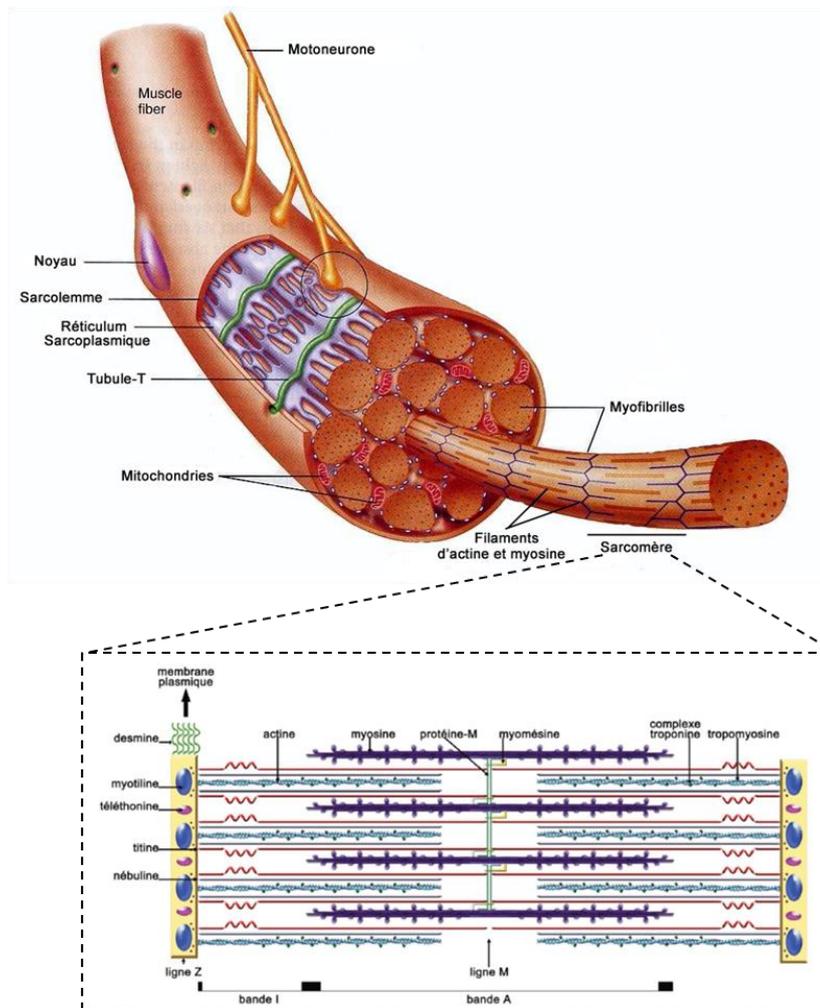


Figure 4 : Organisation d'une fibre musculaire. Les fibres musculaires sont constituées de plusieurs myofibrilles qui comportent les unités contractiles du muscle, les sarcomères. Ces derniers sont composés de différentes protéines comme l'actine et la myosine à la base du raccourcissement du sarcomère lors de la contraction. *Modifié de Germann & Stanfield (2005).*

Au niveau des bandes I (isotrope) dites bandes claires se trouve seulement les filaments fins d'actine alors qu'au niveau de la bande A (anisotrope) ou bande sombre, se trouve un mélange de filaments d'actine et de myosine (Huxley, 1953; Squire, 2016). Les filaments d'actine sont ancrés à la ligne Z constituée d'un complexe macromoléculaire composé de diverses protéines (Faulkner et al., 2001; Granger and Lazarides, 1978) impliquées dans des processus de stabilité du sarcomère, d'alignements des myofilaments ou d'élasticité du sarcomère lors de la contraction/relaxation.

b) Rôle des myofilaments lors de la contraction musculaire

Au moment de la contraction les filaments d'actine et de myosine interagissent et glissent l'un sur l'autre entraînant le raccourcissement du sarcomère et donc du muscle (Figure 5).

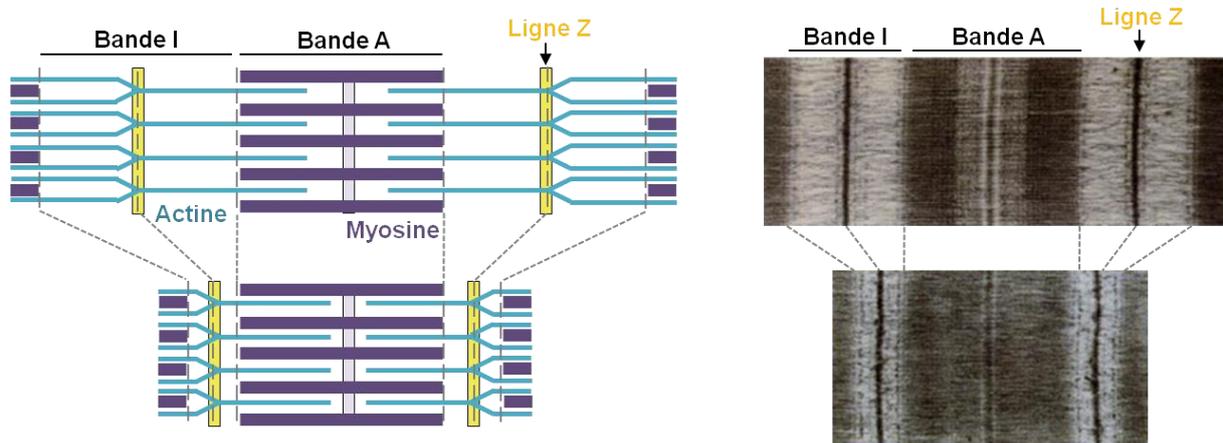


Figure 5 : Structure d'un sarcomère ou unité contractile. Représentation schématique à gauche et image en microscopie électronique à droite d'un sarcomère (délimité par les lignes Z) à l'état de repos et à l'état contracté, avec les différents filaments d'actine et myosine composant les différentes parties du sarcomère.

Ce glissement est réalisé grâce à la structure et l'agencement de ces myofilaments. Au niveau des filaments d'actine, on trouve également des protéines régulatrices : la tropomyosine qui bloque les sites de liaison de l'actine sur la myosine et la troponine composée de 3 sous-unités T, I et C permettant entre autre de lier le calcium et donc d'être responsable de la régulation de la contraction.

Lors d'une contraction, les têtes de myosine vont lier l'actine du filament fin, basculer et entraîner le filament d'actine, ce qui donne lieu au mécanisme de glissement de myofilaments, au raccourcissement du sarcomère et donc à la contraction. Mais ce mécanisme de glissement ne se produit qu'en présence de calcium. En effet, sans calcium, la sous unité I de la troponine est liée à l'actine et interagit avec la troponine T et la tropomyosine, bloquant ainsi les sites de fixations des têtes de myosine. Quand le calcium est présent, la troponine I interagit avec la troponine C, entraînant ainsi leur détachement de l'actine. Les sites de fixations des têtes de myosine sur l'actine sont alors révélés permettant le glissement des myofilaments nécessaire à la contraction musculaire (Potter, 1982)(Alberts et al., 1989).

4) La contraction

a) La jonction neuromusculaire

La contraction des muscles squelettiques est dépendante de la stimulation des muscles par des motoneurones, provenant de la corne antérieure de la moelle épinière, qui les innervent et permettent la transmission de la commande motrice du cerveau (message nerveux) aux muscles (contraction).

Chaque axone de motoneurone se divise en plusieurs ramifications pouvant ainsi innervier plusieurs fibres musculaires. Cet ensemble entre un motoneurone et toutes les fibres qu'il innerve est une unité motrice (Larsson and Ansved, 1995). Avant la naissance, les jonctions neuromusculaires (JNM) sont morphologiquement et fonctionnellement immatures et plusieurs axones de motoneurones peuvent être présents sur une même fibre musculaire. Après la naissance, les motoneurones sont fonctionnels et leurs axones sont myélinisés, les membranes post-synaptiques musculaires s'invaginent et les récepteurs à l'acétylcholine se concentrent au niveau des replis (Sanes and Lichtman, 2001). Chaque fibre musculaire est alors innervée par un seul axone de motoneurone, il y a donc une unique JNM présente par fibre musculaire.

Quand un potentiel d'action est transmis le long de l'axone du motoneurone, celui-ci libère de l'acétylcholine dans la fente synaptique par exocytose. Ce neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs nicotiniques situés sur la membrane plasmique de la fibre musculaire, entraînant ainsi l'entrée de sodium. C'est cette entrée qui permet de dépolariser la membrane musculaire, ainsi le potentiel d'action se propage le long de la fibre musculaire jusqu'aux triades (Liu and Chakkalakal, 2018) (Figure 6).

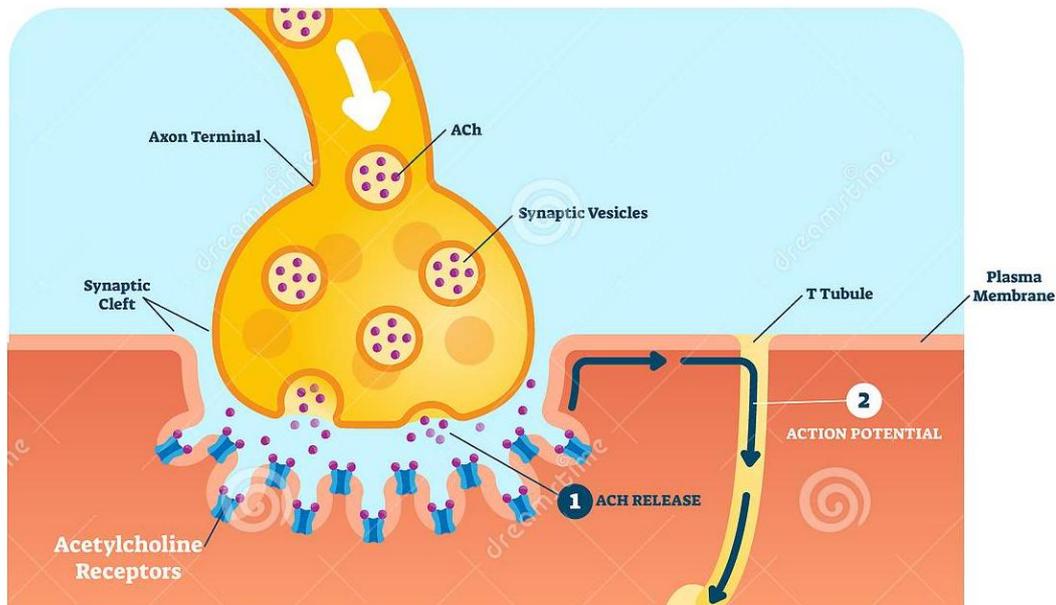


Figure 6 : La jonction neuromusculaire. A l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la synapse du motoneurone, l'acétylcholine, libérée des vésicules synaptiques, va se fixer sur ses récepteurs situés sur la membrane de la fibre musculaire. Ceci permet après ouverture de canaux sodiques situés au niveau de la JNM, la dépolarisation de la membrane musculaire et la propagation du potentiel d'action le long de la membrane, aboutissant ainsi à la contraction musculaire. *Adapté du site <https://urlz.fr/anbB>.*

b) La triade et le couplage excitation-contraction

La propagation du potentiel d'action se fait le long de la membrane musculaire puis le long des tubules-transverses (tubule-t), invaginations de la membrane plasmique, jusqu'à atteindre les triades. Les tubules-t permettent donc au message nerveux de pénétrer au centre de la fibre musculaire.

Les triades, localisées au niveau de la jonction des bandes A-I, sont des structures spécifiques du muscle squelettique composées de trois parties : un tubule-t encadré par deux citernes terminales du reticulum sarcoplasmique (RS) constituant les stocks calciques intracellulaires. Le RS entourant chaque myofibrille est un continuum de membranes constitué de plusieurs sous domaines (Villa et al., 1993) dont le RS jonctionnel qui représente la citerne terminale et le RS longitudinal qui est localisé le long des myofibrilles, entre deux triades, et qui est impliqué dans le repompement du calcium au moment de la relaxation musculaire.

Une fois que le potentiel d'action atteint la triade, il permet l'activation d'un complexe multiprotéique, le complexe de relâchement du calcium (CRC) centré autour de deux canaux calciques le récepteur des Dihydropyridines (DHPR) et le Récepteur de la Ryanodine de type 1 (RyR1). L'activation du CRC permet une sortie massive du calcium des citernes terminales du RS jusque dans le cytoplasme de la fibre musculaire (Figure 7). A ce moment là et comme décrit précédemment (cf. II.3b), le calcium interagit avec la troponine entraînant la libération des sites de fixations des têtes de myosine sur les filaments fins d'actine ce qui permet le raccourcissement des sarcomères. Ce phénomène allant de la stimulation nerveuse au niveau de la JNM jusqu'au glissement des myofilaments et donc à la contraction du muscle, est le couplage Excitation-Contraction (Bers and Stiffel, 1993; Lamb, 2000; Rios and Brum, 1987). Au moment de la relaxation musculaire, le calcium est repompé dans le RS par une pompe ATPase, SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase) localisée au niveau du RS longitudinal (Stammers et al., 2015) (Figure 7).

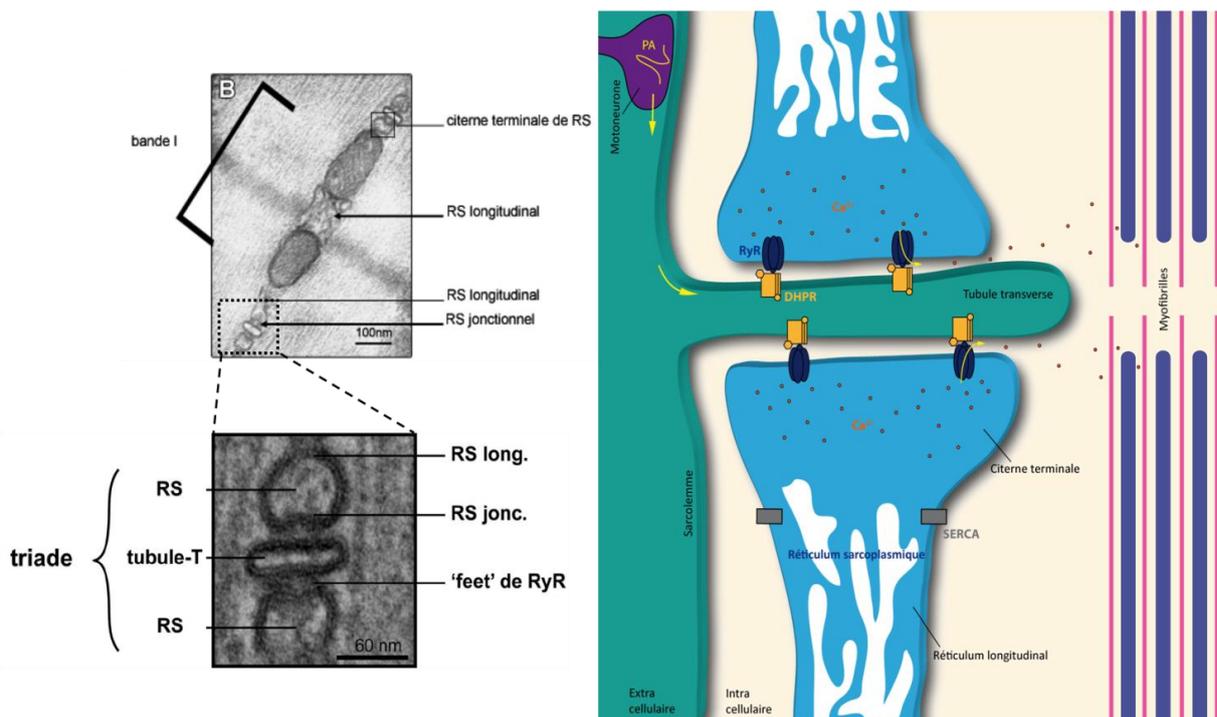


Figure 7 : La triade et les relâchements de calcium. La dépolarisation membranaire se propage jusqu'aux triades entraînant, via le CRC, une sortie massive du calcium des citernes terminales du reticulum sarcoplasmique dans le cytoplasme de la fibre musculaire. Ce calcium interagit avec les myofibrilles permettant la contraction musculaire. Le calcium est ensuite repompé dans le reticulum par SERCA une pompe spécifique localisée au sein du RS longitudinal. Les images de microscopie électronique représentent le RS longitudinal (RS long) et jonctionnel (RS jonc ou citerne terminale) ainsi qu'un zoom sur une triade. Les zones denses aux électrons entre le RS jonctionnel et le tubule-t sont les pieds (feet) de RyR. *Images de microscopie électronique S. Oddoux.*

c) Le complexe de relâchement du calcium

Le principe de couplage excitation-contraction a été étudié dans le muscle squelettique et cardiaque. Il en est ressorti des différences notables entre les deux types de muscles, notamment au niveau du CRC.

Au sein du muscle squelettique

Le CRC, situé dans les triades, est centré autour de deux protéines majeures qui sont des canaux calciques localisés dans deux membranes différentes de la triade. Le Récepteur des Dihydropyridines (DHPR), trouvé au sein de la membrane du tubule-t (Curtis and Catterall, 1984), est un canal senseur de voltage. Il est en contact physique avec le Récepteur de la Ryanodine de type 1 (RyR1) localisé dans les membranes des citernes terminales du RS (Inui et al., 1987). Quand la membrane est dépolarisée, le DHPR subit un changement de conformation qui entraîne l'ouverture de RyR1 et ainsi la sortie du calcium responsable de la contraction. La libération de calcium est donc permise grâce à l'interaction physique entre RyR1 et DHPR (Block et al., 1988; Marty et al., 1994; Rios and Brum, 1987). C'est pourquoi dans le muscle squelettique on parle d'un couplage VICR (Voltage Induced Calcium Release) (Lamb, 2000).

Un faible courant calcique passant par le DHPR, une fois celui-ci activé, a également été montré dans les cellules de mammifères (Donaldson and Beam, 1983) alors que ce même courant n'est pas présent dans le muscle squelettique d'autres espèces comme le poisson (Schredelseker et al., 2010). Cependant le bon fonctionnement du couplage excitation-contraction est indépendant de cette entrée extracellulaire de calcium (Armstrong et al., 1972; Gonzalez-Serratos et al., 1982).

Au sein du muscle cardiaque

Dans le muscle cardiaque, le CRC se situe au niveau des diades, structures uniquement composées d'une citerne terminale du RS accolée à un tubule-t.

Le CRC centré autour du DHPR et du RyR de type 2 (RyR2) fonctionne selon un couplage CICR (Calcium Induced Calcium Release) (Bers, 2002). En effet, RyR2 et DHPR sont proches spatialement mais n'interagissent pas l'un avec l'autre. La dépolarisation membranaire, une fois propagée jusqu'aux diades, entraîne l'ouverture du DHPR et c'est l'influx calcique extracellulaire à travers le DHPR qui va permettre l'activation de RyR2, son ouverture et la sortie massive du calcium des citernes terminales.

5) La formation de la triade

a) Le reticulum sarcoplasmique

Chaque myofibrille est entourée par du reticulum sarcoplasmique (RS) qui est une forme spécialisée de reticulum endoplasmique (RE), spécifiquement dédié au stockage et à la libération du calcium nécessaire pour la contraction musculaire. Comme expliqué précédemment, c'est le RS jonctionnel ou citerne terminale qui contient les protéines du CRC et qui est impliqué dans le stockage et la libération du calcium alors que le RS longitudinal est impliqué dans son repompage. Comment le RS est-il formé au cours du développement musculaire ?

La biogénèse du RS se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord le RE forme des tubules (30 à 60 nm de diamètre) qui se ramifient ensuite en des branchements réticulaire autour des myofibrilles (Kilarski and Jakubowska, 1979; Luff and Atwood, 1971). Enfin le RS nouvellement formé entre en contact avec un tubule-t provenant de la membrane plasmique pour former la triade (Flucher, 1992).

Durant le stade embryonnaire, le RS est en premier lieu présent sous la forme d'accumulations membranaires désorganisées (Franzini-Armstrong, 2004; Takekura et al., 1994a). Des modifications ont ensuite lieu au cours du développement embryonnaire mais également après la naissance permettant au RS de se développer en un réseau de tubules et citernes structurés et associés à l'appareil contractile (Baumann and Walz, 2001; Franzini-Armstrong, 2004; Rossi et al., 2008; Takekura et al., 2001).

Les deux compartiments du RS sont alors distinguables l'un de l'autre (Villa et al., 1993) : le RS longitudinal composant la majorité de la surface du RS et le RS jonctionnel faisant parti des triades. La majorité des membranes du RS longitudinal sont localisées au niveau de la ligne Z même si une partie mineure est aussi présente au niveau de la bande M (Kaisto and Metsikkö, 2003; Porter and Palade, 1957). Ces observations ont également été appuyées par les travaux de Salanova et al., qui montrent que SERCA et le récepteur de l'inositol-trisphosphate (IP3R), principaux constituants de ce compartiment, sont principalement retrouvés au niveau de la ligne Z et de la bande M (Salanova et al., 2002).

Le RS jonctionnel, ou citerne terminale, est impliqué dans le couplage excitation-contraction et la libération du calcium. Les protéines du CRC sont localisées dans le RS jonctionnel et elles sont visibles au microscope au début de la différenciation musculaire, sous la forme de clusters sans lien particulier avec l'appareil contractile. Plus tardivement, ces clusters vont converger au niveau de l'interface des bandes A-I (Flucher, 1992; Franzini-Armstrong, 2004) pour atteindre une organisation spécifique en doubles rangées de points. Ce n'est qu'une fois formé que le reticulum s'associera avec un tubule-t et formera ainsi la triade (Rossi et al., 2008) (Figure 8).

Chez la souris c'est dès le stade embryonnaire E14 que le RS est détecté avec des clusters de RyR localisés en périphérie. A E16, ces clusters sont éparpillés dans tout le myotube. Entre E17 et E18, le RS jonctionnel devient transverse et les clusters du RyR s'organisent en double rangées de points à l'interface des bandes A-I. Dès E16-E18, les citernes terminales commencent à se remplir de RyR, on parle de pieds ou « feet » du RyR qui sont visibles en microscopie électronique et correspondent à des densités localisées dans l'espace entre la membrane des citernes terminales et du tubule-t (Takekura et al., 2001).

Il a été démontré que le RS longitudinal et le RS jonctionnel s'organisent en parallèle l'un de l'autre. Leur organisation est accompagnée par des changements dans les propriétés dynamiques des protéines les constituant. C'est à la suite de l'organisation du RS longitudinal que le RS jonctionnel établit des interactions avec l'appareil contractile et s'aligne au niveau de la transition des bandes A-I (Cusimano et al., 2009).

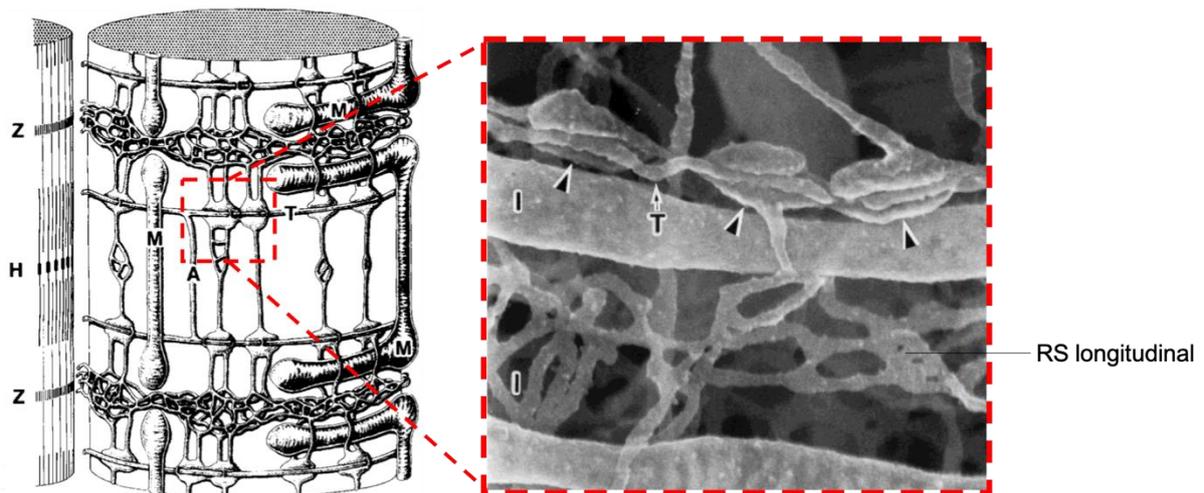


Figure 8 : Réseau de reticulum sarcoplasmique au sein d'une cellule musculaire. Le reticulum forme un réseau entourant chaque myofibrille. Il est constitué de deux compartiments : le RS jonctionnel (tête de flèche), stock calcique intracellulaire, est localisé au niveau de l'interface des bandes A-I. Le RS longitudinal est quant à lui un dense enchevêtrement de tubules reliant les RS jonctionnels entre eux. T = tubule-t ; M = Mitochondrie ; Z et H = lignes Z et H du sarcomère ; A et I = bandes A et I du sarcomère. *Modifié de (Ogata and Yamasaki, 1997).*

Certaines protéines localisées au niveau du RS jonctionnel sont nécessaires pour la formation et le maintien des triades. C'est le cas de la junctophiline et de la mitsugumine 29.

Les membres de la famille des junctophilines sont des composants des membranes jonctionnelles où elles font le lien entre le RE/RS et la membrane plasmique/tubule-t. Quatre isoformes, provenant de gènes différents, existent : JPH1 principalement retrouvée au sein du muscle squelettique, JPH2 est également localisée dans le muscle squelettique mais c'est l'isoforme majoritaire au niveau du muscle cardiaque et JPH3 et 4 sont présentes dans le cerveau (Nishi et al., 2003; Takeshima et al., 2000).

L'utilisation d'un modèle de souris déficiente pour JPH1 a montré que les animaux meurent rapidement à la naissance des suites d'un défaut musculaire de leurs mâchoires entraînant des problèmes pour téter. Ces souris ont également des triades moins nombreuses et anormales avec un RS jonctionnel gonflé et une orientation irrégulière, donnant lieu à des défauts du couplage excitation-contraction (Ito et al., 2001; Komazaki et al., 2002). JPH1 aurait donc un rôle prépondérant dans la biogénèse et le maintien des membranes jonctionnelles (Takeshima et al., 2000). Cette hypothèse est supportée par les observations montrant que la formation des

triades est réduite dans différents muscles JPH1 KO et que l'expression de JPH1 et la formation des triades sont augmentées après la naissance (Ito et al., 2001). Il a de même été démontré que JPH1 est impliquée dans l'ancrage des protéines du CRC à la triade par les différentes interactions qu'elle a, entre autre, avec DHPR, RyR1 ou la cavéoline-3 (Golini et al., 2011; Landstrom et al., 2014; Nakada et al., 2018; Phimister et al., 2007).

La mitsugumine 29 (MG29) serait impliquée dans la jonction des membranes formant la triade. C'est une protéine transmembranaire enrichie au niveau du RS. Elle est exprimée très tôt pendant le développement musculaire, avant la présence des triades. En effet, MG29 est tout d'abord retrouvée associée au RS en formation puis plus tardivement aux triades. Les souris MG29 KO présentent des défauts dans l'homéostasie calcique intracellulaire ainsi qu'une altération de la morphologie des triades qui montrent un RS gonflé et des tubules-t longitudinaux (Brotto et al., 2004; Komazaki et al., 2001). MG29 aurait donc un rôle dans la formation précoce du RS jonctionnel et sa connexion avec le tubule-t (Komazaki et al., 1999).

b) Le tubule-t

Les tubules transverses (tubule-t) sont des invaginations de la membrane plasmique uniquement trouvées dans les muscles striés (Franzini-Armstrong and Porter, 1964). Ils sont prépondérants dans le couplage excitation-contraction compte tenu du fait qu'ils permettent à la dépolarisation de se propager jusqu'au centre de la fibre musculaire permettant ainsi la contraction. La composition protéique des tubules-t est différente de celle du RS et sa composition lipidique est également spécifique étant donné qu'elle a été montrée comme plus riche en cholestérol que celle du RS et de la membrane plasmique et que son contenu en phospholipides était deux fois supérieur à celui du RS et de la membrane plasmique (Pediconi et al., 1987; Roseblatt et al., 1981).

Des études effectuées chez la souris et le poulet ont permis de montrer que la biogénèse du tubule-t se produit plus tard que celle du RS (Flucher et al., 1993; Takekura et al., 2001). Chez la souris, dès le stade embryonnaire E15, des petits cylindres s'invaginant à partir de la membrane plasmique sont observés, ce sont les premiers tubules-t bien définis. A E16 ils restent majoritairement longitudinaux mais

s'invaginent plus profondément au cœur de la cellule musculaire. Entre E17 et E19, ils ont envahi toute la myofibre et certains commencent à s'orienter transversalement. Ce n'est qu'à partir de trois semaines post-natal que la maturation finale est atteinte et que les tubules-t sont alors orientés transversalement (Flucher et al., 1993; Franzini-Armstrong, 1991; Takekura et al., 2001) (Figure 9).

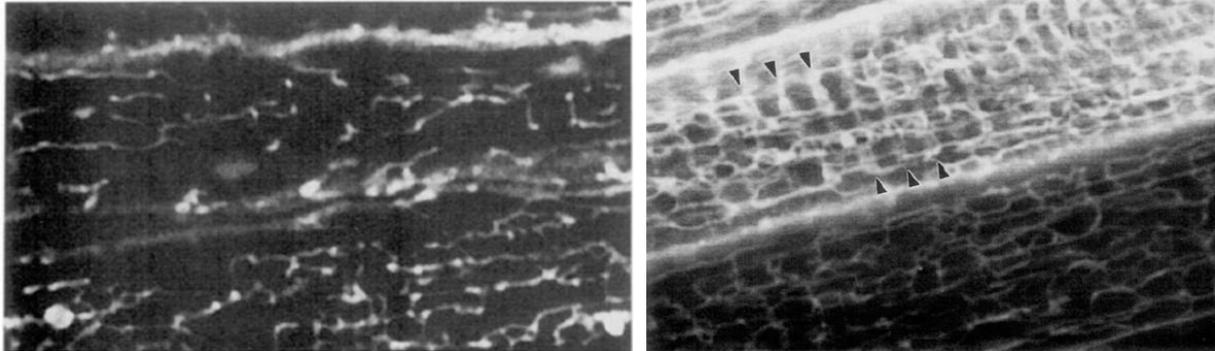


Figure 9 : Biogénèse des tubules-t. Fibres musculaires de poulet à E16 (gauche) ou E21 (droite) marquées au DiI_{C16} (sonde lipophile colorant les membranes). Les tubules transverses sont majoritairement longitudinaux au cours du développement embryonnaire puis prennent une orientation transversale au fur et à mesure pour constituer un réseau mature trois semaines après la naissance. Images tirées de (Flucher et al., 1993).

De plus, différentes protéines semblent être impliquées dans la biogénèse du tubule-t.

Tout d'abord, les cavéolines sont une famille de protéines nécessaire à la formation des cavéoles. Ces dernières sont des petites invaginations de la membrane plasmique de 50 à 80 nm de diamètre, ayant un rôle dans le transport vésiculaire et la transduction du signal (Lisanti et al., 1994). Les cavéoles ont une composition lipidique unique et semblant similaire à celle du tubule-t, étant donné qu'elles comportent du cholestérol et des sphingolipides (Smart et al., 1999). Chez les mammifères, la famille des cavéolines est composée de trois membres. Les cavéolines-1 et 2 sont principalement localisées au niveau des adipocytes et la cavéoline-3 est retrouvée dans le muscle strié avec une expression augmentant au cours de la différenciation musculaire (Al-Qusairi and Laporte, 2011; Tang et al., 1996). Elle peut lier le cholestérol, et est présente au niveau de la membrane plasmique et des tubules-t en développement (Parton et al., 1997). Elle pourrait donc participer à la biogénèse de ces structures. De plus, les souris cavéoline-3 KO présentent des tubules transverses dilatés et principalement longitudinaux

témoignant du rôle de la cavéoline-3 dans la biogénèse des tubules-t (Galbiati et al., 2001).

La deuxième protéine potentiellement impliquée dans la biogénèse du tubule-t est l'amphiphysine II, une protéine ubiquitaire encodée par le gène BIN1. C'est une protéine qui possède un domaine BAR pouvant lier les phosphoinositides comme le PI(4,5)P2 et le PI4P (Kojima et al., 2004) et qui permet de courber les membranes (Lee et al., 2002; Prokic et al., 2014). On la trouve fortement exprimée dans les tubules-t suggérant un possible rôle dans la biogénèse de ce dernier. Elle peut lier N-WASP pour la régulation du cytosquelette d'actine et aurait également un rôle dans le positionnement et la forme du noyau via l'implication de la nesprine 2 et du cytosquelette de microtubules (D'Alessandro et al., 2015; Falcone et al., 2014). L'absence de BIN1 chez la drosophile donne lieu à des défauts des muscles squelettiques avec notamment une altération de la morphologie des tubules-t ainsi que des défauts dans le couplage excitation-contraction (Razzaq et al., 2001). De la même façon les biopsies de patients ayant des mutations de BIN1 montrent une morphologie anormale des tubules-t (Toussaint et al., 2011). Ces résultats appuient donc l'idée que Bin1 participerait bien à la formation des tubules-t. Cependant et de façon surprenante, les souris KO pour BIN1 meurt dans la période périnatal de cardiomyopathies et ne semblent pas présenter pas de défauts dans leurs muscles squelettiques. Néanmoins une analyse détaillée en microscopie électronique des muscles squelettiques n'a pas été réalisée (Muller et al., 2003).

La dysferline peut lier le calcium et est impliquée dans les mécanismes de fusion et réparation membranaire dépendant du calcium (Al-Qusairi and Laporte, 2011). Elle est située au niveau de la membrane plasmique des cellules musculaires (Bansal et al., 2003). Certaines études réalisées sur des cultures de C2C12 ou dans des muscles adultes de rat ont montré que la dysferline est également retrouvée au niveau des tubules-t puis est transloquée à la membrane plasmique à la suite d'une altération de celle-ci (Klinge et al., 2010, 2007). Actuellement le rôle de la dysferline dans la biogénèse du tubule-t n'est pas entièrement établi mais il a été suggéré qu'elle aurait un rôle dans la fusion des cavéoles avec les tubules-t, grâce à son interaction connue avec le DHPR et avec la cavéoline-3 (Al-Qusairi and Laporte, 2011; Hernández-Deviez et al., 2006). Les souris KO pour la dysferline ont

également des défauts similaires à ceux trouvés dans les souris cavéoline-3 KO (Klinge et al., 2010).

Enfin, la mitsugumine 53 (MG53) a été identifiée comme un acteur clé dans le trafic membranaire intracellulaire et dans la réparation membranaire du muscle strié (Cai et al., 2009b; Wang et al., 2010). MG53 peut lier la dysferline et la cavéoline-3 (Cai et al., 2009b, 2009a) mais aucune étude à ce jour n'a démontré l'implication de la MG53 dans la biogénèse des membranes triadiques (Al-Qusairi and Laporte, 2011).

Le Muscle squelettique est un tissu complexe composé de différents domaines fonctionnels extrêmement bien organisés les uns par rapport aux autres. Ainsi le couplage excitation-contraction ne peut pleinement fonctionner que si la formation des structures membranaires est aboutie et que le Complexe de Relâchement du Calcium y est correctement adressé.

Chapitre 2 : Les protéines du Complexe de Relâchements du Calcium

Au sein du muscle squelettique le complexe de relâchement du calcium (CRC) est le complexe macromoléculaire nécessaire à la sortie du calcium et à la contraction musculaire. Ce complexe centré autour de deux canaux calciques, le récepteur de la Ryanodine de type 1 (RyR1) et le récepteur des Dihydropyridines (DHPR), couplés physiquement bien que localisés dans deux membranes différentes (membranes des citernes terminales et du tubule-t), est également composé d'autres protéines importantes pour le couplage excitation-contraction et pour la libération de calcium. Parmi ces protéines se trouve la calséquestrine, la junctine, la triadine, la calmoduline et FKBP12 (Figure 10).

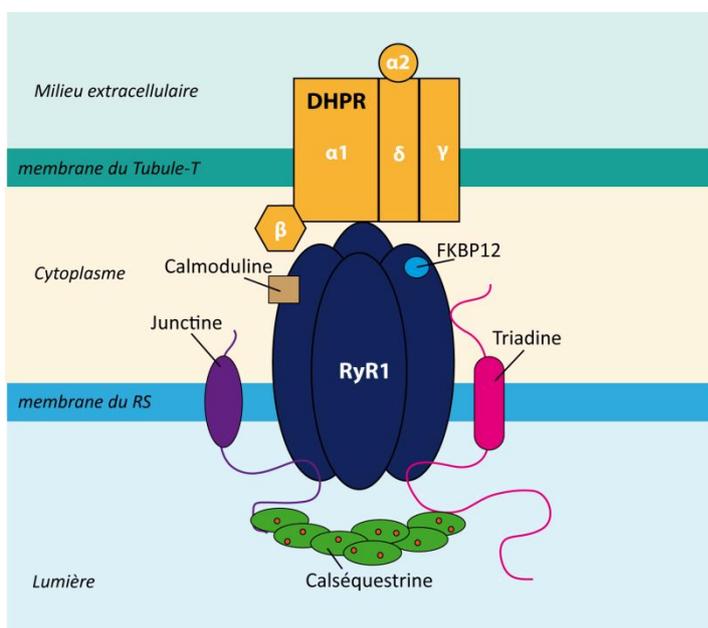


Figure 10 : Complexe de Relâchement du Calcium au sein du muscle squelettique. Complexe macromoléculaire centré autour de deux canaux calciques physiquement couplés: RyR1 et DHPR, chacun localisé dans des membranes différentes. D'autres protéines composent également ce complexe et sont importantes pour sa régulation et pour la libération du calcium.

I. Les protéines majeures : deux canaux calciques

1) Le Récepteur des Dihydropyridines (DHPR)

a) Topologie

Le DHPR est un canal calcique voltage-dépendant ayant un rôle de senseur du voltage membranaire (Mikami et al., 1989; Tanabe et al., 1987). Il est localisé à la membrane plasmique et enrichi dans les membranes des tubules-t des muscles squelettiques et cardiaques.

Le DHPR est un hétéropentamère composé de cinq sous-unités : $\alpha 1s$ (ou Cav1.1), $\alpha 2\text{-}\delta$, $\beta 1$ et γ dans le muscle squelettique (Figure 11). Dans le muscle cardiaque, ce sont $\alpha 1c$ (ou Cav1.2) et $\beta 2$ qui sont présentes au lieu de $\alpha 1s$ et $\beta 1$ (Perez-Reyes et al., 1990).

Les sous-unités $\alpha 2\text{-}\delta$, $\beta 1$ et γ sont des sous-unités auxiliaires servant de modulateurs des propriétés du canal (Catterall, 2011). Elles sont liées de façon non covalente à $\alpha 1s$ et modulent ses propriétés biophysiques et son adressage à la membrane plasmique (Dulhunty et al., 2002). Les sous-unités $\alpha 2$ extracellulaire et δ , transmembranaire, sont reliées par des points disulfures. La sous-unité γ est composée de quatre domaines transmembranaires mais ne semble pas impliquée dans le couplage excitation-contraction car en son absence la transduction du signal entre le tubule-t et le RS (de la dépolarisation membranaire à la contraction musculaire) n'est pas affectée (Ursu et al., 2001). La sous-unité β est quant à elle retrouvée dans le cytoplasme où elle interagit avec $\alpha 1s$ par la boucle I-II de cette dernière (Serysheva et al., 2002).

La sous-unité $\alpha 1s$ est à la fois le pore du canal et le senseur du voltage initiant le couplage excitation-contraction (Rios and Brum, 1987; Tanabe et al., 1988). Ses parties N et C-terminales sont situées dans le cytoplasme et constituent le pore du canal. Cette sous-unité contient 4 répétitions (de I à IV) d'un motif homologue de six domaines transmembranaires reliés par des boucles cytoplasmiques. Les 4^{èmes} segments transmembranaires des motifs homologues sont constitués de 3 à 5 arginines et 1 à 2 lysines par segment, leur permettant d'être chargés positivement et de réagir à la dépolarisation membranaire (Figure 11). Au moment de celle-ci, les charges sont attirées vers l'extérieur de la membrane, ce qui entraîne le changement de conformation du DHPR permettant son ouverture et l'entrée de calcium au travers du pore (Ríos et al., 1992).

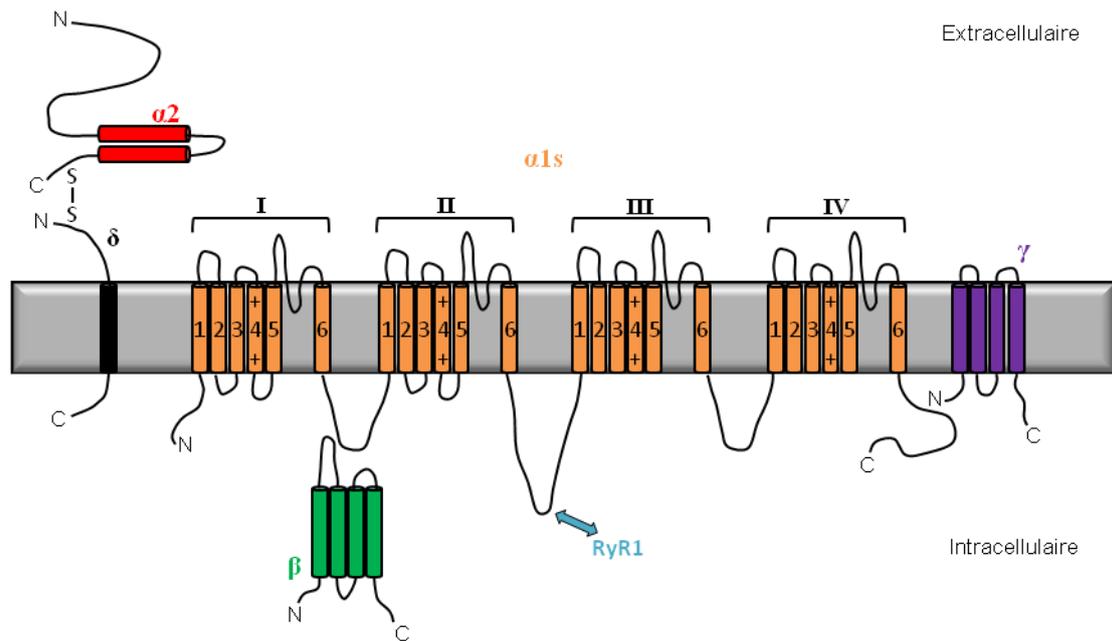


Figure 11 : Topologie du DHPR. Schéma représentant les différentes sous-unités du DHPR, leurs localisations ainsi que le site principal de l'association DHPR-RyR, indispensable au couplage excitation-contraction.

b) Interaction DHPR-RyR1

Dans le muscle squelettique, le DHPR interagit physiquement avec RyR1 (Block et al., 1988; Marty et al., 1994) grâce à plusieurs sites interactions. La partie C-terminale de $\alpha1s$ ainsi que les boucles I-II et III-IV semblent impliquées dans l'interaction entre les deux protéines mais c'est la boucle II-III qui est un acteur majeur de cette association et qui est donc nécessaire au couplage excitation-contraction (Cui et al., 2009; Dulhunty et al., 2002; Nakai et al., 1998; Tanabe et al., 1990a). L'interaction précise DHPR-RyR1 a été montrée comme dépendante de leur alignement géométrique (Protasi et al., 1998; Takekura et al., 1994b).

Le DHPR s'organise en tétrades (groupe de 4 DHPR): une sur deux est située en face d'un RyR (Block et al., 1988). Ainsi chaque DHPR se retrouve en face d'un monomère de RyR et donc certains RyR ne sont pas couplés à des DHPR. Il a d'abord été suggéré que ces canaux RyR non-couplés seraient activés par CICR à la suite de l'activation d'un complexe DHPR-RyR (Rios and Pizarro, 1988). Maintenant, il semblerait plutôt que ces RyR non-couplés constitueraient une réserve structurelle

pouvant se coupler à des DHPR, et être impliqués dans des couplages excitation-contraction fonctionnels, quand nécessaire (Ríos et al., 2019) (Figure 12).

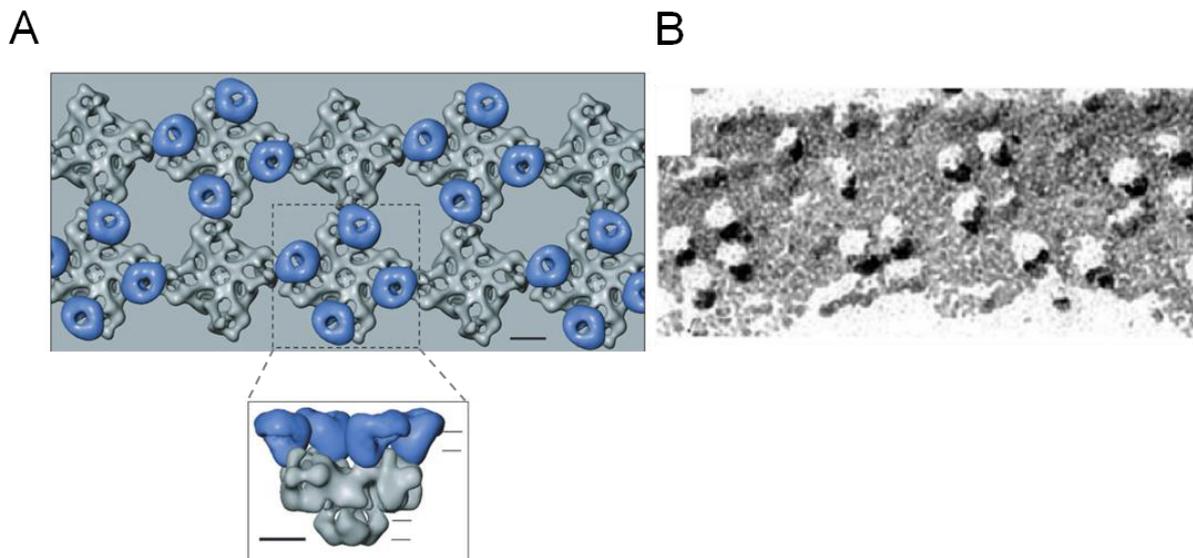


Figure 12 : Couplage physique RyR1-DHPR et formation des tétrades. (A) Modèle de couplage physique entre RyR1 et DHPR dans le muscle squelettique. Reconstitution 3D présentant la vue du cytoplasme (en haut) ou de côté (en bas). RyR1 est en gris et DHPR présent sous forme de tétrades est en bleu. Les deux canaux calciques sont physiquement associés. Les tétrades du DHPR sont en face d'un RyR sur deux. Sur la vue de côté, les lignes horizontales représentent la position des membranes du tubule-t au niveau du DHPR et la membrane du RS au niveau de RyR1. Barre d'échelle représentant 100 Å. **(B)** Images de tétrades de DHPR en freeze-fracture. *Modifié de (Ríos et al., 2019; Serysheva, 2004).*

c) Modèles animaux et mutations

Les souris dysgéniques, c'est-à-dire sans sous-unité $\alpha 1s$ (mutation dans le gène CACNA1S) ainsi que les souris KO pour la sous-unité $\beta 1$ meurent à la naissance de problèmes respiratoires, le couplage excitation-contraction n'étant pas fonctionnel chez ces animaux (Gregg et al., 1996; Knudson et al., 1989). La réexpression dans les myotubes dysgéniques de la sous-unité $\alpha 1s$ permet de restaurer le couplage, illustrant bien le rôle du DHPR comme senseur du voltage (Tanabe et al., 1990b, 1988). De plus, les cellules dysgéniques ne présentent pas d'altération dans la structure de leurs triades. La formation des triades est donc indépendante de la présence de DHPR.

Des mutations ont été identifiées chez l'Homme dans la sous-unité $\alpha 1s$ du DHPR. Ces mutations génèrent une paralysie périodique hypokaliémique (mutation dans les domaines II ou IV) ou hyperthermie maligne (mutation dans la boucle III-IV) (Monnier et al., 1997; Ptáček et al., 1994).

2) Le Récepteur de la Ryanodine

a) Les différentes isoformes

Le récepteur de la Ryanodine (RyR) compte trois isoformes RyR1, RyR2 et RyR3, issues de 3 gènes (Lanner et al., 2010). Bien que ces isoformes aient des séquences proches (65% d'homologie), elles contiennent également des zones de divergences expliquant leurs différences fonctionnelles (Sorrentino and Volpe, 1993).

L'isoforme RyR1 exprimée dans le muscle squelettique, est impliquée dans le couplage excitation-contraction (Giannini et al., 1995; Zorzato et al., 1990). Son ablation est létale (Takeshima et al., 1995, 1994) et l'isoforme RyR3 fonctionnelle dans le muscle squelettique de souris KO RyR1, ne permet pas de compenser l'absence de RyR1 (Protasi et al., 2000; Takeshima et al., 1995), probablement dû à son incapacité à lier le DHPR (Takeshima et al., 1994). RyR2 est retrouvé principalement au sein du muscle cardiaque mais constitue également l'isoforme majoritaire du cerveau (Giannini et al., 1995). Il est nécessaire pour la contraction cardiaque chez l'adulte. En effet, au stade embryonnaire, le cœur des embryons de souris KO RyR2 peut toujours se contracter grâce au calcium passant par le DHPR, mais les embryons ont tout de même des malformations cardiaques et meurent une dizaine de jours après la naissance (Takeshima et al., 1998). RyR3 est une isoforme ubiquitaire mais présents en de plus faibles quantités (Giannini and Sorrentino, 1995). Elle est principalement exprimée durant la période périnatale. En effet, comme le réseau de tubules-t n'est pas entièrement développé durant cette période, RyR3 permettrait de renforcer le mécanisme de CICR (calcium induced calcium release) amplifiant ainsi les libérations calciques de RyR1 (Yang et al., 2001). Pisaniello et al., (2003) détecte RyR3 chez la souris dès la stade embryonnaire E13 (Pisaniello et al., 2003), puis il devient pratiquement indétectable chez l'adulte

(Bertocchini et al., 1997), confirmant son implication dans le développement et la contraction musculaire des cellules néonatales (Tarroni et al., 1997; Yang et al., 2001). Récemment il a été montré via la caractérisation d'un modèle RyR3 KO, que cette isoforme est impliquée dans la fonction des muscles extraoculaires (Eckhardt et al., 2019).

b) Topologie et structure 3D

Le Récepteur de la Ryanodine (RyR) est un homotétramère composé de quatre sous-unités faisant chacune 565 kDa. Chaque monomère contient deux domaines : un domaine C-terminal transmembranaire qui correspond au pore ionique et qui permet d'être en lien avec la lumière du RS, et un domaine N-terminal qui représente 80% de la protéine et qui est nécessaire aux différentes interactions de RyR. Il a été montré que RyR1 interagit par sa partie N-terminale avec le DHPR (Nakai et al., 1996), avec FKBP12, Homer et la calmoduline (Brillantes et al., 1994; Pouliquin and Dulhunty, 2009; Tripathy et al., 1995). Son domaine C-terminal forme un complexe quaternaire avec la junctine, la calséquestrine et la triadine (Zhang et al., 1997). Sa partie N-terminale cytosolique est tellement imposante que des densités sont visibles en microscopie électronique, on parle de « feet » (pieds) de RyR (Block et al., 1988) qui remplissent tout l'espace entre les membranes des citernes terminales et du tubule-t (Figure 13).

Chaque sous-unité du tétramère est constituée de six segments transmembranaires formant le pore du canal, dans la partie C-terminale de RyR. Une boucle est située entre les domaines transmembranaires 5 et 6 permettant de constituer le filtre de sélectivité ionique (Gao et al., 2000; Meur et al., 2007). Il a également été montré que les extrémités N et C-terminales de la protéine étaient cytosoliques (Marty et al., 1994) (Figure 13). Les RyRs peuvent également subir des modifications post-traductionnelles réversibles comme la phosphorylation, la S-nitrosylation ou la S-palmitoylation permettant de moduler leurs activités (Bellinger et al., 2008; Chaube et al., 2014; Sun et al., 2001).

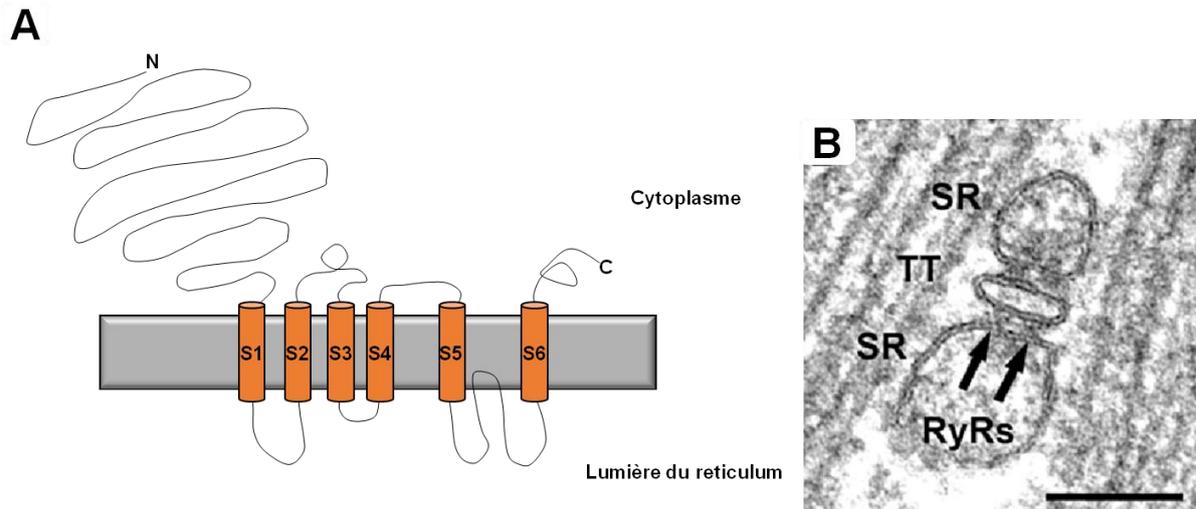


Figure 13 : Topologie de RyR1 et visualisation en microscopie électronique. (A) Représentation schématique de RyR1 illustrant ses parties N et C-terminales cytosoliques ainsi que ses domaines transmembranaires qui composent le pore du canal. (B) Image de microscopie électronique montrant une triade avec les « feet » de RyR1 qui sont visibles dans l'espace jonctionnel entre le reticulum sarcoplasmique (SR) et le tubule-t (TT). Barre d'échelle = 100nm. *Image de microscopie électronique tirée de (Boncompagni et al., 2006).*

La structure 3D du RyR n'est pas encore totalement caractérisée mais de récentes études en cryo-microscopie électronique ont permis d'aller jusqu'à une résolution de 3,8 Å permettant de mieux comprendre comment ce canal ionique fonctionne et interagit avec ses partenaires (Figure 14) (Bai et al., 2016; Efremov et al., 2015; Samsó, 2017; Santulli et al., 2018; Wei et al., 2016; Yan et al., 2015; Zalk et al., 2015; Zalk and Marks, 2017).



Figure 14 : Structure 3D du récepteur de la Ryanodine en cryo-microscopie électronique. De gauche à droite : vue de côté, vue du cytoplasme et vue de la lumière du reticulum sarcoplasmique. En couleur sont représentés les différents domaines d'une sous-unité de RyR. *D'après (Zalk et al., 2015).*

c) Agents régulant l'activité de RyR

Plusieurs agents physiologiques et pharmacologiques sont connus pour moduler l'activité de RyR de façon agoniste ou antagoniste. C'est à partir de 1948 que Rogers et al., ont permis d'identifier RyR par l'utilisation de la ryanodine, un alcaloïde de plante utilisé comme insecticide (Rogers et al., 1948). La ryanodine est un agent se liant de façon spécifique et avec une grande affinité au RyR. Son site de liaison se situerait dans la partie C-terminale proche voire dans le pore du canal (Callaway et al., 1994). A forte concentration (μM) elle bloque RyR dans son état fermé alors qu'à faible concentration (nM) elle le maintient en position semi-ouverte (Callaway et al., 1994). Le calcium a lui un rôle régulateur direct sur RyR. A faible concentration (1 μM), il active RyR alors qu'à concentration plus importante (mM), il l'inhibe (Meissner, 1986; Meissner et al., 1997). La caféine et le 4-chloro-m-crésol (4CmC) sont des agonistes de RyR qui stimulent son ouverture (Rousseau et al., 1988; Zorzato et al., 1993). Le magnésium et le dantrolène sont des antagonistes du canal, ils ont ainsi des propriétés inhibitrices sur l'ouverture de RyR (Meissner, 1986; Rosenberg et al., 2015). Le dantrolène, de par son action inhibitrice, est notamment utilisé lors de crises d'hyperthermie maligne. L'hyperthermie maligne est une maladie pharmacogénétique des muscles squelettiques caractérisée par une réponse hypermétabolique due à l'utilisation d'agents anesthésiques halogénés, avec entre autre une hyperthermie, une tachycardie, une rigidité musculaire et une augmentation de la production de CO₂ et de la consommation en O₂ (Rosenberg et al., 2015). C'est le gène RYR1 qui est principalement retrouvé muté dans l'hyperthermie maligne. Des mutations de ce gène sont également retrouvées dans les myopathies à cores (Monnier et al., 2001).

d) Modèle animal KO RyR1

Les souris KO RYR1 meurent à la naissance d'insuffisance respiratoire due entre autre à l'absence de contraction du muscle du diaphragme (Takeshima et al., 1994). Ces animaux se caractérisent par une dégénérescence de leurs fibres musculaires, une perte du couplage excitation-contraction et des courants calciques entrant par le

DHPR diminués. L'organisation en tétrade du DHPR est également altérée (Takekura et al., 1995). Ces résultats illustrent le fait que RyR1 émet un signal rétrograde vers le DHPR afin d'améliorer son activité et que la présence de RyR1 est nécessaire à l'organisation du DHPR. La réexpression de RyR1 dans les myotubes dyspédiques (RYR1 KO) rétablit le couplage excitation-contraction ainsi que les courants calciques (Nakai et al., 1996). Bien que RyR1 soit un canal calcique massif localisé dans les membranes du RS jonctionnel, son absence n'affecte pas la morphologie du RS jonctionnel et donc les triades sont toujours présentes (Felder et al., 2002). C'est également ce qui a été montré pour les cellules sans DHPR (dysgéniques) (cf. Chapitre 2 I.1c).

II. Les protéines régulatrices

1) FKBP12

Les protéines FKBP sont les récepteurs des drogues immunosuppressives comme la rapamycine ou FK506. Ce sont des protéines d'environ 12 kDa identifiées dès 1989 comme peptide co-purifié avec RyR (Marks et al., 1989). On distingue deux isoformes : FKBP12 retrouvée principalement au niveau du muscle squelettique et FKBP12.6 majoritaire dans le muscle cardiaque (Chelu et al., 2004). Ces protéines sont capables de lier les 3 isoformes de RyR au niveau de leurs régions cytoplasmique et de moduler leurs activités (Brillantes et al., 1994). Il a été montré qu'il y a 4 FKBP12 par RyR ce qui signifie que chaque monomère de RyR est associé à une FKBP12 (Qi et al., 1998).

La liaison de FKBP12 avec RyR est importante pour les relâchements calciques survenant à la suite d'une dépolarisation membranaire (Lamb and Stephenson, 1996). En effet, l'utilisation de modèles de souris KO FKBP12 montrent que les animaux meurent de cardiomyopathie sévère mais ne présentent pas de défauts dans le couplage excitation-contraction. Néanmoins RyR1 et RyR2 sont presque constamment dans un état semi-ouvert (Shou et al., 1998) confirmant que FKBP12 est impliqué dans la stabilisation de l'état fermé de RyR. Pour cela, FKBP12 empêche RyR de s'ouvrir en l'absence de dépolarisation membranaire, ce qui limite

les fuites de calcium du RS, et en améliorant la coopération entre les monomères de RyR, permettant une meilleure conductance du pore une fois ouvert (Brillantes et al., 1994).

2) La Calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine de 17 kDa, ubiquitaire et retrouvée dans les cellules eucaryotes. C'est une protéine pouvant lier le calcium grâce à quatre domaines « EF-Hand » qui la compose (James et al., 1995). Une fois le calcium fixé, la CaM peut changer de conformation permettant ainsi d'activer de nombreuses cibles moléculaires comme la calcineurine ou les CaM-Kinases (CaMK).

Il a été montré que la CaM pouvait lier et réguler les sous-unités $\alpha 1s$ et $\alpha 1c$ du DHPR des muscles squelettiques et cardiaques (Peterson et al., 1999; Tang et al., 2002).

On trouve deux formes de calmoduline : la Ca^{2+} -CaM et l'apoCaM, toutes deux pouvant se lier aux trois isoformes de RyR (Yamaguchi et al., 2005, 2003). Une CaM est liée sur chaque monomère de RyR (Moore et al., 1999) mais différents sites sont impliqués dans la liaison de la Ca^{2+} -CaM ou de l'apoCaM (Samsó and Wagenknecht, 2002).

L'apoCaM est considérée comme un agoniste partiel de RyR alors que la Ca^{2+} -CaM est un inhibiteur du canal (Rodney et al., 2000; Tripathy et al., 1995). En effet pour de faibles concentrations de calcium, de l'ordre du nM, l'apoCaM augmenterait l'activité de RyR1 alors que pour de fortes concentrations (μM) la Ca^{2+} -CaM inhiberait RyR1 (Buratti et al., 1995; Tripathy et al., 1995). La liaison du calcium sur RyR1 augmente son affinité pour l'apoCaM et la Ca^{2+} -CaM et, réciproquement, la liaison de la CaM sur RyR1 augmente son affinité pour le calcium (Tang et al., 2002).

3) La Calséquestrine

a) Les isoformes

La calséquestrine est une protéine de 42 kDa présente dans la lumière du RS. Elle constitue à elle seule environ 30% des protéines du reticulum. Provenant de deux gènes différents, deux isoformes de calséquestrine sont connues : Casq1 et Casq2, présentes dans le muscle cardiaque et squelettique (Campbell et al., 1983; Damiani et al., 1990). Ces deux isoformes ont une séquence similaire à environ 80%. Casq2 est l'isoforme du muscle cardiaque, elle est exprimée dès le stade embryonnaire et est maintenue jusqu'à l'état adulte. Pour le muscle squelettique, au stade embryonnaire et post-natal, c'est Casq2 qui est exprimée puis elle est ensuite remplacée par Casq1 dans les muscles rapides mais reste présente dans les muscles lents en même temps que Casq1. Casq2 aurait un rôle dans la différenciation et la fonction cardiaque mais elle participerait également à la fonction des muscles squelettiques, principalement au cours du développement, tout comme Casq1 (Park et al., 1998).

b) Les différents rôles de la calséquestrine

La calséquestrine est un chélateur de calcium (Beard et al., 2004) qui lie le calcium avec une faible affinité mais une haute capacité par interactions électrostatiques (MacLennan and Wong, 1971). Elle polymérise de façon calcium-dépendante (Wang et al., 1998). A faible concentration de calcium elle est présente sous la forme de monomères puis elle polymérise dès que la concentration calcique augmente (Park et al., 2003). Pour ce faire, les monomères de calséquestrine vont se dimériser pour former des polymères linéaires essentiels à sa rétention dans la lumière du RS (Park et al., 2003; Perni et al., 2013) (Figure 15).

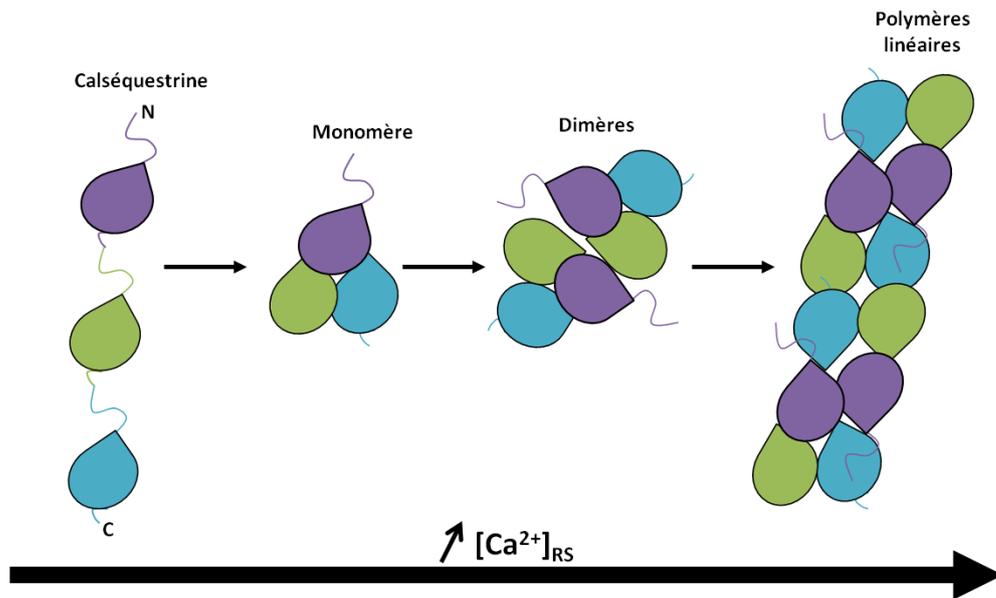


Figure 15: Etapes de polymérisation de la calséquestrine. En absence de calcium, la calséquestrine est dépliée puis plus la concentration de calcium augmente dans le reticulum sarcoplasmique plus la calséquestrine va former des polymères linéaires de haut poids moléculaires.

La calséquestrine est située à proximité de RyR permettant ainsi que le calcium soit rapidement disponible (Franzini-Armstrong et al., 1987; MacLennan and Wong, 1971). Elle aurait une fonction de senseur de calcium pour RyR en modulant ainsi ses relâchements calcique (Beard et al., 2002; Wei et al., 2006). Il a été montré que Casq2 est directement reliée à RyR2 lors de l'expression de ces deux protéines dans des HEK293 (Handhle et al., 2016). Dans le muscle squelettique la calséquestrine serait principalement reliée au RyR par l'intermédiaire de la triadine et de la junctine (Guo and Campbell, 1995; Zhang et al., 1997).

Il a récemment été démontré par des techniques de FRAP, que la mobilité de la calséquestrine augmente lors de la diminution de la concentration de calcium dans le RS (Manno et al., 2017). Ce résultat suggère ainsi que lors de la déplétion des stocks calciques intracellulaires, la calséquestrine se dépolymérise permettant au calcium d'être moins disponible pour RyR, ce qui limite sa libération.

La calséquestrine participerait également à la modulation du SOCE (Store Operated Calcium Entry) grâce à son interaction avec STIM1 (protéine du RS permettant par liaison avec le canal de surface ORAI de faire entrer du calcium externe dans le cytosol) (Shin et al., 2003; Wang et al., 2015). Plus précisément lors de la déplétion

des stocks calciques, la calséquestrine dépolymérise et interagit avec STIM1 bloquant ainsi sa liaison avec ORAI. Elle sert donc de rétrocontrôle négatif sur le SOCE et permet ainsi de diminuer l'activité à fournir par SERCA (Perni et al., 2013).

c) Modèles animaux et mutations

Les modèles de souris KO Casq1 ou Casq2 sont viables et fertiles. Les souris Casq1 KO présentent des symptômes proches de l'hyperthermie maligne (Dainese et al., 2009; Protasi et al., 2009). Au niveau moléculaire, ces souris ont une augmentation du nombre de mitochondries ainsi qu'une importante augmentation dans l'expression de RyR1. Ces défauts pourraient correspondre à un mécanisme compensatoire permettant de contrebalancer le fait que les stocks calciques de ces animaux sont plus faibles et donc que les quantités de calcium libérées par RyR1 sont amoindries. Les souris KO Casq1 présentent également des citernes terminales plates ainsi que des triades multiples et mal orientées (Paolini et al., 2007; Tomasi et al., 2012) (Figure 16).

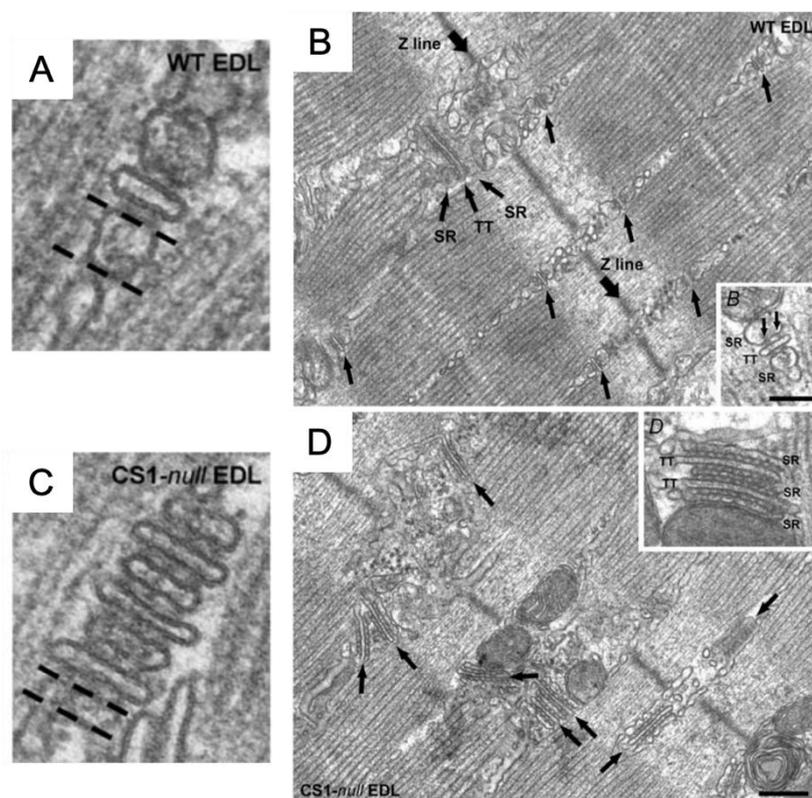


Figure 16 : Altérations détectées dans les muscles EDL des souris KO-Casq1. Images de microscopie électronique présentant les défauts structurels de souris WT ou KO-Casq1. **(A,C)** La largeur des citernes terminales (délimitée par les pointillés) est diminuée dans les souris KO Casq1 (C) par rapport au WT (A). Barre d'échelle = 100 nm. **(B,D)** Des triades mal orientées (flèches) et multiples (zoom) sont observables chez les souris KO Casq1 (D) par rapport au WT (B). Barres d'échelle = 250 nm et 100 nm pour les zooms. Adapté d'après (Paolini et al., 2007).

Les souris KO Casq2 quant à elles sont des modèles d'arythmies cardiaques similaires des TVPC (tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergiques) (MacLennan and Chen, 2009). Dans des conditions basales, la contraction cardiaque est correcte avec de bonnes libérations calciques. Cependant lors de l'exposition aux catécholamines, des contractions ventriculaires prématurées apparaissent témoignant de troubles dans les relâchements de calcium (libérations spontanées et anormales) et donc de fuites calcique (Knollmann et al., 2006). L'expression de la triadine cardiaque et de la junctine (*cf.* Chapitre 2 II.4 et II.5) chute fortement dans ces animaux et aucune compensation par Casq1 n'a été trouvée.

Chez l'Homme, des mutations ont été trouvées dans Casq1 et Casq2. Celles dans Casq2 impacteraient la polymérisation ou l'agrégation de la protéine entraînant comme pour les modèles animaux, une capacité limitée du stockage du calcium et des TVPC (Kim et al., 2007; Leenhardt et al., 2012). Les mutations identifiées dans Casq1 sont principalement retrouvées chez des patients atteints de myopathie à agrégats tubulaires (Lewis et al., 2015; Rossi et al., 2014).

d) Modifications post-traductionnelles

Les deux isoformes Casq1 et Casq2 subissent des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation et la phosphorylation (Cala and Miles, 1992; Lewis et al., 2016). La glycosylation de Casq1 a été montrée nécessaire pour sa polymérisation (Sanchez et al., 2012).

La Caseine Kinase II phosphoryle la calséquestrine (McFarland et al., 2011) ce qui augmente la capacité de liaison du calcium (Sanchez et al., 2011). La phosphorylation de la calséquestrine ne jouerait pas sur son rôle de senseur de calcium de RyR ni sur ses interactions avec la triadine et la junctine (Beard et al., 2005) mais plutôt sur le trafic et la rétention dans le RS de la calséquestrine (McFarland et al., 2011).

4) La Junctine

La junctine est une protéine transmembranaire de 26 kDa localisée dans le RS jonctionnel. Sa structure et sa topologie sont proches de celles de la triadine avec un domaine N-terminal cytosolique de 22 acides aminés, un domaine transmembranaire de 21 acides aminés et un domaine C-terminal luminal de 210 acides aminés (Jones et al., 1995). Sa partie N-terminale lui permet d'interagir avec RyR1 et RyR2 (Li et al., 2015) et sa partie C-terminale contient plusieurs domaines riches en lysine et acide glutamique, dits domaines KEKE, lui permettant de se lier à la calséquestrine, à la triadine et au RyR (Zhang et al., 1997).

La junctine est issue de l'épissage alternatif du gène de l'aspartyl- β -Hydroxylase (Treves et al., 2009). Ce gène, en plus de coder la junctine, code deux autres protéines, la junctate et la β -Hydroxylase.

Les souris KO junctine ont des arythmies fatales et une homéostasie calcique anormale. Les cardiomyocytes provenant de souris KO junctine présentent des problèmes de contractilité (augmentation) pouvant être expliqués par un RyR fuyant (sorties spontanées de calcium) et aboutissant à la mort prématurée des animaux (Yuan et al., 2007). Une autre étude a également montré que dans les cardiomyocytes déficients en junctine, le contenu calcique des stocks est augmenté mais les sorties de calcium par RyR pendant la diastole sont faibles. La junctine affecterait donc la façon dont RyR ressent la charge calcique du RS. En présence de faible concentration de calcium dans le RS, la junctine activerait RyR alors qu'elle l'inhiberait lors de fortes concentrations (Altschafkl et al., 2011).

Lors d'étude de surexpression de la junctine dans des souris, il a été montré que les citernes terminales du RS étaient plus fines avec une densité importante de calséquestrine et des contacts membranaires citernes terminales/tubules-t plus nombreux (Zhang et al., 2001). En plus de son rôle de maintien au niveau du complexe RyR-calséquestrine-junctine-triadine, la junctine serait impliquée dans le maintien du contenu calcique des stocks intracellulaires (Wang et al., 2009). Elle aurait donc un rôle à jouer dans l'organisation structurale des citernes terminales et dans la rétention de la calséquestrine à l'intérieur des citernes, mais son implication serait moindre que celle de la triadine (Boncompagni et al., 2012).

5) La Triadine

a) Les différentes isoformes

La triadine est une protéine membranaire localisée à la triade. Elle a été identifiée à partir de fraction isolée de RS jonctionnel de muscle squelettique de lapin (Brandt et al., 1990; Kim et al., 1990).

La triadine est issue de l'épissage alternatif du gène *TRDN* composé de 41 exons et localisé dans la région 6q22-6q23 chez l'Homme (Thevenon et al., 2003). Le gène *TRDN* code 4 isoformes nommées Trisk (Triadin Skeletal muscle) suivi du poids moléculaire de l'isoforme concernée : Trisk 95 (T95) qui contient 41 exons est la première isoforme à avoir été identifiée, Trisk 51 (T51) contient 21 exons, Trisk 49 (T49) est composée de 20 exons tandis que Trisk 32 (T32) compte 8 exons issus de l'épissage alternatif du gène (Marty et al., 2000; Thevenon et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2005).

T95 et T51 sont les isoformes spécifiques et majoritaires du muscle squelettique localisées dans le RS jonctionnel (Marty et al., 2009). Dans les muscles squelettiques de rat et de souris, les deux isoformes représentent chacune environ 40% de la quantité totale de triadine alors que chez l'Homme c'est T51 qui est l'isoforme principale (60% contre 40% pour T95) (Marty et al., 2009; Thevenon et al., 2003).

T49 est l'isoforme la moins bien caractérisée, elle est faiblement présente dans les muscles de rats et est retrouvée au niveau du RS longitudinal (Vassilopoulos et al., 2005).

T32, aussi appelée CT1 (Cardiac Triadin isoforme 1), est retrouvée dans tout le RS. Dans les muscles squelettiques, elle serait liée à RyR1 (Marty et al., 2009) mais également à l'IP3R qu'elle régulerait (Olah et al., 2011; Vassilopoulos et al., 2005). Cependant son expression majoritaire est au niveau du muscle cardiaque (Kobayashi and Jones, 1999) où elle interagirait avec RyR2 et Casq2 (Kobayashi et al., 2000).

Toutes les isoformes sont composées d'un unique domaine transmembranaire de 21 acides aminés (hélice α) et d'un court domaine N-terminal cytosolique de 47 acides aminés. La partie C-terminale de la triadine est luminale et diffère d'une isoforme à l'autre (Figure 17) (Knudson et al., 1993; Marty et al., 2009, 1995).

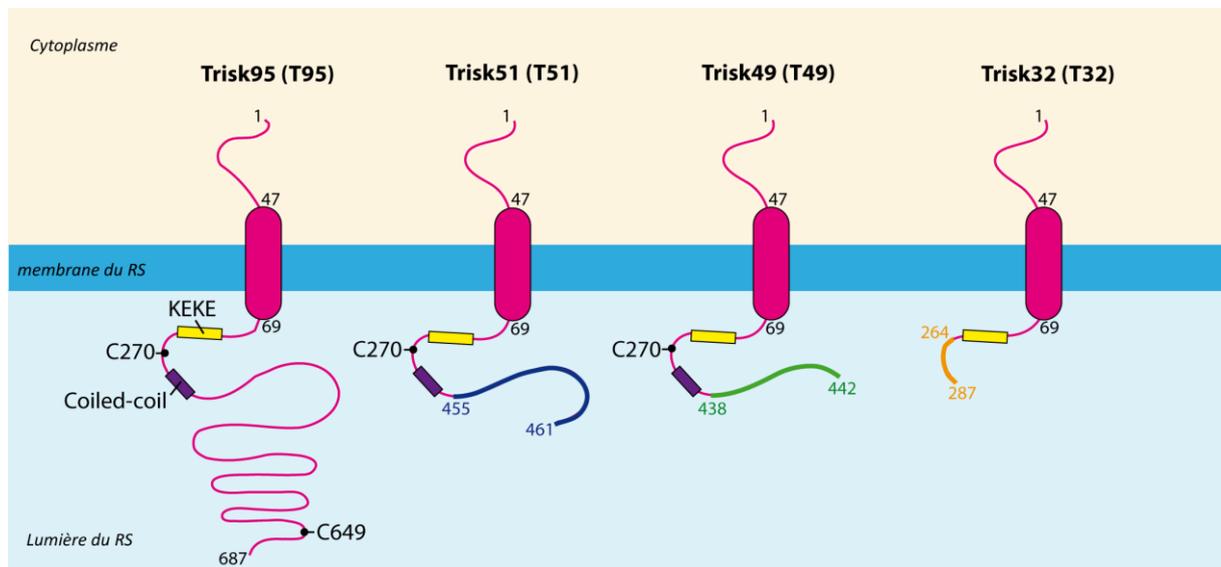


Figure 17 : Les isoformes de Triadine. L'épissage alternatif du gène *TRDN* donne lieu à 4 isoformes localisées dans la membrane du RS jonctionnel. Ces isoformes ont en commun un court domaine N-terminal cytoplasmique et un unique domaine transmembranaire mais elles diffèrent de part la longueur de leurs parties C-terminale luminale et des domaines fonctionnels les composant (KEKE en jaune, Coiled-coil en violet et cystéines C270 et C649). Les parties colorées des extrémités C-terminales représentent les parties spécifiques de chaque isoformes.

b) Domaines fonctionnels et interactions protéiques

La partie C-terminale de la triadine contient plusieurs domaines fonctionnels : un domaine KEKE, un domaine Coiled-coil et des cystéines (Figure 17).

Au contraire de T32 qui ne contient aucune cystéine, T51 et T49 en ont une en position 270 et T95 en compte deux en positions 270 et 649. Ces cystéines sont impliquées dans la formation de ponts disulfures permettant à la triadine de multimériser (Froemming et al., 1999; Marty, 2015). Un domaine Coiled-coil au niveau des acides aminés 330 à 341 a également été trouvé. Dans des cellules non-musculaires, l'utilisation de mutant de la triadine ne possédant ni cystéines ni domaine Coiled-coil n'induit pratiquement pas des déformations des membranes du

reticulum, comme observé pour la triadine WT, ce qui suggère un rôle structural de la triadine via ces domaines fonctionnels (Fourest-Lieuvain et al., 2012).

Toutes les isoformes contiennent un domaine KEKE (acides aminés 210 à 224), domaine composé d'une alternance de lysines et d'acides glutamiques formant un feuillet β chargé positivement (Realini et al., 1994). Ce domaine a été montré comme étant impliqué dans les interactions de la triadine avec les protéines du CRC (Kobayashi et al., 2000; J. M. Lee et al., 2004). Il a été montré que la triadine pouvait lier la calséquestrine (Guo and Campbell, 1995; Kobayashi et al., 2000) et qu'elle permettrait de l'ancrer à la triade, car sans triadine la calséquestrine est retrouvée localisée dans tout le RS (Boncompagni et al., 2012). La triadine s'associerait également avec la junctine pour stabiliser l'ancrage de la calséquestrine à proximité de RyR1 (Zhang et al., 1997).

Une autre interaction importante est celle de la triadine avec RyR1 (Carl et al., 1995b; Knudson et al., 1993) et avec RyR2 (Carl et al., 1995a). Elle lierait RyR par son domaine C-terminal (Guo and Campbell, 1995) mais également par son domaine N-terminal. En effet, grâce à l'utilisation de peptides couvrant les acides aminés 18 à 46 de la triadine, une inhibition de RyR1 incorporé dans une bicouche lipidique a pu être mise en évidence. Cette liaison triadine-RyR1 est calcium-dépendante et donc serait abolie lors de fortes concentrations de calcium (Groh et al., 1999).

Il a été suggéré très tôt que la triadine jouerait un rôle dans le couplage excitation-contraction (Knudson et al., 1993) puis des études ultérieures ont confirmé son rôle majeur (Boncompagni et al., 2012; Goonasekera et al., 2007; Marty, 2014).

La triadine est une protéine pouvant être phosphorylée par la CaMKII au niveau de sa partie cytoplasmique en position 37 (Damiani et al., 1995). Il a également été montré qu'elle subirait une N-glycosylation en position 75 et 625 (Fan et al., 1995; Kobayashi and Jones, 1999; Marty et al., 2000). Cette glycosylation est nécessaire au bon repliement de T32/CT1, sans celle-ci la protéine est dégradée par le protéasome (Milstein et al., 2008).

c) Fonctions de la triadine

Le rôle de la triadine dans l'homéostasie calcique a été démontré par des études de surexpression ou knock-down de la triadine.

La surexpression de T95 par l'utilisation d'adénovirus dans des cultures primaires de rat abolit les relâchements calciques à la suite d'une dépolarisation, sans affecter la fonction de RyR1 ni celle du DHPR, ce qui suggère un découplage entre DHPR et RyR1. Ce n'est par contre pas le cas de la surexpression de T51 qui n'a pas d'effet fonctionnel (Rezgui et al., 2005). T95 et T51 n'ont donc pas la même fonction au sein du muscle squelettique. Il semble cependant qu'elles soient toutes deux impliquées dans le maintien de la structure du muscle puisque leurs surexpressions altèrent la morphologie de la fibre musculaire (Vassilopoulos et al., 2010). La mutation d'acides aminés dans la région de liaison RyR1-Triadine entraîne une diminution de l'amplitude et des cinétiques de relâchements du calcium. Les libérations calciques sont alors bloquées, ce qui suggère que la liaison RyR1-Triadine améliore l'ouverture de RyR1 durant le couplage excitation-contraction (Goonasekera et al., 2007). En 2009, deux études ont présentées des résultats similaires en utilisant des siRNA ciblant la triadine dans des C2C12 ou dans des cœurs de souris délétés du gène *TRDN* (Chopra et al., 2009; Wang et al., 2009).

Pour comprendre le rôle intrinsèque de la triadine, des études ont été entreprises dans l'équipe visant à exprimer T95 par surexpression dans des cellules non musculaires (COS-7). Dans ces cellules, la triadine a été retrouvée localisée dans le reticulum au sein duquel elle induit des déformations majeures. En effet, le reticulum forme alors des tubules en périphérie des cellules, tubules associés aux faisceaux de microtubules (Fourest-Lieuvin et al., 2012). Ce comportement est typique de protéine d'ancrage du reticulum aux microtubules (Vedrenne and Hauri, 2006), suggérant ainsi un rôle structural de la triadine dans le RS via les microtubules. Cette fonction a été confirmée récemment par notre équipe qui montre, en effet, que la triadine ferait le lien entre la triade et les microtubules par l'intermédiaire de Climp63 (Osseni et al., 2016).

d) Les modèles animaux triadine KO et les mutations retrouvées chez l'Homme

Deux modèles de souris *TRDN* KO ont été réalisés par l'équipe de Perez en 2007 et par la notre en 2009 (Oddoux et al., 2009; Shen et al., 2007). Les deux KO ont été créés par excision de l'exon 1 de la triadine et présentent des phénotypes similaires. Les souris sont viables et fertiles et ne diffèrent pas en poids par rapport aux animaux WT. Elles présentent une faiblesse musculaire modérée due à une diminution des relâchements calciques à la suite d'une dépolarisation. Au niveau cardiaque, les animaux présentent des arythmies lors d'un stress adrénergique (Chopra et al., 2009). Les triades ont une morphologie relativement préservées même s'il a été observé en microscopie électronique qu'environ 30% sont orientées longitudinalement. Les citernes terminales sont aplaties. Ce défaut serait dû soit à une diminution des quantités de calséquestrine présente soit à un rôle structural de la triadine dans les courbures de membranes (Figure 18).

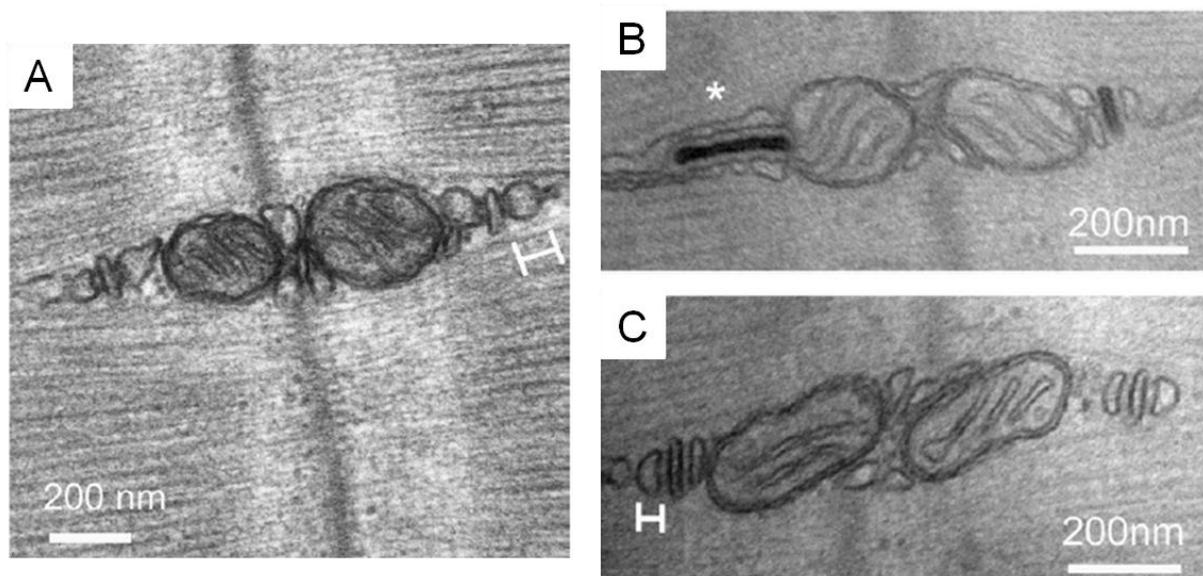


Figure 18 : Altérations détectées dans les muscles EDL des souris triadine KO. Images de microscopie électronique illustrant les défauts d'orientation de certaines triades (étoiles en B) ainsi que la réduction d'épaisseur des citernes terminales du RS (C), observées chez les souris triadine KO (B et C) contrairement aux WT (A). D'après (Oddoux et al., 2009).

Le phénotype cardiaque des souris triadine KO est apparenté à une TVPC (tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergiques). Les TVPC

correspondent à des syncopes et arrêts cardiaques pendant un stress physique ou émotionnel chez le jeune enfant (Lacampagne et al., 2008; Priori and Napolitano, 2005). Cependant chez l'Homme, les TVPC sont majoritairement dues à des mutations dans RyR2 ou Casq2 (70% des cas). Néanmoins en 2012 l'équipe a étudié un groupe de 97 patients atteints de TVPC mais ne présentant pas de mutation dans RyR2 ou Casq2. Trois mutations dans le gène *TRDN* ont alors été identifiées et les patients ayant ces mutations et présentant une faiblesse musculaire modérée, semblent être KO pour la triadine (Roux-Buisson et al., 2012). Ces résultats obtenus chez l'Homme permettent de valider les modèles animaux triadine KO.

Les différentes protéines composant le CRC sont primordiales pour le bon fonctionnement du couplage excitation-contraction et le maintien de la structure des triades. Le cytosquelette de microtubules lié aux triades par l'intermédiaire de T95 et de Climp63 semble également nécessaire pour la mise en place de la triade et donc pourrait être impliqué dans l'adressage et l'ancrage des protéines du CRC à la triade.

Chapitre 3 : Le réseau de microtubules et les MAPs associées

Au sein des cellules, le cytosquelette est un ensemble de filaments leur conférant l'essentiel des propriétés structurales et mécaniques. Le cytosquelette est en effet un élément cellulaire hautement dynamique qui permet aux cellules de se déplacer, d'être polarisées mais également de pouvoir transporter des organites en leur sein. Les filaments qui composent le cytosquelette sont répartis en trois groupes parmi lesquels on trouve les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules.

I. Structure et dynamique des microtubules dans les cellules non différenciées

1) Structure

Les microtubules sont des tubes creux et cylindriques de 25 nm de diamètre localisés dans le cytoplasme des cellules. Ils sont formés par la polymérisation d'hétérodimères de tubulines α et β (Nogales et al., 1999).

Les tubulines α et β sont des protéines globulaires d'environ 450 acides aminés chacune et avec 40% d'homologie de séquence. Chez l'Homme, on compte 7 isoformes de tubuline α , 8 de tubuline β et 2 de tubuline γ (Luduena, 1998). Les tubulines α et β s'assemblent pour former des hétérodimères. L'alternance de ces hétérodimères donne naissance à un protofilament et 13 protofilaments associés en parallèle et décalés d'environ 0,9 nm les uns des autres constituent un microtubule (Chretien et al., 1992) (Figure 19). Les microtubules sont des structures particulières qui peuvent présenter différentes architectures suivant les besoins cellulaires. Ils peuvent être présent sous la forme d'un réseau de microtubules individuels ou se co-aligner entre eux pour former des faisceaux de microtubules.

Les microtubules sont des structures polarisées. Au niveau de leurs bouts (+) ce sont les tubulines β qui sont exposées alors qu'au niveau de leurs bouts (-) ce sont les tubulines α (Mitchison, 1993; Nogales and Wang, 2006) (Figure 19). Au sein d'un faisceau de microtubules, les extrémités (+) ne sont pas nécessairement toutes orientées dans la même direction.

Les dimères d' α et β ont une activité GTPase. Sur chacune des tubulines on trouve un site de liaison permettant ainsi de lier deux GTP par dimères (Mandelkow et al., 1988; Yanagisawa et al., 1968).

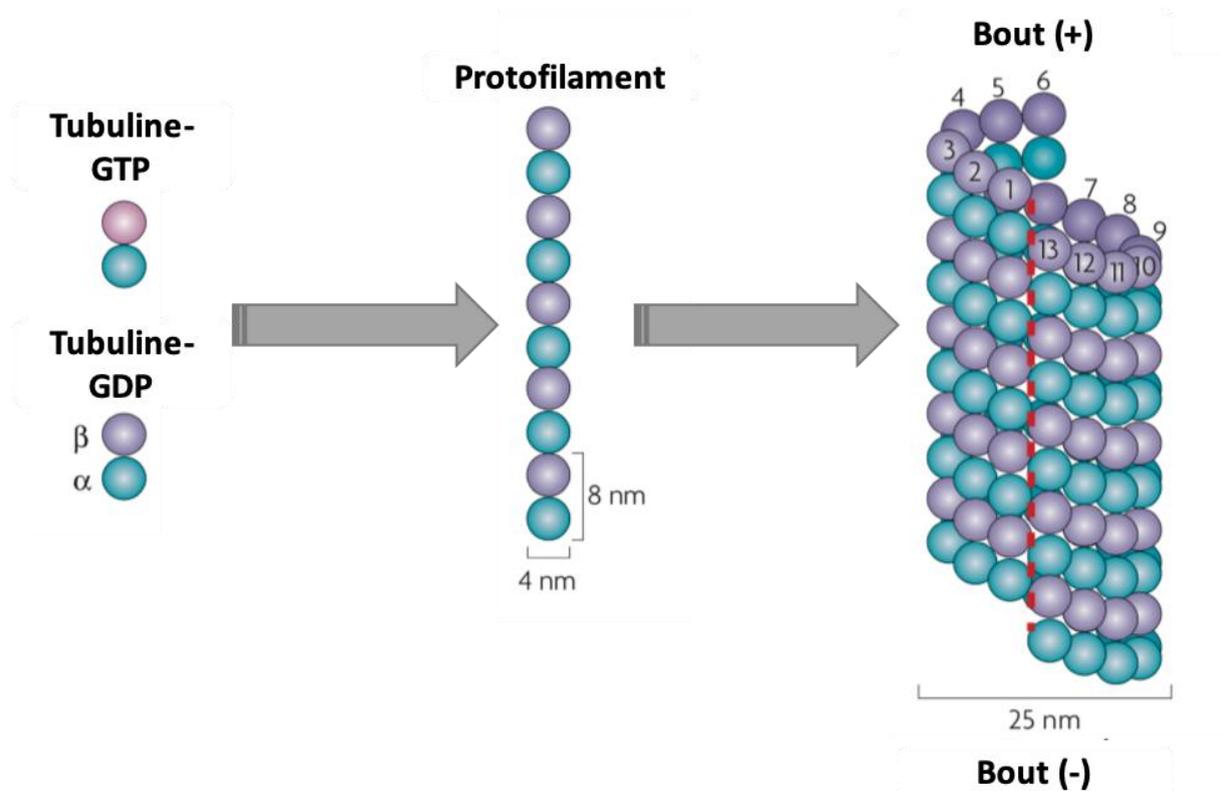


Figure 19 : Formation des microtubules. Schéma des dimères de tubulines α et β s'associant pour former un protofilament. C'est l'assemblage de 13 protofilaments qui forme ensuite le microtubule, tube creux de 25 nm de diamètre, polarisé avec un bout (+) exposant les tubulines β et un bout (-) exposant les tubulines α . *Modifié d'après (Akhmanova and Steinmetz, 2008).*

Les microtubules sont des structures dynamiques, leur croissance se fait aux bouts (+) par ajout de dimères de tubulines (Desai and Mitchison, 1997). Les extrémités (-) peuvent également croître mais de façon moindre (Akhmanova and Hoogenraad, 2015; Walker et al., 1988).

Les bouts (-) sont ancrés au niveau des centrosomes, ce sont les sites de nucléation des microtubules, proche des noyaux (Hyman and Karsenti, 1998), également appelés MTOC (MicroTubule Organizing Centers). Les bouts (+) des microtubules sont orientés vers la périphérie de la cellule.

La localisation des MTOC dépend du type cellulaire et de la tubuline γ . En effet c'est cette dernière qui initie la polymérisation des tubulines α et β (Zheng et al., 1995).

In vitro, il a été montré que les microtubules peuvent s'auto-assembler. L'assemblage des hétérodimères de tubuline a lieu si la concentration de tubuline pure est suffisante (20-40 μM), si du Mg^{2+} et du GTP sont présents, si la température est comprise entre 30 et 37°C et que le pH est proche de 7 (Desai and Mitchison, 1997). L'assemblage se fait en deux étapes. D'abord c'est l'étape de nucléation où les hétérodimères de tubulines s'associent entre eux pour former des oligomères puis c'est l'étape d'élongation dans laquelle les microtubules polymérisent par ajout de dimères libres et le GTP associé à la tubuline β est hydrolysé (Hyman et al., 1992). Le désassemblage correspond à la libération des dimères de tubulines. Il va se produire lors de l'exposition au froid ou lors d'application de drogues dépolymérisantes.

2) Dynamique

Les microtubules ont deux comportements dynamiques, le « treadmilling » (tapis roulant) et l'instabilité dynamique.

Le « treadmilling » correspond au renouvellement des dimères de tubulines qui s'ajoutent au niveau des bouts (+) et se dissocient au niveau des bouts (-). Ce mécanisme permet aux microtubules d'être constamment stables (Margolis and Wilson, 1978; Panda et al., 1999) et peut être observable *in vivo* lorsque les microtubules se détachent du centrosome pour aller vers la périphérie (Rodionov and Borisy, 1997).

L'instabilité dynamique représente la capacité des microtubules de passer d'une phase d'assemblage à une phase de désassemblage, ce qui permet au réseau de microtubules d'être remodelé (Desai and Mitchison, 1997; Mitchison and Kirschner, 1984; Walker et al., 1988). Elle a été mise en évidence en mesurant la longueur des microtubules à l'état stationnaire (Mitchison and Kirschner, 1984). On parle de catastrophe lorsqu'un microtubule se dépolymérise subitement et de sauvetage dans

le cas inverse : le microtubule en cours de dépolymérisation peut reprendre sa croissance. Entre ces deux états, les microtubules peuvent également être en pause (Walker et al., 1988) (Figure 20). L'instabilité dynamique est donc caractérisée par quatre phénomènes : la vitesse de polymérisation et celle de dépolymérisation, la fréquence des événements de catastrophe et de sauvetage.

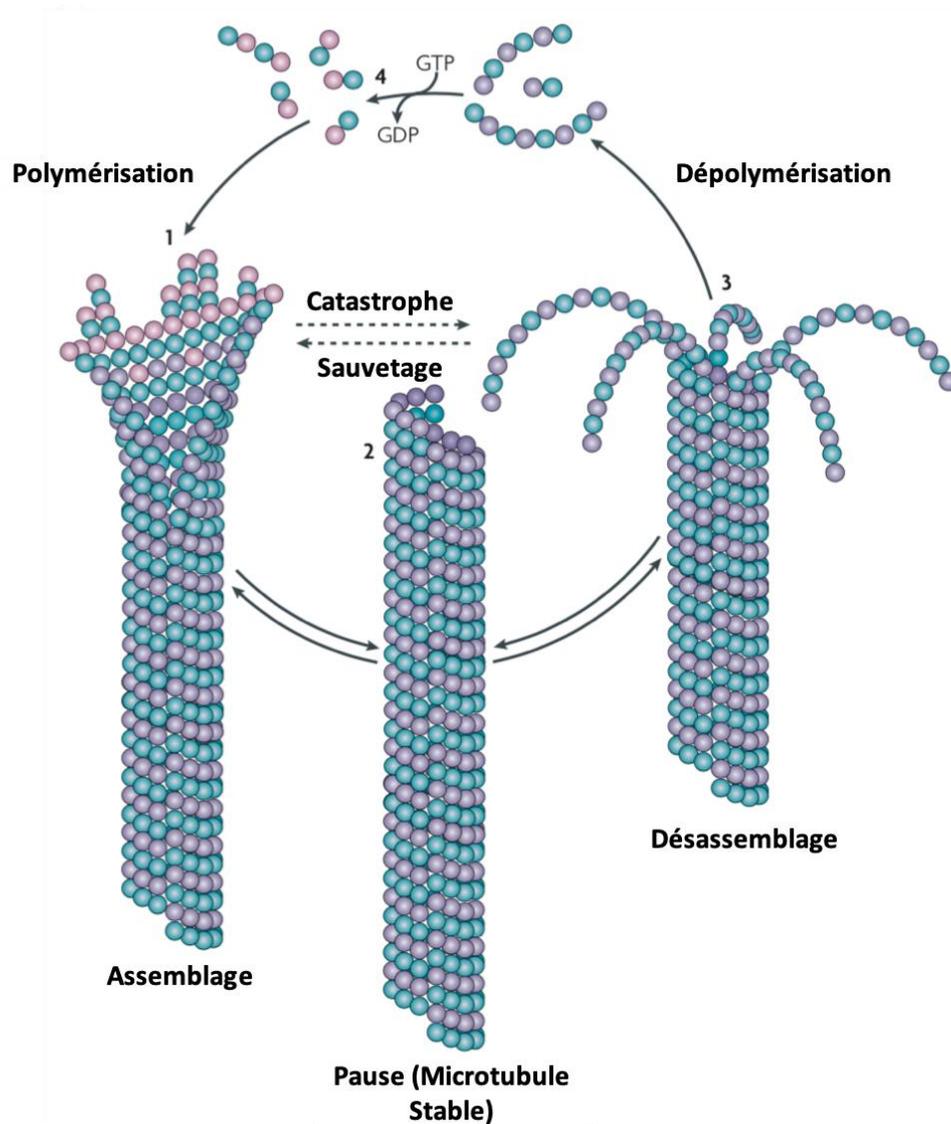


Figure 20 : Cycle de polymérisation/dépolymérisation des microtubules illustrant l'instabilité dynamique. Modifié d'après (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Les différentes phases de l'instabilité dynamique dépendent de la liaison de GTP/GDP sur les dimères de tubulines. La présence du GTP est nécessaire pour l'assemblage et son hydrolyse est requise pour les phases de désassemblage. Le GTP de la tubuline α est non échangeable donc c'est la tubuline β -GTP qui une fois

hydrolysée fournira l'énergie nécessaire (Valiron et al., 2001). Il a été montré que l'utilisation d'un analogue non hydrolysable inhibait le désassemblage des microtubules (Hyman et al., 1992). Le GTP stabilise les contacts latéraux entre les monomères de tubuline ce qui facilite leur assemblage, tandis qu'une fois hydrolysée, le GDP affaiblit les liaisons entre les dimères de tubuline ce qui entraîne un changement dans leur conformation aboutissant à une forme recourbée plus facilement dépolymérisable (Hyman et al., 1995).

Il y aurait une coiffe de GTP présente au niveau des bouts (+) des microtubules, les rendant plus stables et inhibant leur dépolymérisation (Caplow and Shanks, 1996; Dimitrov et al., 2008). Ainsi l'instabilité dynamique correspond à des phases de polymérisations lentes entrecoupées de phase rapide de dépolymérisation.

Les propriétés dynamiques des microtubules leur permettent de se réorganiser constamment suivant les stimuli qu'ils perçoivent.

3) Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles permettent aux protéines associées aux microtubules d'interagir avec eux (Figure 21). Cela confère de multiples fonctions aux microtubules suivant la protéine associée, on parle de « tubuline code » (Janke, 2014; Verhey and Gaertig, 2007).

PTM	Description	Site(s)	Forward Enzyme(s)	Reverse Enzymes(s)
Detyrosination	removal of C-terminal tyrosine	terminal tyrosine on CTT of α -tubulin	Carboxypeptidase ³¹ (Nna1/CCP1?) ³²	TTL ³³
Glutamylolation	addition of one or more glutamates as a side chain	multiple glutamates in the primary sequence of CTTs of α - and β - tubulin	TLL1, TLL5, TLL6 (α -tubulin) ^{34,54} TLL4, TtTLL6Ap, TLL7 (β -tubulin) ^{34,54,69}	unknown
Glycylation	addition of one or more glycines as a side chain	multiple glutamates in the primary sequence of CTTs of α - and β -tubulin	unknown	unknown
Acetylation	addition of acetyl group	Lys40 of α -tubulin	unknown	HDAC6, SirT2 ^{39,41}
Phosphorylation	addition of phosphate	Ser172 and unknown site(s) on CTT of β -tubulin unknown sites on α -tubulin	Cdk1/cyclin B (Ser172 of β -tubulin) ⁸ PSK ⁵⁹ Fes ⁶⁰ Syk ^{57,58}	unknown
Palmitoylation	addition of palmitate lipid group	Cys376 of α -tubulin	unknown	unknown
$\Delta 2$	removal of penultimate glutamate from detyrosinated α -tubulin	CTT of α -tubulin	unknown	unknown

Figure 21 : Liste de modifications post-traductionnelles identifiées sur les tubulines. PTM = modifications post-traductionnelles ; CCT = Queue C-terminale. Tiré de (Verhey and Gaertig, 2007).

Parmi les diverses modifications post-traductionnelles identifiées, la palmitoylation, l'ubiquitination, la méthylation, la sumoylation, et la glycosylation sont des modifications ayant des fonctions encore peu connues sur la régulation du réseau de microtubules (Song and Brady, 2015).

La polyamination, la phosphorylation et la polyglycylation ont été montrées comme impliquées dans la stabilisation et la dynamique des microtubules, même si elles sont peu étudiées (Song and Brady, 2015; Wloga et al., 2017).

La majorité des tubulines α contiennent une tyrosine en C-terminale qui peut être clivée ou rajoutée par différentes enzymes lors d'un cycle detyrosination/tyrosination (Aillaud et al., 2017; Barra et al., 1988; Song and Brady, 2015). Des detyrosinations anormales sont observées dans des cancers et des maladies cardiaques. Ce cycle detyrosination/tyrosination est un signal de régulation vitale (Erck et al., 2005) impliqué dans la mitose, la physiologie neuronale et la méchanotransduction musculaire.

Les tubulines α détyrosinées peuvent subir une autre protéolyse, une modification $\Delta 2$, qui clive l'acide glutamique terminal. Cette modification irréversible permet de limiter la quantité de tubuline α qui est à nouveau tyrosinable (Wloga and Gaertig, 2010).

L'acétylation permet l'ajout d'un groupe acétyle sur la lysine 40 de la tubuline α . Cette modification affecterait la stabilité des microtubules mais les fonctions physiologiques de l'acétylation de la tubuline α restent encore peu connues (Song and Brady, 2015).

La polyglutamylation quant à elle influencerait l'interaction de protéines avec les microtubules (Bonnet et al., 2001; Lacroix et al., 2010).

La détyrosination/tyrosination, l'acétylation et la polyglutamylation sont des modifications post-traductionnelles qui pourraient réguler la vitesse des moteurs moléculaires comme les kinésines-1 (Konishi and Setou, 2009; Maas et al., 2009; Reed et al., 2006).

4) Les protéines associées aux microtubules (MAPs)

Les MAPs (Microtubules-Associated Proteins) sont des partenaires protéiques qui se fixent sur les microtubules. Parmi les MAPs on trouve les MAPs structurales/stabilisatrices, les déstabilisatrices, les protéines des bouts (+) et les moteurs moléculaires.

a) Les protéines des bouts (+)

Ces protéines dites +TIPs (plus-end tracking protein) se lient aux bouts (+) des microtubules en phase d'assemblage. Actuellement plus d'une vingtaine de +TIPs ont été identifiées comme par exemple CLIP-170, les protéines EB (End-Binding), ou p150Glued (Akhmanova and Steinmetz, 2008). En se liant au bout (+) des

microtubules, ces protéines se caractérisent en microscopie, par des marquages type comètes dirigées vers la périphérie des cellules (Figure 22).

La première protéine +TIPs identifiée a été CLIP-170 (Perez et al., 1999). Elle fait partie de la famille des CLIPs (Cytoskeleton-associated protein Gly-rich protein) tout comme p150Glued, une sous-unité de la dynactine (cf. Chapitre 3 I.4.d). Les protéines CLIPs contiennent un domaine CAP-Gly dans leur extrémité N-terminale, domaine leur permettant de se lier aux microtubules via leur interaction avec les protéines EB (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Galjart, 2010).

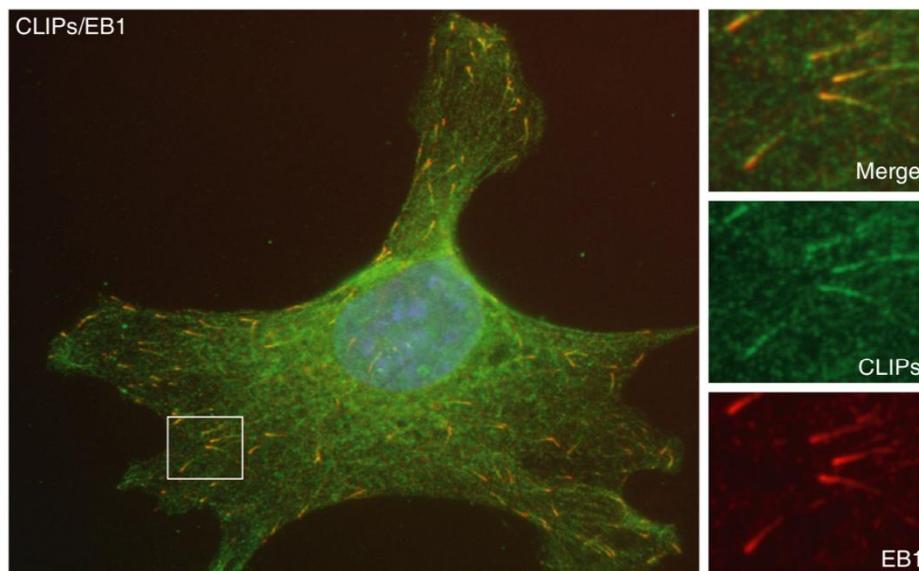


Figure 22 : Distribution des protéines de bouts (+) EB1 et CLIPs. Images de fibroblastes marquées pour la protéine EB1 (rouge) et les protéines CLIPs (vert). Les deux protéines sont des +TIPs qui colocalisent aux extrémités (+) des microtubules donnant lieu à des comètes se dirigeant vers la périphérie de la cellule. *Tiré de (Galjart, 2010).*

Les protéines EBs sont divisées en trois isoformes EB1, EB2 et EB3 et chaque isoforme est présente sous forme de dimère. Leur partie N-terminale est nécessaire et suffisante pour permettre la liaison aux microtubules et leur partie C-terminale se compose d'un domaine Coiled-coil impliqué dans leur dimérisation (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Les protéines EBs ont été montrées comme étant des adaptateurs centraux auxquels se lie la majorité des autres +TIPs (Kumar and Wittmann, 2012).

Les fonctions majeures des +TIPs sont de contrôler la dynamique des microtubules même si les mécanismes moléculaires sous-jacents sont mal compris. La majorité des +TIPs stimulent la polymérisation des microtubules en promouvant l'addition de tubuline aux extrémités (+). Elles permettent aussi de faire le lien entre le bout (+) des microtubules et d'autres structures cellulaires. Par exemple elles attachent le bout (+) des microtubules à la membrane plasmique ou interagissent avec le cytosquelette d'actine (Akhmanova and Steinmetz, 2010; Lewkowicz et al., 2008). Les +TIPs ont aussi un rôle important à jouer dans l'extension des tubules de reticulum via l'interaction EB1/STIM1 (Grigoriev et al., 2008) et contribuent au transport d'organelles vers les bouts (-) (Vaughan et al., 2002) notamment durant la division cellulaire (Lomakin et al., 2009).

b) Les MAPs structurales

Les MAPs structurales n'ont pas de domaine enzymatique et elles se lient à la surface des microtubules (Mandelkow and Mandelkow, 1995). Ces MAPs se composent entre autre des MAPs 1, 2, doublecortine, MAP6 et Tau connues pour avoir des fonctions au niveau de la morphogénèse et du développement neuronal (Mohan and John, 2015), mais également MAPs 4 et 7 plus ubiquitaires. Les MAPs structurales permettent de stabiliser le réseau de microtubules en favorisant la polymérisation de la tubuline et en inhibant le désassemblage des microtubules (Drechsel et al., 1992; Trinczek et al., 1995).

L'action des kinases et phosphatases contrôle généralement l'interaction de ces MAPs avec les microtubules (Cassimeris and Spittle, 2001). Elles interagissent avec les microtubules grâce à leur domaine C-terminal. Leur domaine N-terminal quant à lui, dépasse des microtubules permettant ainsi de lier d'autres protéines ou le cytosquelette d'actine par exemple (Drewes et al., 1998; Halpain and Dehmelt, 2006). Certaines de ces MAPs comme MAP1, MAP4, MAP2 et Tau promouvoient l'assemblage des microtubules sous forme de faisceaux (Chen et al., 1992; Drechsel et al., 1992; Mohan and John, 2015). La longueur de leur domaine de projection N-terminal définit alors l'espace entre les microtubules d'un même faisceau (Chen et al., 1992).

MAP6 également appelée STOP (Stable Tubule-Only Polypeptide) a la particularité de stabiliser les microtubules au froid *in vitro* et de lier la calmoduline, caractéristiques non retrouvées chez les autres MAPs comme MAP2 et Tau (Baas et al., 1994; Pirollet et al., 1983).

MAP6 est une famille de protéines toutes issues de l'épissage alternatif du même gène *MAP6*. Ce dernier est composé de 4 exons ainsi que d'un promoteur alternatif (Bosc et al., 1996; Denarier et al., 1998a) (Figure 23). Quatre sites de phosphorylation par la CaMKII ont également été identifiés (Baratier et al., 2006; Job et al., 1983). Une fois phosphorylée, MAP6 ne lierait plus les microtubules mais pourrait lier l'actine permettant ainsi sa relocalisation au niveau de la synapse des neurones (Baratier et al., 2006). MAP6 subirait également une palmitoylation qui lui permettrait de se localiser dans le Golgi (Gory-Faure et al., 2014, 2006).

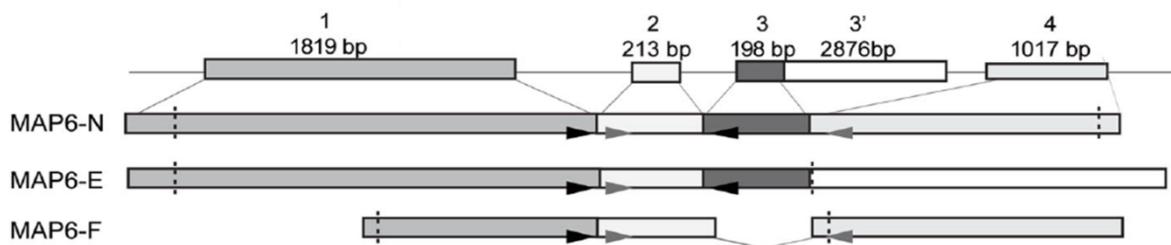


Figure 23 : Isoformes de MAP6. Schéma illustrant les principales isoformes de MAP6 (MAP6-N, MAP6-E et MAP6-F) issues de l'épissage alternatif du gène *Mtap6* qui comporte 4 exons ainsi qu'un promoteur alternatif pour MAP6-F. La taille des exons (bp) est indiquée.

Le laboratoire a eu l'opportunité de travailler sur un modèle de souris MAP6 KO afin de caractériser les fonctions de cette MAP au niveau du muscle squelettique, fonctions inconnues actuellement. En effet, MAP6 fait partie des MAPs structurales qui sont principalement étudiées au niveau neuronal.

L'isoforme MAP6-N spécifique des neurones est retrouvée, dans le cerveau, liée aux microtubules stables au froid ainsi qu'à la calmoduline (Job et al., 1983, 1981). MAP6-E, dite embryonnaire, est également retrouvée associée aux neurones mais est présente dès le développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. A 37°C, MAP6-N et MAP6-E sont localisées le long des microtubules. MAP6-F est exprimée dans les fibroblastes dans lesquels sa localisation varie suivant la température, à

37°C elle est cytoplasmique alors qu'à 4°C elle est située le long des microtubules pour les stabiliser (Denarier et al., 1998b). MAP6-F aurait ainsi un rôle de senseur de températures permettant de protéger les microtubules des variations de températures (Delphin et al., 2012). Cette isoforme est également identifiée dans d'autres tissus comme les muscles striées (Aguazzoul et al., 2003; Denarier et al., 1998b; Guerrero et al., 2010).

Pour mieux étudier les différentes fonctions de MAP6, un modèle de souris MAP6 KO a été développé (Andrieux et al., 2002). Ces souris sont viables mais développent un phénotype d'anxiété et présentent des problèmes de fertilité et de maternage. Leur phénotype, principalement caractérisé au niveau neuronal, comprend une plasticité synaptique altérée ainsi que des défauts de neurotransmission, ce qui entraîne des troubles du comportement (Andrieux et al., 2002; Fournet et al., 2012; Volle et al., 2013). Les voies dopaminergiques et glutamatergiques de ces animaux sont également affectées ce qui correspond à un phénotype similaire à la Schizophrénie chez l'Homme (Begou et al., 2007; Brun et al., 2005).

MAP6 dans les neurones est impliquée dans le développement de faisceaux neuronaux et dans la neurogénèse olfactive adulte (Benardais et al., 2010; Deloulme et al., 2015). C'est pourquoi les animaux MAP6 KO présentent des défauts dans la formation des synapses olfactives ainsi qu'une altération du développement d'un tractus axonal impliqué dans les déficits cognitifs observés.

c) Les MAPs déstabilisatrices

Dans la cellule il existe des effecteurs qui stimulent la fréquence des catastrophes, diminuent les sauvetages et la vitesse d'élongation des microtubules. Différentes molécules pouvant s'opposer aux effets des MAPs stabilisatrices ont été identifiées.

La stathmine augmente les événements de catastrophe en se liant aux sous-unités non polymérisées de tubuline (Belmont et al., 1996). Elle a été trouvée surexprimée dans certaines tumeurs.

Les kinésines 13 utilisent l'énergie de l'ATP pour dépolymériser les microtubules (Desai et al., 1999).

Les protéines de coupure comme la katanine et la spastine (Errico et al., 2002) fragmentent les microtubules en hydrolysant l'ATP (Lacroix et al., 2010; McNally and Vale, 1993). D'autres MAPs comme Tau pourraient contrebalancer l'activité de coupure de la katanine en se liant aux microtubules (Qiang et al., 2006).

d) Les moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires liés aux microtubules sont des enzymes utilisant l'ATP pour leurs mouvements sur le réseau de microtubules. Ils permettent ainsi le transport intracellulaire de divers cargos (protéines, organites, vésicules) (Goldstein and Philp, 1999) (Figure 24). Deux familles sont à distinguer, les dynéines (Wang et al., 1995) et les kinésines (Goldstein and Philp, 1999) qui réalisent des transports dans des directions opposées.

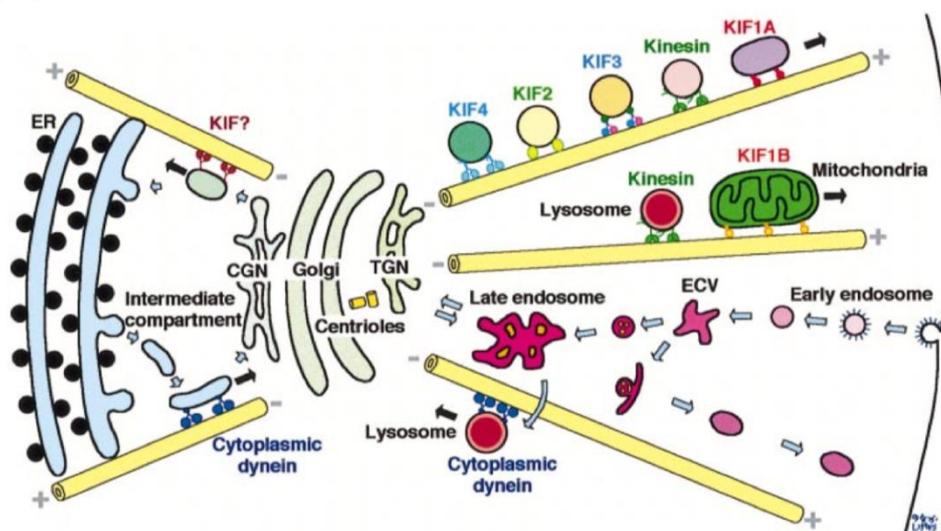


Figure 24 : Schéma illustrant un modèle de transport intracellulaire via les kynésines (KIFs) et la dynéine le long des microtubules (cylindres jaunes). Tiré de (Hirokawa, 1998).

On compte 50 kinésines réparties en 14 familles (Endow et al., 2010). Leurs sites de liaisons de l'ATP et des microtubules se situent dans la même région (Vale and Fletterick, 1997). Les kinésines-1 ont été les premières identifiées. Ce sont des

hétérodimères comprenant : une tête globulaire (deux chaînes lourdes) contenant le domaine moteur (ATPase) et le domaine de liaison aux microtubules, deux chaînes légères qui médient la liaison aux cargos, et une queue centrale interagissant avec les deux chaînes légères (Duncan and Goldstein, 2006). Si le domaine moteur des kinésines est situé en N-terminal, la kinésine ira préférentiellement vers les bouts (+). C'est le cas pour la majorité des kinésines, on parle de mouvement antérograde (Figure 25). L'exception concerne les kinésines du groupe 14 qui ont leur domaine moteur en C-terminal et par conséquent se dirigent vers les bouts (-) des microtubules (Desai et al., 1999). De plus, les kinésines des groupes 8 et 13 peuvent dépolymériser les extrémités (+) des microtubules (Su et al., 2012).

Les dynéines sont structurellement différentes des kinésines (Samsó et al., 1998). Elles sont composées de deux chaînes lourdes contenant le domaine de liaison aux microtubules et l'activité ATPase, deux chaînes intermédiaires, deux chaînes légères intermédiaires et plusieurs chaînes légères (Duncan and Goldstein, 2006). Elles utilisent également l'ATP pour leur déplacement mais elles ne vont que vers les bouts (-) des microtubules, on parle de mouvement rétrograde (Kardon and Vale, 2009; Wang et al., 1995). Elles ont trois sites ATPase mais seulement l'un d'eux peut hydrolyser l'ATP (King, 2000).

Pour avoir un fonctionnement optimal de la dynéine, il faut une autre protéine, la dynactine (Boylan et al., 2000; Gill et al., 1991) qui permet de lier la dynéine au cargo et d'augmenter son efficacité (Duncan and Goldstein, 2006). La dynactine agit comme un adaptateur permettant à la dynéine de déplacer un groupe plus diversifié de cargos (Karki and Holzbaur, 1999). (Figure 25).

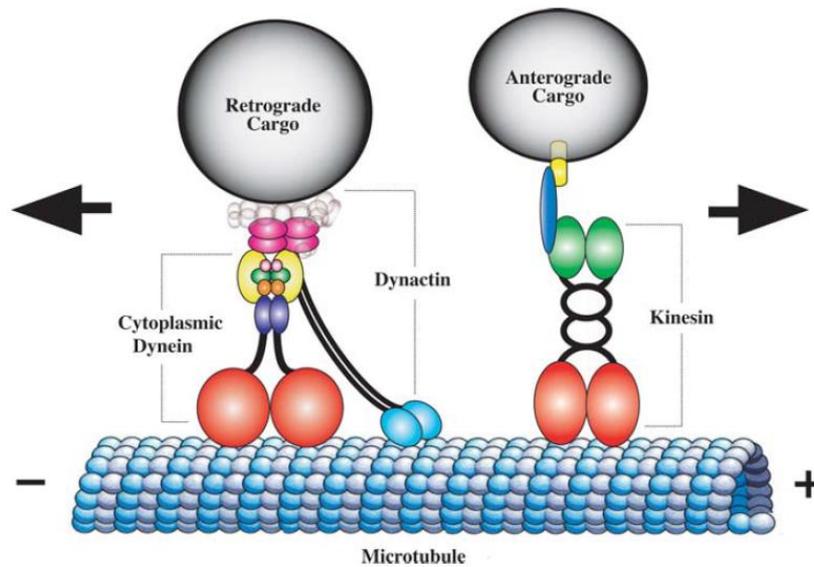


Figure 25 : Dynéines et kinésines. Schéma représentant le complexe dynéine/dynactine (gauche) et une kinésine de la famille des kinésines-1 (droite). Les kinésines-1 sont des hétérodimères constitués de 2 chaînes lourdes (rouge) contenant les domaines de liaison aux microtubules et à l'ATP, 2 chaînes légères (vert) interagissant avec une queue torsadée et permettant la liaison au cargo via deux protéines intermédiaires (bleu et jaune). Les dynéines sont composées de 2 chaînes lourdes (rouge) contenant les domaines de liaison aux microtubules et à l'ATP, 2 chaînes intermédiaires (jaune), 2 chaînes intermédiaires légères (violet) et un assortiment de chaînes légères (rose claire, vert, orange). La dynactine est une protéine à plusieurs sous-unités qui lie la dynéine et améliore son efficacité. Elle contient p150glued (turquoise) qui interagit avec la chaîne intermédiaire de dynéine et lie les microtubules, et p50 (rose foncé) faisant la liaison entre p150glued et le cargo. On parle du complexe dynéine/dynactine. *D'après (Duncan and Goldstein, 2006).*

Les moteurs moléculaires ont chacun des vitesses spécifiques (Tableau 1) qui leur permettent de réaliser des mouvements rapides sur des longues distances contrairement à la simple dynamique des microtubules. Les vitesses des moteurs moléculaires peuvent varier suivant les modifications post-traductionnelles des tubulines (Sirajuddin et al., 2014).

Mouvement	Vitesse ($\mu\text{m/s}$)	Références
Polymérisation	0,05 – 0,35	(Cassimeris et al., 1988; Sammak and Borisy, 1988)
Dépolymérisation	0,07 – 0,60	
Kinésines	0,5 – 2,0	(Brady et al., 1990; Hirokawa et al., 2009)
Dynéines	1,0 – 7,0	(Brady et al., 1990; Reck-Peterson et al., 2006)

Tableau 1 : Vitesses des microtubules et des moteurs moléculaires in vivo.

II. Les microtubules et le reticulum

Les microtubules sont impliqués dans le remodelage du reticulum. L'extension des tubules de reticulum par les microtubules se fait majoritairement par un mécanisme dit de glissement impliquant les moteurs moléculaires (Friedman et al., 2010; Wozniak et al., 2009), mais environ 1/3 de ces mouvements implique également un mécanisme de TAC (Tips Attachment Complex). Lors de ces derniers, le reticulum se lie aux bouts (+) des microtubules par l'intermédiaire d'une protéine EB (Waterman-Storer and Salmon, 1998). Les tubules de reticulum sont alors déplacés grâce à la polymérisation des microtubules (Figure 26).

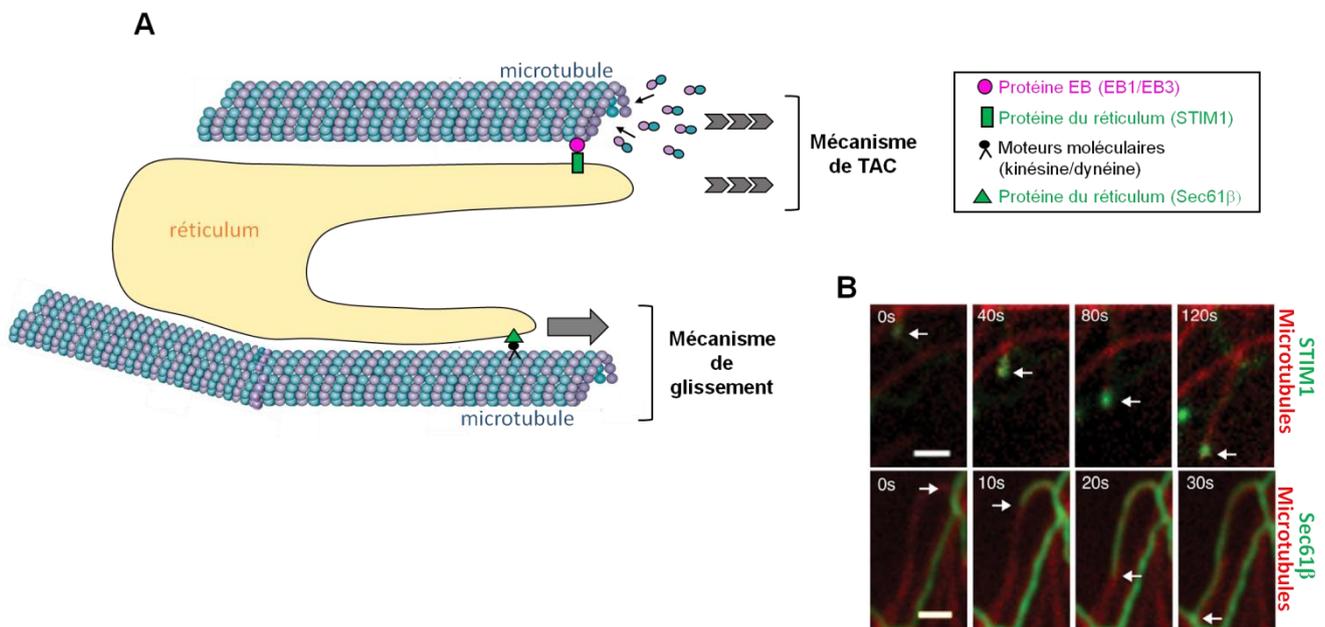


Figure 26 : Dynamique du reticulum le long des microtubules. (A) La partie du haut du schéma illustre les mécanismes de TAC (Tip Attachment Complex) où une protéine du reticulum interagit avec la protéine EB liée aux bouts (+) des microtubules. Cette interaction permet de transporter les tubules de reticulum grâce à la polymérisation des microtubules. La partie du bas du schéma illustre les mécanismes de glissement par liaisons aux moteurs moléculaires. Le moteur moléculaire se déplace sur les microtubules permettant de tirer le reticulum sur une distance donnée. (B) Images de microscopie de cellules marquées pour les microtubules (rouge) et pour le reticulum (STIM1 ou Sec61 β , vert). Les images du haut représentent la dynamique du reticulum se déplaçant grâce à la polymérisation du microtubule. Les images du bas représentent quant-à elles, les mécanismes de glissement grâce aux moteurs moléculaires de tubules du reticulum. L'extension des tubules de reticulum se fait majoritairement (2/3) par glissement grâce aux moteurs moléculaires et les 1/3 restants utilisent la liaison aux bouts (+) des microtubules. Barres d'échelle = 1 μ m. Images de microscopie tirées de (Friedman et al., 2010).

Un exemple de mouvement de reticulum par mécanisme de TAC est celui impliquant STIM1 et EB1. En effet, STIM1 localisé dans la membrane du reticulum, se lie aux bouts (+) des microtubules par l'intermédiaire d'EB1. Après déplétion des stocks calciques, STIM1 rentre en contact d'ORAI, un canal calcique de surface. C'est par son interaction avec les microtubules que STIM1 amène le reticulum au niveau d'ORAI, ce qui permet de faire entrer du calcium extracellulaire directement dans le cytoplasme des cellules et ainsi de re-remplir les stocks intracellulaire par l'intermédiaire de la pompe ATPase SERCA, on parle de mécanisme de SOCE (store-operated calcium entry). Sans STIM1 ou EB1, les mouvements du reticulum sont fortement réduits (Grigoriev et al., 2008).

Les mécanismes de glissement, quant à eux, sont médiés par la kinésine-1 permettant d'étendre le réseau de microtubules vers la périphérie de la cellule mais également par la dynéine à la base des mouvements de reticulum dirigés vers le centre de la cellule (Wozniak et al., 2009). Néanmoins aucune protéine liant les tubules de reticulum aux moteurs moléculaires n'a été trouvée. La kinectine, protéine membranaire du reticulum endoplasmique (RE), serait le partenaire principal de la kinésine-1 permettant la liaison RE-moteurs moléculaires. En effet, la kinectine et la kinésine-1 ont été montrées comme interagissant l'une avec l'autre (Kumar et al., 1995) et l'altération de l'expression de la kinectine par utilisation de siRNA entraîne la rétraction du RE diminuant ainsi les adhésions de la cellule. L'interaction kinésine-kinectine semble donc nécessaire pour l'extension des membranes de RE permettant le contrôle de la forme et de la migration de la cellule, probablement en médiant le transport des tubules de RE le long des microtubules (Zhang et al., 2010).

Une autre protéine capable de lier le RE et les microtubules est Climp63, une protéine membranaire du reticulum. En altérant l'expression de Climp63 il a été montré que les points de contact entre le RE et les Microtubules augmentaient entraînant ainsi la déformation du RE en des structures dites « rope-like structures » (Vedrenne and Hauri, 2006). Lorsqu'un dominant négatif de Climp63 ne liant pas les microtubules est utilisé, les tubules de RE ne sont plus assez stables pour s'étendre en direction de la périphérie de la cellule (Vedrenne and Hauri, 2006). Ces résultats témoignent du fait que Climp63 est impliqué dans la stabilisation du réseau de RE et que tout comme l'interaction kinésine/kinectine, la liaison RE-microtubules est requise pour la maintenance du reticulum.

III. Organisation et rôle des microtubules dans le muscle

1) Organisation

Au contraire d'une cellule non différenciée, une fibre musculaire présente un réseau de microtubules particulier, organisé sous la forme d'un quadrillage (Kano et al., 1991; Ralston et al., 1999) avec certains microtubules orientés longitudinalement et d'autres transversalement par rapport à l'axe de la fibre musculaire (Boudriau et al., 1993; Oddoux et al., 2013; Ralston et al., 1999) (Figure 27). Les microtubules forment des faisceaux qui correspondent à des voies préférentielles le long desquelles les microtubules dynamiques polymérisent et dépolymérisent (Oddoux et al., 2013).

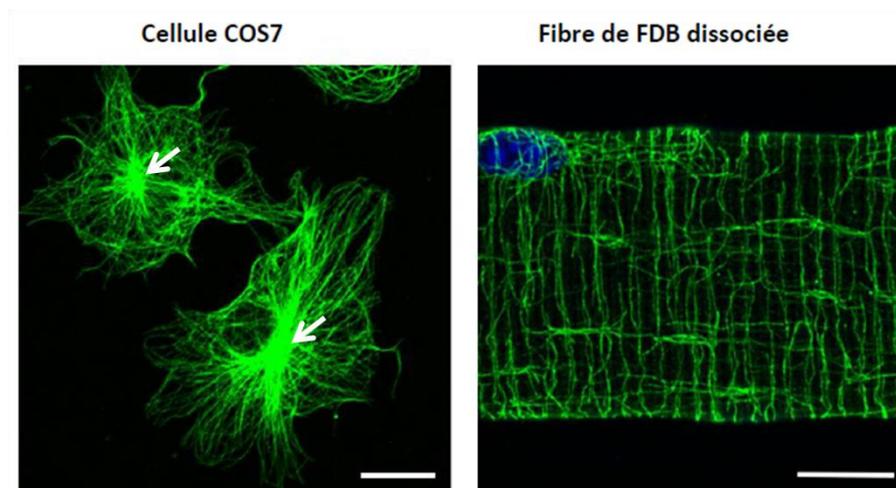


Figure 27 : Organisation du réseau de microtubules dans des cellules indifférenciées et dans une fibre musculaire adulte. Les microtubules sont marqués par la tubuline en vert et les noyaux sont marqués en bleus. Dans les cellules indifférenciées type COS7 (à gauche) les microtubules sont orientés vers la périphérie de la cellule à partir du MTOC (flèche). Dans une fibre musculaire adulte (FDB, à droite), les microtubules sont organisés sous la forme d'un quadrillage. Barre d'échelle = 10 μ m. Modifiées d'après M.Sébastien.

Une cellule musculaire n'est pas polarisée, les deux extrémités des microtubules sont difficiles à identifier (Oddoux et al., 2013). Au contraire de l'axone d'un neurone dans lequel les bouts (-) des microtubules sont au niveau du corps cellulaire et les bouts (+) à l'autre extrémité de l'axone, dans une fibre musculaire les microtubules n'ont pas d'orientation précise et définie.

Le réseau de microtubules est plus dense en périphérie de la fibre et autour du noyau. Les fibres de type I présentent également un réseau plus dense (Ralston et al., 1999).

Les microtubules des muscles striés sont principalement détyrosinés donc stabilisés. Ils présentent également peu de modifications post-traductionnelles type acétylation ou protéolyse $\Delta 2$ (Belmadani et al., 2004; Kerr et al., 2015).

2) Rôles du réseau de microtubules

a) Myogenèse

De façon générale, les microtubules permettent de maintenir l'architecture de la cellule (Boudriau et al., 1993). Au cours de la myogenèse, des vagues de remodelage subcellulaire apparaissent et affectent entre autre, le réseau de microtubules et les MTOCs, les sites de sorties du reticulum (ERES) et l'appareil de Golgi (Lu et al., 2001; Tassin et al., 1985a; Zaal et al., 2011). Dans les myoblastes les microtubules sont nucléés à partir d'un centrosome juxta-nucléaire (Tassin et al., 1985a). Au cours de la différenciation cellulaire, les myotubes acquièrent des microtubules plus denses, avec une orientation parallèle, et les centrosomes sont clusterisés proches des noyaux (Kano et al., 1991; Tassin et al., 1985a, 1985b). Les microtubules sont ainsi nucléés par les éléments de Golgi dispersés dans toute la cellule et autour des noyaux (Tassin et al., 1985a).

Durant la myogenèse, les microtubules forment une structure type « échafaudage » pour positionner la myosine nécessaire à la formation des sarcomères (Pizon et al., 2005). Au début, les précurseurs des filaments de myosine sont situés le long des microtubules au centre de la cellule puis au cours de la différenciation, ils se déplacent en direction des bouts (+) des microtubules donc vers les membranes cellulaires. A ce moment là, ils formeront des filaments associés avec l'actine (Pizon et al., 2005).

Il a été montré que les microtubules ont un rôle à jouer dans la fusion et l'élongation des cellules musculaires (Saitoh et al., 1988) notamment via les protéines EB1 et EB3 qui ont des rôles différents suivant l'étape de différenciation. EB1 est plutôt impliquée dans les phases précoces de la maturation musculaire tandis qu'EB3 joue un rôle plutôt dans les phases tardives (Straube and Merdes, 2007; Zhang et al., 2009). MAP4 et la dynéine interviendraient également dans la polarisation et l'élongation de la cellule (Mogessie et al., 2015).

Le réseau de microtubules est également impliqué dans le mouvement et l'ancrage des noyaux au cours de la myogenèse par l'intermédiaire de protéines régulatrices comme MAP7, Kif5b, nesprine ou dynéine (Cadot et al., 2012; Metzger et al., 2012; Wilson and Holzbaur, 2015) qui seront présentées plus en détails dans le paragraphe 2b ci-dessous.

Le cytosquelette de microtubules intervient également dans la contraction musculaire. La tubuline détyrosinée régule la méchanotransduction en augmentant la vitesse de contraction et la rigidité du cytosquelette (Kerr et al., 2015), ce qui, via la production de ROS par la NADPH2 (Nox2) à proximité du RyR, régule les relâchements de calcium (Kerr et al., 2015; Prosser et al., 2011). De plus, les microtubules sont localisés proches des triades et interagissent avec le complexe de relâchement du calcium (CRC) (Fourest-Lieuvin et al., 2012; Kano et al., 1991; Osseni et al., 2016). Ces résultats suggèrent que les microtubules pourraient avoir une fonction dans la régulation des libérations de calcium dans la triade ainsi que dans l'adressage des protéines du CRC à la triade (Figure 28). L'étude de Vega et al., appuie ce rôle des microtubules dans la réorganisation des structures du reticulum nécessaire à l'établissement du couplage excitation-contraction au cours de la différenciation (Vega et al., 2011). Ces auteurs ont montré dans des cardiomyocytes que le reticulum est une structure mobile et que sa dynamique est dépendante des mouvements microtubulaires de la dynéine et de la kinésine-1 (Kif5b).

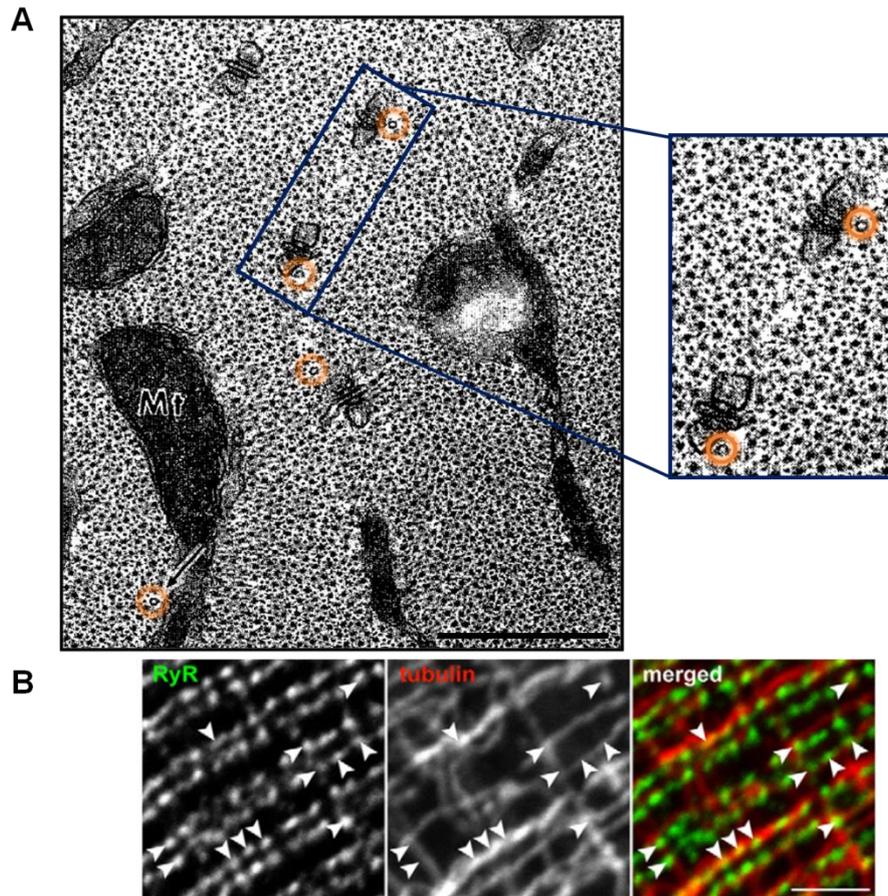


Figure 28 : Les microtubules sont localisés proches des triades. **(A)** Coupe transversale de muscle de diaphragme de souris observée en microscopie électronique à transmission. Les microtubules (orange) sont à proximité des triades et sont entourés par les myofilaments (points noirs). Mt = Mitochondrie. Barre d'échelle = 0,5 μ m. *Modifiée de Kano et al., 1991.* **(B)** Marquage des microtubules par la tubuline (rouge) et des triades par RyR (vert) dans une fibre musculaire adulte (FDB). Les flèches indiquent les régions où les triades et les microtubules colocalisent. Barre d'échelle = 2,5 μ m. *Tirée de (Fourest-Lieuvain et al., 2012).*

Des défauts dans l'organisation des microtubules sont retrouvés dans les souris *mdx*, modèle de la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Ces souris caractérisées par l'absence de dystrophine présentent une altération de la localisation de leur appareil de Golgi, probablement à la base de la désorganisation du cytosquelette de microtubules (Percival et al., 2007; Percival and Froehner, 2007). Ces défauts au sein des microtubules aboutissent à la modification des ROS dérégulant à leur tour les sorties de calcium (Khairallah et al., 2012).

Une altération du réseau de microtubules peut également entraîner une mauvaise position des noyaux au sein des cellules musculaires en cours de développement, à la base de myopathies centronucléaires (Jungbluth et al., 2008).

b) Protéines régulatrices

Comme déjà cité au début de ce chapitre, plusieurs protéines régulent la dynamique des microtubules et la différenciation cellulaire.

En 2000, Spencer et al., décrivent une nouvelle protéine MURF (MUscle-specific Ring-Finger protein) exprimée spécifiquement dans les cellules musculaires cardiaques et squelettiques (Spencer et al., 2000). MURF serait un régulateur myogénique en lien avec le réseau de microtubule et impliqué dans le développement et la différenciation des myoblastes (Spencer et al., 2000) mais également dans l'atrophie musculaire (Bodine et al., 2001).

L'isoforme MAP4o est une protéine impliquée dans le maintien des microtubules en position anti-parallèle et dans l'élongation de la cellule au cours de la myogenèse (Mogessie et al., 2015). En effet, il a été montré que MAP4 et la dynéine coopèrent pour former un réseau de microtubule parfaitement organisé au sein des cellules musculaires (Mogessie et al., 2015). Sans MAP4o, il y a une motilité excessive des microtubules via les moteurs moléculaires alors que sans dynéine, MAP4o est incapable d'aligner les microtubules (Figure 29).

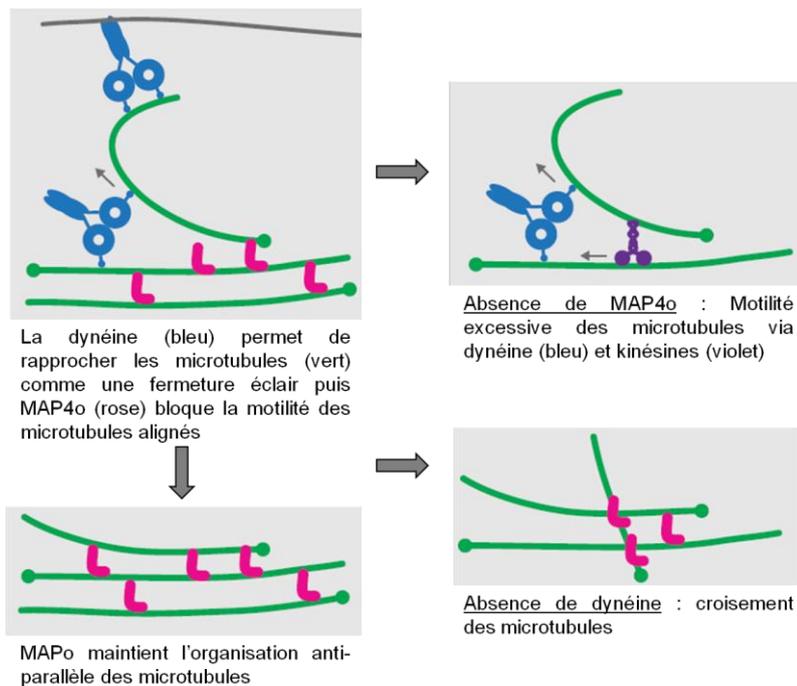


Figure 29 : MAP4o et dynéine coopèrent pour maintenir l'organisation anti-parallèle du réseau de microtubules dans des cellules musculaires différenciées. Les microtubules sont en vert, MAP4o en rose, la dynéine en bleu et la kinésine en violet. *Modifiée d'après (Mogessie et al., 2015).*

L'étude portant sur les mouvements des noyaux microtubules-dépendant, a montré que d'autres protéines pouvaient réguler ce phénomène. Par exemple, Cadot et al., ont montré qu'après la fusion des myoblastes, leurs noyaux migrent vers le centre du myotube grâce au complexe dynéine/dynactine et ce mécanisme est contrôlé par Cdc42, une GTPase connue pour réguler entre autre le positionnement des noyaux (Cadot et al., 2012). Il a également été démontré que MAP7 et Kif5b sont impliquées dans le positionnement nucléaire le long de la fibre musculaire (Metzger et al., 2012; Wilson and Holzbaur, 2015, 2012). Néanmoins d'autres moteurs moléculaires sont également impliqués dans le positionnement nucléaire au cours de la différenciation musculaire. C'est ce que Gache et al., ont récemment montré en réalisant un criblage avec des siRNA ciblant différentes kinésines et sous-unités de la dynéine, afin d'observer l'impact de chaque moteurs sur chaque étape du positionnement des noyaux (Gache et al., 2017).

Il semblerait cependant que dans les étapes plus tardives de la maturation cellulaire, ce soit l'actine, la nesprine, l'amphyphysine 2 et N-WASP (facteur qui promeut la nucléation de l'actine) qui soient impliquées dans la migration en périphérie des noyaux et dans le maintien de l'organisation de la triade (Falcone et al., 2014).

Même si l'implication de MAP6 dans le fonctionnement musculaire reste à démontrer, cette protéine pourrait tout de même jouer un rôle dans la liaison entre la tubuline et les mitochondries au sein des muscles striés (Guerrero et al., 2010). Des niveaux anormaux de MAP6 ont, de plus, été trouvés dans des maladies musculaires comme la dystrophie myotonique de type 1 (Velazquez-Bernardino et al., 2012), appuyant l'idée que MAP6 pourrait être impliqué dans le bon fonctionnement musculaire.

Le réseau de microtubules et les protéines qui lui sont associées sont donc des éléments primordiaux pour les mouvements des différentes organelles ainsi que leurs ancrages au sein des cellules. Cependant nous savons également que le cytosquelette de microtubules est impliqué dans le trafic des protéines où il a au moins un rôle à jouer au niveau de la voie de biosynthèse de ces protéines. C'est pourquoi nous avons voulu en savoir plus sur le rôle de cette voie dans le trafic des protéines de la triade.

Chapitre 4 : Le reticulum et la voie de biosynthèse

I. La voie de biosynthèse au sein de cellules eucaryotes non différenciées

1) Organisation du reticulum

Dans les cellules eucaryotes indifférenciées, la structure et la dynamique du reticulum sont bien caractérisées.

Le reticulum endoplasmique (RE) est une organelle majeure retrouvée dans toute la cellule (Griffiths et al., 1984). C'est une structure dynamique qui est constamment remodelée et qui se compose de tubules et de feuillettes créant des sous domaines fonctionnels ayant chacun une fonction particulière (Phillips and Voeltz, 2016) et des protéines spécifiques qui lui sont propres. Les différences de localisation des protéines du RE pourraient ainsi dépendre des différences structurales entre les feuillettes et tubules du RE (Cui-Wang et al., 2012). La formation et le maintien des compartiments du reticulum sont alors permis par différentes familles de protéines qui ont été identifiées comme capable de déformer les membranes (Shibata et al., 2006).

Trois domaines principaux du reticulum sont identifiés formant ainsi un réseau tridimensionnel précisément structuré : l'enveloppe nucléaire, le reticulum endoplasmique rugueux (RER) contenant des ribosomes et participant ainsi à la synthèse protéique, et le reticulum endoplasmique lisse (REL) (Figure 30). Ces domaines sont impliqués dans diverses fonctions allant de la synthèse de lipides comme le cholestérol aux modifications des protéines, en passant par la production de glucose ainsi que par des réactions de détoxification cellulaire ainsi que dans le stockage du calcium... (Baumann and Walz, 2001; Fagone and Jackowski, 2009; Schwarz and Blower, 2016).

En général les feuillettes du RE correspondent au RER avec les ribosomes associés aux translocons et les tubules du RE correspondent au REL, situé plus en périphérie (Shibata et al., 2006).

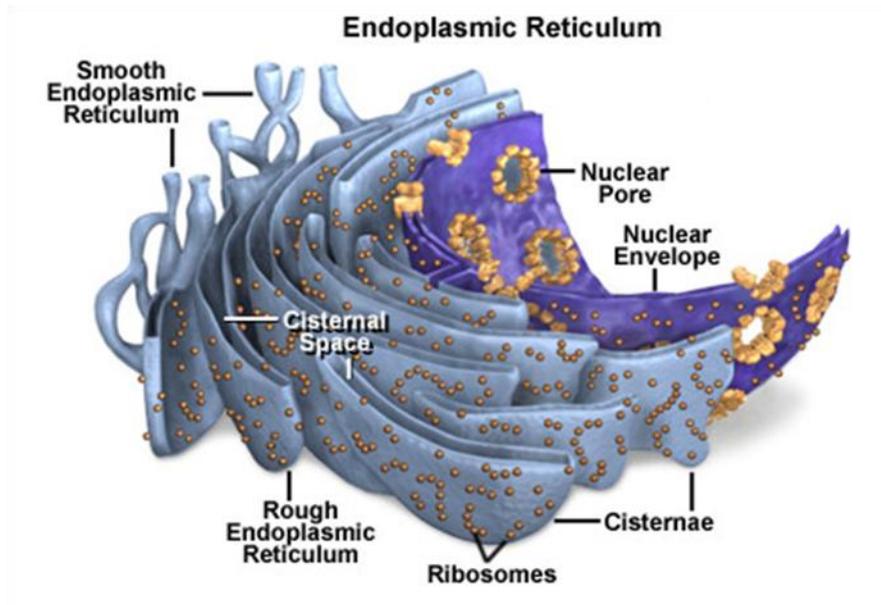


Figure 30 : Le reticulum endoplasmique (RE). Schéma représentant le RE et ses différentes structures. D'après <https://biologyofcells2011.weebly.com/ribosomes.html>.

Les courbures retrouvées au niveau des tubules de reticulum sont formées par des protéines stabilisatrices comme par exemple les protéines du réticulon (Rtn4/Nogo), DP1/Yop1p et l'ensemble des protéines de la famille des REEPs (Receptor Expression Enhancing Protein) (Park et al., 2010; Voeltz et al., 2006) (Figure 31). Ces protéines sont nécessaires et suffisantes pour former les tubules via leur conformation en épingle à cheveux (Park et al., 2010). Il a également été montré que certaines pouvaient s'associer avec le réseau de microtubules comme REEP1 (Park et al., 2010). D'autres protéines comme les protéines à domaine BAR peuvent avoir un rôle dans la formation des courbures membranaires de par leur capacité à se lier aux lipides pour détecter ces courbures (Carman and Dominguez, 2018).

Les bords des feuillettes ont une courbure membranaire similaire à celle des tubules. La formation des feuillettes dépend également des protéines du réticulon (Shibata et al., 2010) mais aussi des protéines membranaires faisant un pont à travers la lumière du RE, ce qui permet de maintenir constante la taille de l'espace luminal (Senda and Yoshinaga-Hirabayashi, 1998; Shibata et al., 2010). L'une de ces protéines est Climp63 (Shibata et al., 2010) qui est concentrée dans les feuillettes où elle remplit son rôle de protéine d'espacement luminal (Klopfenstein et al., 2001; Schweizer et al.,

1995) tout en liant les microtubules par son domaine cytoplasmique (Klopfenstein et al., 1998; Vedrenne and Hauri, 2006) (Figure 31).

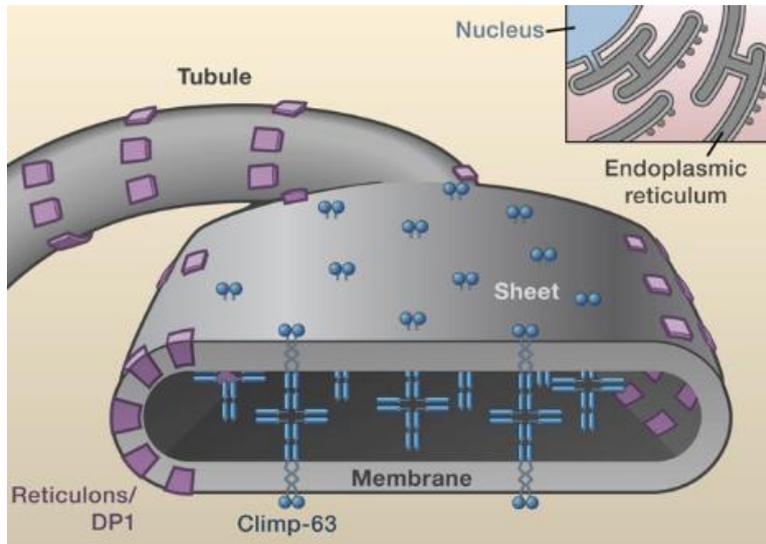


Figure 31 : Structure des feuillettes et des tubules du réticulum endoplasmique. Schéma illustrant une coupe transversale d'un feuillet de RE. Les protéines de réticulons et DP1 (violette) permettent de former et de maintenir la courbure de membrane des tubules et des feuillettes. Climp63 (bleu) permet de maintenir constant l'espace luminal. *Tiré de Barlowe 2010.*

Une fois insérée dans les membranes du réticulum, ces différentes protéines peuvent ainsi courber les membranes permettant de former les tubules et les bords des feuillettes (Voeltz et al., 2006), ceci permet de former et de maintenir les différents compartiments du réticulum. Certaines de ces protéines de par leur capacité à lier les microtubules, comme Climp63, permettent de faire le lien et d'ancrer le RE sur le cytosquelette de microtubules.

2) La voie de biosynthèse

L'une des fonctions majeures du réticulum est son implication dans la voie de biosynthèse des protéines. Celle-ci se compose de différents compartiments allant du réticulum à la membrane plasmique.

a) Les domaines du reticulum

L'enveloppe nucléaire

Dans une cellule eucaryote, l'enveloppe nucléaire sépare le compartiment nucléaire du cytoplasme et renferme le génome nucléaire. Elle se divise en trois sous domaines différents morphologiquement et biochimiquement (Figure 30). Les deux premiers domaines (les membranes nucléaires internes et externes) sont des bicouches lipidiques séparées par l'espace périnucléaire (20-40nm) (Hetzer, 2010). Tout d'abord la membrane nucléaire externe qui est continue avec la membrane du RE et qui est constituée de protéines comme les nesprines 1 et 2 interagissant avec l'actine et participant au positionnement nucléaire. Puis la membrane nucléaire interne composée de différentes protéines interagissant uniquement avec la lamine et la chromatine (Hetzer, 2010). Enfin le troisième sous domaine est le complexe de pore nucléaire. C'est la membrane nucléaire interne qui va s'invaginer jusqu'à fusionner avec la membrane nucléaire externe et ainsi former le pore nucléaire (Otsuka et al., 2016). Le complexe de pore nucléaire lie donc les deux membranes nucléaires (Gerace and Foisner, 1994; Goldberg and Allen, 1995). C'est un complexe macromoléculaire composé d'environ 30 polypeptides, les nucléoporines, et d'un canal transporteur central permettant l'échange bidirectionnel de protéines, d'ARN, de ribonucléoporines entre le nucléoplasme et le cytoplasme (Doucet and Hetzer, 2010; Nigg, 1997; Rout and Wentz, 1994). Le pore nucléaire a ainsi un rôle dans le trafic nucléaire mais également dans l'organisation de la chromatine et dans la régulation génique (Doucet and Hetzer, 2010).

Le reticulum lisse et le reticulum rugueux

Le REL n'a pas de ribosomes à sa surface d'où le terme « lisse » pour le définir. Il jouerait plusieurs rôles au niveau de certaines voies métaboliques comme la détoxification de l'organisme, la production de stéroïdes ou la synthèse des phospholipides membranaires (Bishop and Bell, 1988). Il est nécessaire au renouvellement des membranes via la synthèse de la bicouche phospholipidique. Le

REL est également impliqué dans le stockage du calcium permettant ainsi de réguler la concentration calcique du cytoplasme, et son relargage via l'IP3R et le RyR. Le REL sera plus ou moins développé suivant le type cellulaire, par exemple il est fortement présent au sein des cellules musculaires où il joue un rôle majeur dans l'homéostasie calcique ou au sein des cellules surrénales où il est impliqué dans la synthèse de stéroïdes (Shibata et al., 2006).

Le RER est impliqué dans la synthèse protéique. Il tient son nom du fait de la présence de ribosomes à sa surface lui conférant cet aspect rugueux. La traduction de l'ARNm en protéine est initiée dans le cytoplasme des cellules puis le complexe ribosomes/chaîne polypeptidique/particule de reconnaissance du signal est ciblé à la membrane du RE permettant la synthèse protéique via le translocon (Rapoport et al., 1996a). Ensuite les protéines synthétisées sortiront du RE, passeront par le compartiment intermédiaire puis par l'appareil de Golgi (Bannykh et al., 1998; Kuehn and Schekman, 1997) avant d'atteindre les endosomes, les lysosomes, la membrane plasmique ou leur compartiment final dans des vésicules à clathrine (Bonifacino and Glick, 2004; Tuvim et al., 2001) (Figure 32).

Ce sont des séquences particulières appelées peptide signal qui sont retrouvées dans les séquences des protéines et qui permettent de savoir dans quel compartiment telle ou telle protéine doit être adressée. C'est par exemple le rôle du peptide signal KDEL qui est présent dans les protéines retenues dans le RE comme BiP ou PDI (Munro and Pelham, 1987).

Les protéines immatures sont retenues dans le RE grâce à différents mécanismes : la rétention sélective, la capture sélective ou la récupération par le compartiment intermédiaire (Barlowe and Helenius, 2016; Geva and Schuldiner, 2014).

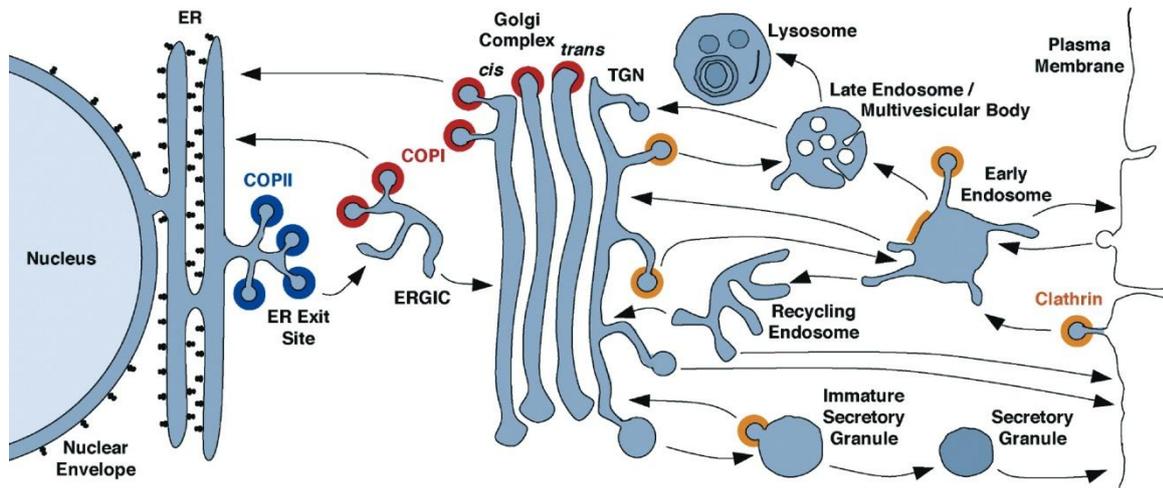


Figure 32 : Voie de biosynthèse. Schéma représentant les différentes étapes permettant à une protéine nouvellement synthétisée d'atteindre son compartiment final. Une fois sortie du réticulum par les sites de sortie, la protéine sera transportée dans des vésicules COPII (bleu) jusqu'au compartiment intermédiaire (ERGIC) puis vers l'appareil de Golgi. Elle pourra être ramenée dans le réticulum par des vésicules COPI (rouge) ou traverser le Golgi et atteindre les endosomes, les lysosomes ou la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules à clathrine (orange). *Tiré de (Bonifacino and Glick, 2004).*

Un premier contrôle de qualité est fait dans le RE grâce à des protéines chaperonnes (Calnexine/Calreticuline, BiP...) qui contrôlent le repliement et la bonne maturation des protéines nouvellement synthétisées. Les protéines mal repliées seront envoyées dans le cytoplasme pour être dégradée par un mécanisme appelé ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation).

L'export du RE se fait au niveau des sites de sortie, les ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites). A cet endroit là, des vésicules recouvertes d'un manteau composé des protéines COPII (vésicules COPII) sont assemblées (Bannykh et al., 1996; Barlowe, 1998). Les vésicules COPII sont utilisées pour transporter les cargos à partir du RE, dans la voie de sécrétion (Figure 32).

Un partenaire clé pour la formation des vésicules COPII au niveau des ERES est la GTPase Sar1 (Nakaño and Muramatsu, 1989). Son activation est médiée par l'échange du GDP en GTP via le GEF Sec12 (Guanine nucleotide-Exchange Factor) (Suda et al., 2017). Sar1-GTP interagit avec Sec23 recrutant ainsi le complexe Sec23/Sec24 qui va former la couche interne du manteau des futures vésicules COPII. Le cargo transmembranaire va être capturé par son interaction avec Sec24 formant ainsi un complexe naissant (Suda et al., 2017). Ensuite Sec13 et Sec31

s'assemblent autour de ce complexe par interaction avec Sec23 pour former la couche externe du manteau des futures vésicules COPII. Les couches interne et externe polymérisent pour former une structure type « cage » autour des cargos donnant naissance aux vésicules coâtées COPII (M. C. S. Lee et al., 2004; Stagg et al., 2008, 2006) (Figure 33).

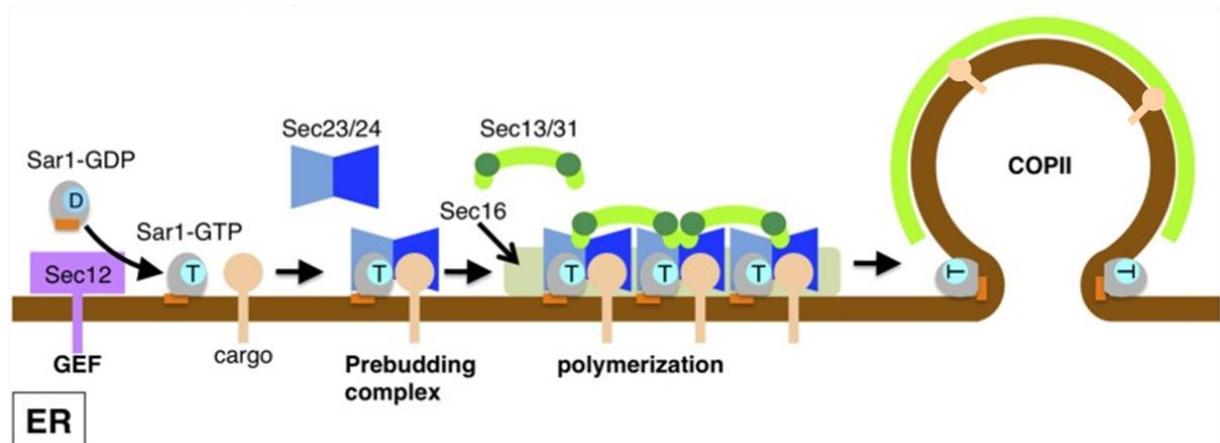


Figure 33 : Formation des vésicules COPII. Schéma illustrant la formation des vésicules COPII ainsi que tous les acteurs impliqués de Sar1, à Sec23/24 et Sec13/31, permettant la capture du cargo dans les vésicules. *Adapté de (Yorimitsu et al., 2014).*

b) Le compartiment intermédiaire ou ERGIC

C'est dans les années 1980 qu'une importante complexité dans les structures membranaires entre le RE et le Golgi a été observée. Des vésicules non-clathrine dépendantes sont détectées à cet endroit-là et participent au transport RE-Golgi. On parle d'éléments tubulo-vésiculaires (Merisko et al., 1986) qui forment le compartiment intermédiaire (ERGIC = Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment) (Lindsey and Ellisman, 1985; Scales et al., 1997). C'est un compartiment clé pour médier le transport des protéines exportées entre le RE et le Golgi (Saraste and Kuismanen, 1992).

Cependant c'est un compartiment qui reste encore énigmatique et pour lequel on se demande s'il est entièrement stable, s'il est transitoire ou s'il fait partie intégrante de l'appareil de Golgi... La première hypothèse émise a été que l'ERGIC serait une organelle entièrement mobile. Il serait créé par la fusion des vésicules COPII entre elles puis les structures ainsi formées se déplaceraient le long des microtubules

jusqu'à atteindre le Golgi où ils pourraient fusionner pour former de nouvelles citernes du *cis*-Golgi (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006; Scales et al., 1997). Maintenant il est plutôt accepté que l'ERGIC est un compartiment à part entière combinant des aspects stables et dynamiques. Les vésicules COPII fusionneraient avec les structures existantes de l'ERGIC (Hughes and Stephens, 2008). Ces mouvements antérogrades seraient de courtes distances et microtubules-dépendant (Watson et al., 2005). Puis des transporteurs COPI (vésicules recouvertes d'un manteau composé de protéines COPI) issues de l'ERGIC permettraient de relier l'appareil de Golgi via les microtubules et notamment grâce au complexe dynéine/dynactine (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006; Ben-Tekaya et al., 2005; Watson and Stephens, 2005). Une fois au niveau du *cis*-Golgi, les transporteurs fusionneraient avec ce dernier (Figure 34). Il existerait également une transition directe entre l'ERGIC et la voie d'endocytose, sans transition par le Golgi (Saraste and Marie, 2018).

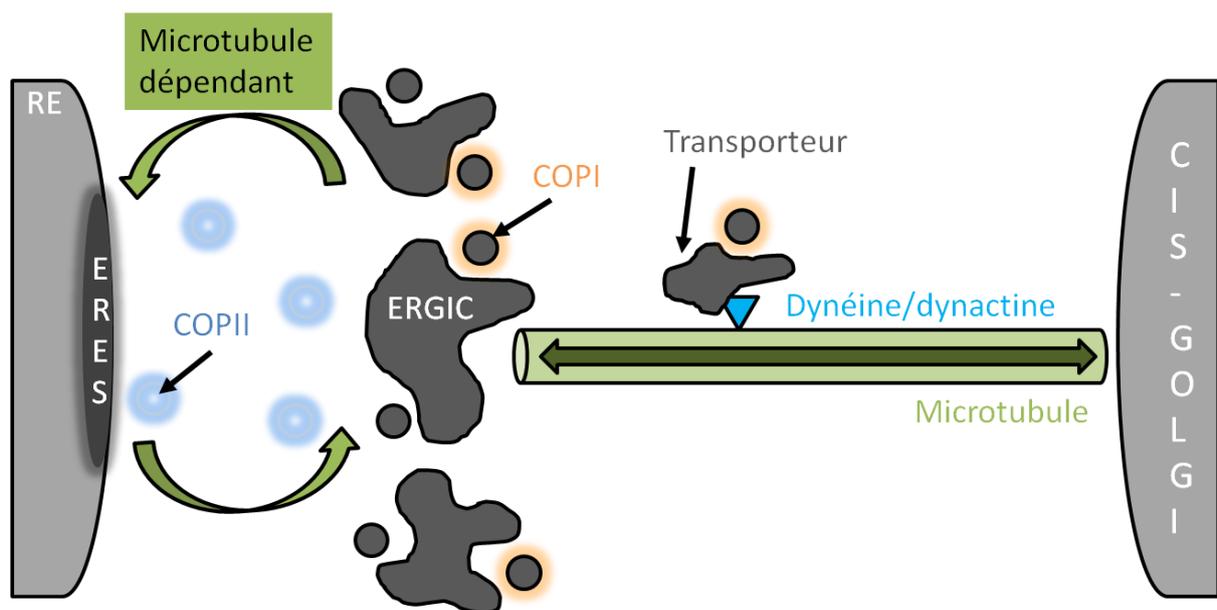


Figure 34 : Implication du compartiment intermédiaire (ERGIC) dans le transport RE-Golgi. Schéma représentation le rôle de l'ERGIC dans la voie de biosynthèse. Les vésicules COPII sortant des sites de sorties du reticulum (ERES) vont fusionner avec les éléments tubulo-vésiculaires qui composent l'ERGIC. Ce transport antérograde serait de courte distance et impliquerait les microtubules. L'ERGIC acquiert les propriétés de l'appareil de Golgi avec la formation de transporteurs (tubules/vésicules) COPI qui seront déplacés sur de longues distances, grâce aux moteurs moléculaires dont notamment le complexe dynéine/dynactine. Une fois le *cis*-Golgi atteint, ils fusionneront avec pour former de nouvelles citernes. Un transport rétrograde du Golgi à l'ERGIC est également réalisable le long des microtubules. Le transport rétrograde ERGIC-RE existe aussi et les microtubules seraient également impliqués. La nature des transporteurs reste à ce jour encore discutée.

L'activité COPII dans la voie de sécrétion serait restreinte au 300-500 nm de l'espace entre le RE et l'ERGIC (Peotter et al., 2019). Puis ce serait les vésicules COPI, qui en plus d'intervenir dans le transport rétrograde Golgi-RE ou Golgi-ERGIC, transporterait les cargos de l'ERGIC au Golgi, mais la nature des transporteurs issues de l'ERGIC n'étant pas encore claire, des expériences supplémentaires sont requises (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006).

Par l'utilisation de Nocodazole et de Brefeldine A (drogue inhibant indirectement le transport RE-Golgi en bloquant l'assemblage des COPI à la membrane du Golgi), il a été suggéré que les mouvements rétrogrades entre l'ERGIC et le RE seraient microtubule-dépendant (Lippincott-Schwartz et al., 1990).

Certaines protéines sont connues pour n'être transportée qu'entre le RE et l'ERGIC, c'est par exemple le cas de la protéine ERGIC53 ou des protéines contenant la séquence KDEL. La protéine membranaire ERGIC53 localisée dans l'ERGIC (Schweizer et al., 1988) est le marqueur spécifique de ce compartiment. C'est une protéine qui cycle entre le RE et l'ERGIC de façon pH dépendante et qui est utilisée afin de mieux comprendre l'organisation de la voie de biosynthèse, les différentes voies de trafic des protéines ainsi que leurs mécanismes d'adressage (Hauri et al., 2000). La séquence KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) est quant à elle retrouvée dans des protéines résidentes du RE. Effectivement, une fois dans l'ERGIC, la séquence KDEL de ces protéines est reconnue par le récepteur du KDEL. Cette reconnaissance permet le retour des protéines dans le RE. C'est pourquoi les protéines ayant cette séquence signal sont retenues dans le RE (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006). Au contraire les protéines n'ayant pas de signal de rétention dans leurs séquences seront secrétées vers la membrane plasmique.

La fonction majeure de l'ERGIC est le tri et le trafic des protéines mais au cours des dernières années, d'autres fonctions biosynthétiques semblent lui être attribuées comme le repliement des protéines, l'initiation de la O-glycosylation, la synthèse de lipides et de glycosaminoglycanes... Ce serait un compartiment de contrôle qualité au même titre que le RE (Saraste and Marie, 2018).

c) L'appareil de Golgi

Ce compartiment correspond à l'apposition de plusieurs membranes allant du cis-Golgi au trans-Golgi. Le cis-golgi reçoit les vésicules arrivant du RE/ERGIC et le trans-golgi fait sortir ces vésicules en direction de leur compartiment de fonction comme la membrane plasmique (Figure 32). L'hypothèse actuelle est que chaque citerne du golgi permettrait la maturation du cargo (Suda et al., 2017). Ainsi en plus d'être modifiée dans le RE, les protéines qui empruntent la voie de biosynthèse seront aussi modifiées dans le Golgi.

Les vésicules coatées COPI sont formées, tout comme les vésicules coatées COPII, par l'assemblage de différentes protéines. Leur formation démarre par l'activation de la GTPase Arf1 par le GEF GBF1. Arf1-GTP va permettre le recrutement des différentes sous-unités du complexe COPI. Une partie de ces sous-unités forment la couche interne et interagissent avec le cargo tandis que l'autre partie forment la couche externe du manteau composant la cage autour du cargo. Tout le complexe polymérise ensuite aboutissant à la formation des vésicules COPI (Beck et al., 2009) (Figure 35).

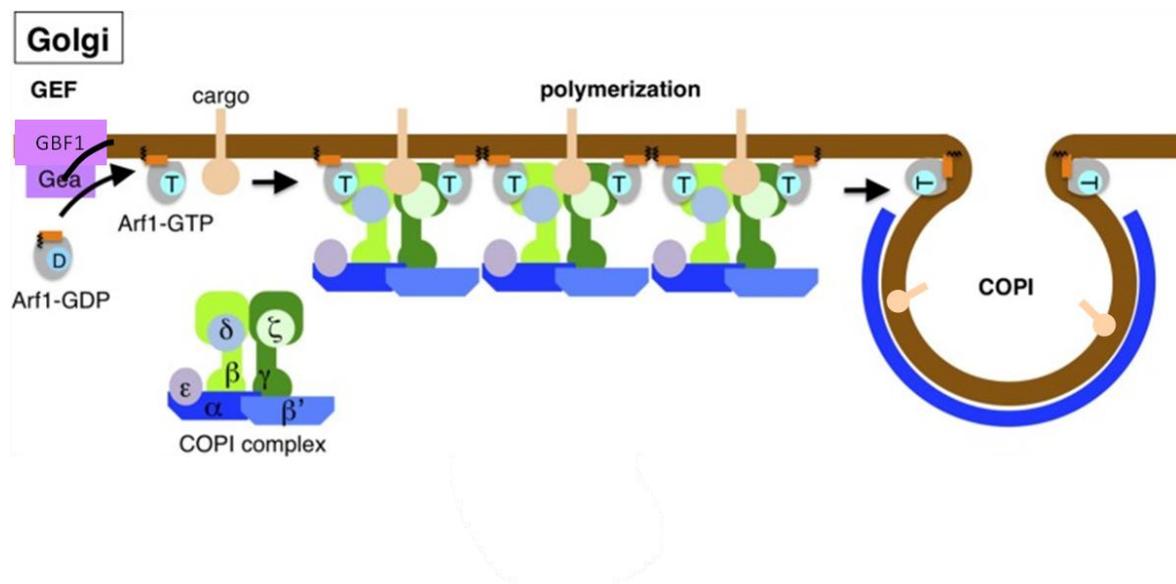


Figure 35 : Formation des vésicules COPI. Schéma illustrant la formation des vésicules COPI ainsi que tous les acteurs impliqués de Arf1 à la formation du complexe COPI, permettant la capture du cargo dans les vésicules. *Modifié de (Yorimitsu et al., 2014).*

Arf1 fonctionne principalement dans la génération de transporteurs comme les vésicules COPI impliquées dans le transport Golgi-ERGIC-RE et entre les citernes du Golgi mais la GTPase Arf1 est également retrouvée au niveau du trans-golgi, où elle jouerait un rôle sur la formation des vésicules à clathrine (Bottanelli et al., 2017; Saraste and Marie, 2018) nécessaires pour desservir les compartiments post-Golgi.

3) Les points de contacts

Le reticulum est également impliqué dans des contacts avec différentes organelles, on parle de sites de contacts membranaires (Friedman and Voeltz, 2011; Phillips and Voeltz, 2016). A leur niveau les membranes des organelles sont associées mais ne fusionnent pas et des complexes protéiques spécifiques à chaque organelle sont retrouvées permettant ainsi de réaliser des fonctions diverses comme le transfert de molécules d'une organelle à l'autre ou comme la biogenèse et la dynamique de l'organelle en question (Phillips and Voeltz, 2016). Le reticulum peut par exemple interagir avec les endosomes, le Golgi, les mitochondries ou avec la membrane plasmique (Gallo et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Le calcium fait partie des molécules pouvant être échangé via les points de contacts entre différentes organelles. Cet échange de molécules permet par exemple de propager un signal externe aux organelles intracellulaire et donc à toute la cellule. Dans les cellules de mammifères, les contacts RE-membrane plasmique, appelé aussi reticulum cortical, sont entre autre importants dans la régulation du calcium (Friedman and Voeltz, 2011). En effet la lumière du RE est le lieu de stockage majeur du calcium. Lorsque les stocks calciques sont déplétés, STIM1, protéine transmembranaire du réticulum, interagit avec ORAI, canal de surface, afin de faire rentrer du calcium, c'est le mécanisme de SOCE (*cf.* Chapitre 3 II.). C'est également au sein des fibres musculaires que les membranes du reticulum sont proches de la membrane plasmique et reliées par des protéines spécifiques (Schneider, 1994; Takeshima et al., 2000). Ces points de contacts forment les triades (citernes de reticulum encadrant une invagination de la membrane plasmique, le tubule-t) (Ogata and Yamasaki, 1997) et permettent aux potentiels d'action d'être propagé de la

membrane plasmique jusqu'au cœur de la fibre musculaire, grâce au complexe de relâchement de calcium.

II. Le reticulum et la voie de biosynthèse des cellules musculaires différenciées

1) Organisation du reticulum

Dans une cellule musculaire les organelles sont dispersées tout le long de la cellule. Le reticulum n'y échappe pas et comme détaillé dans le chapitre I.5a, il se compose de reticulum sarcoplasmique (RS) subdivisé en RS jonctionnel et longitudinal, respectivement impliqués dans le stockage et le repompage du calcium (Villa et al., 1993) (Figure 36).

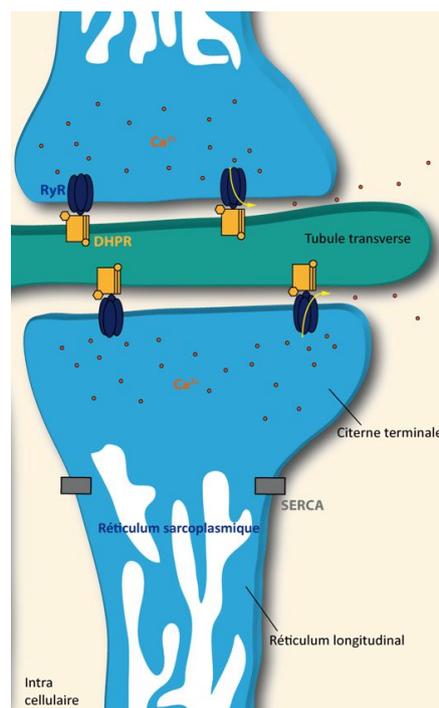


Figure 36 : Le reticulum sarcoplasmique d'une fibre musculaire. Au sein du muscle, le reticulum sarcoplasmique (RS) se subdivise en RS jonctionnel ou citerne terminale qui constitue les stocks calciques intracellulaires, et RS longitudinal qui permet le repompage du calcium grâce à la pompe ATPase SERCA.

Les différences physiologiques et morphologiques entre le RE et le RS sont assez imprécises. En effet, au sein du RS des protéines définissant le RE comme la calnexine, la calréticuline, BiP ou PDI sont retrouvées. Le RS présente également une activité de synthèse protéique tout comme le RE. Il est donc admis que les différents domaines formés par le RE et le RS au sein des cellules musculaires, formerait un continuum membranaire (Sitia and Meldolesi, 1992; Volpe et al., 1992). Malgré cela, il n'est pas encore totalement connu si l'organisation du reticulum et de la voie de biosynthèse est la même entre une cellule indifférenciée et une cellule musculaire. C'est pourquoi les questions portant sur la synthèse et le trafic des protéines musculaires restent ouvertes et débattues.

Pour tenter de mieux comprendre la morphologie et l'organisation du reticulum d'une fibre musculaire, des immunomarquages ont en premier lieu été réalisés avec des protéines caractéristiques du reticulum comme la calnexine, BiP, PDI, Sec23, VSVG et dont la localisation dans une cellule indifférenciée est connue, mais également avec des protéines du RS jonctionnel comme RyR1 et calséquestrine. A ce moment-là deux compartiments semblent ressortir. D'une part un compartiment localisé au niveau des bandes I, dans l'espace inter-fibrillaire, et d'autre part au niveau des lignes Z un compartiment dédié à l'export du reticulum vers le Golgi (Kaisto and Metsikkö, 2003; Rahkila et al., 1998, 1997; Sorrentino, 2011) (Figure 37). Les protéines pourraient se déplacer entre ces deux compartiments c'est-à-dire de leur lieu de synthèse au niveau des bandes I jusqu'aux sites d'export au niveau des lignes Z, ce qui suggère que le RE et le RS seraient en continuité l'un de l'autre (Kaisto and Metsikkö, 2003). De plus, il a été montré que les ARNm de la calséquestrine et du DHPR sont localisés sous le sarcolemme au niveau de la ligne Z appuyant l'idée que les sites de sortie du reticulum (ERES) seraient donc localisés à cet endroit-là permettant la translocation des protéines du reticulum (Nissinen et al., 2005).

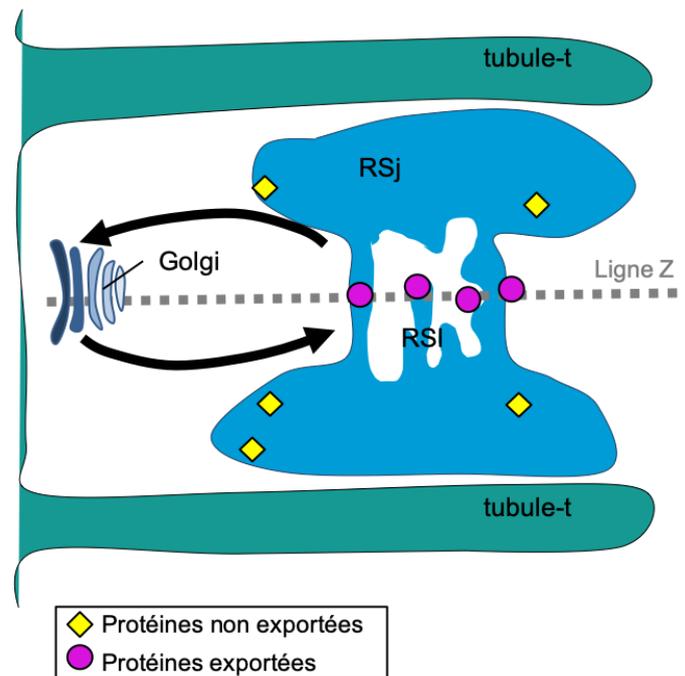


Figure 37 : Le reticulum dans une fibre musculaire adulte. Représentation schématique du reticulum et ses différents compartiments dans une fibre musculaire. La localisation des différents marqueurs du reticulum est indiquée : les ronds violets représentent les protéines situées dans le RS longitudinal (RSl) au niveau de la ligne Z et qui participeraient à la fonction d'export du reticulum, les losanges jaunes représentent les protéines situées dans l'espace inter-fibrillaire au niveau des bandes I et au sein du RS jonctionnel (RSj). *Adapté d'après (Kaisto and Metsikkö, 2003).*

Plus récemment il a été montré que le RS des cellules musculaires comporte des microdomaines lipidiques enrichis en protéines du RE et qui seraient responsables de la translocation, de la glycosylation et des modifications protéiques (Kaakinen et al., 2008). Ces complexes multiprotéiques aideraient à définir l'organisation des domaines spécifiques du RS et confirme l'idée d'une continuité membranaire entre le RE et le RS (Kaisto et al., 2002; Kaisto and Metsikkö, 2003; Rossi et al., 2008) (Figure 38). Les protéines pourraient se déplacer dans ce continuum de membranes depuis leur lieu de synthèse au niveau des bandes I jusqu'à leur compartiment de fonction.

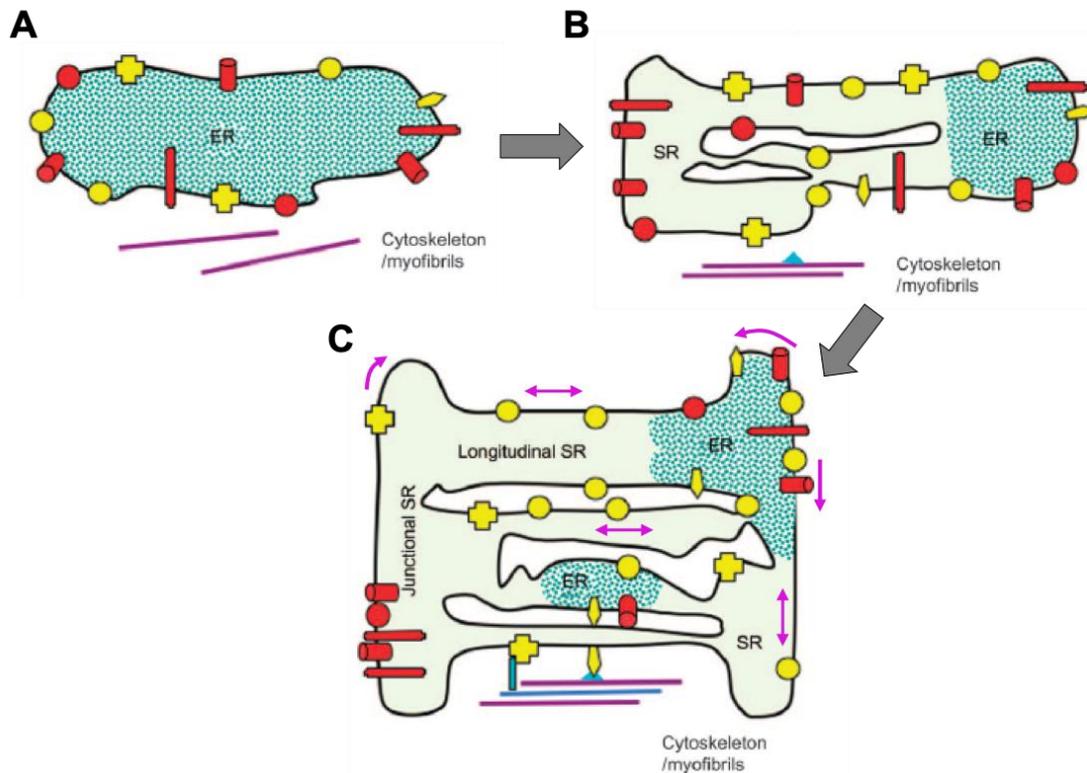


Figure 38 : Fonction et prganisation du reticulum sarcoplasmique (RS). (A) Les protéines du RS sont synthétisées et modifiées dans le RE. (B) Ensuite ces protéines vont diffuser du RE jusqu'au RS en cours de formation. (C) Les protéines du RS nouvellement formé se déplacent dans le RS où elles vont pouvoir former des complexe multiprotéique au niveau du RS jonctionnel, diffuser librement dans le RS longitudinal (flèches violettes) ou interagir avec le cytosquelette ou les myofibrilles. Les protéines du RS jonctionnel sont en rouge et celles du RS longitudinal en jaune. *D'après (Rossi et al., 2008).*

2) La voie de biosynthèse

La majorité des compartiments de la voie de biosynthèse sont retrouvés au sein d'une fibre musculaire. Effectivement et comme décrit dans le paragraphe précédent, dans les fibres musculaires la synthèse protéique se ferait au niveau de la bande I tandis que les ERES seraient à la ligne Z. L'appareil de Golgi est lui aussi présent dans les fibres musculaires (Lu et al., 2001; Ralston, 1993) tout comme les lysosomes et les endosomes tardifs avec une localisation autour des noyaux (Kaisto et al., 1999). Des vésicules d'exocytose également observées dans le muscle, seraient impliquées dans le trafic de certaines protéines (Cai et al., 2009a; Liu et al., 2001; Tsujita et al., 2004). Différentes études ont décrit ces vésicules comme localisées au niveau de la bande I et proches des tubules-t (Fox et al., 2013; Kaisto

et al., 1999). Il y aurait donc une conservation de la voie classique de biosynthèse avec les différents compartiments (reticulum, ERES, Golgi, etc) présents au sein d'une fibre musculaire adulte.

La distribution des composants de la voie de biosynthèse change, cependant, au cours de la myogenèse pour permettre au muscle adulte de remplir ses fonctions. L'appareil de Golgi acquiert une forme de collier de perles autour des noyaux mais est aussi présent sous la forme de multiples points éparpillés le long de la cellule musculaire (Kaisto and Metsikkö, 2003; Ralston, 1993; Rossi et al., 2008; Tassin et al., 1985b; Volpe et al., 1992) et cela de manière dépendant du type de fibres musculaires (Ralston et al., 1999). Chaque élément composant l'appareil de Golgi conserve néanmoins son organisation classique en empilement (Ralston et al., 1999). La réorganisation du Golgi au cours de la myogenèse serait due aux modifications des structures de Golgi pré-existantes plutôt qu'à la formation de nouvelles structures (Giacomello et al., 2019; Zaal et al., 2011) et elle concorderait aussi avec le remodelage du réseau de microtubules et du MTOC comme vu dans le chapitre 3 III.2.a (Tassin et al., 1985b, 1985a; Zaal et al., 2011). Les éléments du Golgi se retrouvent localisés au même niveau que les faisceaux de microtubules, sous la membrane plasmique et au centre de la cellule (Lippincott-Schwartz et al., 1990). De plus, il a été observé que la réorganisation du Golgi entraînait sa localisation à proximité des ERES (Lu et al., 2001; Ralston et al., 2001). Or, ceux-ci ont été montrés localisés proches des bouts (-) des microtubules (Lu et al., 2001). Ces résultats suggèrent donc que le remodelage du Golgi ainsi que des sites de sortie du reticulum serait microtubules dépendant et permettrait de former les unités dynamiques Golgi-ERES (Lu et al., 2001). Une fois mises en place ces unités permettraient le bon adressage des protéines de la membrane plasmique nécessaire à la différenciation musculaire comme la M-cadhérine (Giacomello et al., 2019). L'hypothèse actuelle est donc que le Golgi et les ERES pourraient se réguler mutuellement (Ronchi et al., 2014) et que le lien entre ces deux organelles dépendrait tout d'abord de leurs réorganisations respectives (Giacomello et al., 2019).

Le trafic au sein de la voie de biosynthèse est également un élément évoluant au cours de la différenciation musculaire. Deux transports sont à différencier : le transport rétrograde du Golgi au reticulum et le transport antérograde du reticulum au Golgi. Le premier ne semble pas particulièrement se modifier au cours de la myogenèse. En effet et comme c'est le cas dans les cellules mononucléées (Lippincott-Schwartz et al., 1990), le transport rétrograde emprunterait toujours les microtubules (Rahkila et al., 1997) quel que soit le stade de différenciation de la fibre musculaire. Le transport antérograde quant à lui évoluerait avec la différenciation musculaire. Dans les myoblastes et myotubes, les microtubules seraient utilisés pour déplacer les cargos du reticulum au Golgi alors que dans une fibre adulte ce ne serait pas le cas (Nevalainen et al., 2010), appuyant l'idée que le Golgi et les ERES seraient liés (Giacomello et al., 2019; Lu et al., 2001; Ralston et al., 2001).

La réorganisation des composants de la voie de biosynthèse semble donc être un acteur clé dans la myogenèse permettant au muscle de se différencier correctement afin d'aboutir à une contraction musculaire correcte et efficace. Pour aboutir à cela, il a été suggéré que lors de la différenciation, les cellules musculaires pourraient avoir besoin d'augmenter l'efficacité de transport de leurs différents composants primordiaux au bon fonctionnement musculaire et/ou de mettre en place des itinéraires de transport spécifiques à activer au cours de la différenciation (Giacomello et al., 2019).

Des études ont en effet suggéré que les fibres musculaires pourraient avoir leur propre voie de biosynthèse ou du moins une voie muscle spécifique parallèle à la voie classique de biosynthèse. Rahkila et al., ont, effectivement, montré que dans les cellules musculaires, une voie post-Golgi existerait et permettrait de passer du trans-Golgi aux tubules-t via le réseau de microtubules (Rahkila et al., 1996). Les éléments du Golgi trouvés au centre des myotubes permettent sûrement de délivrer les protéines aux tubules-t. Ces auteurs suggèrent également la présence d'une voie muscle spécifique permettant le transport des protéines du RE au RS. En effet, l'utilisation de VSVG, protéine G du virus de la stomatite vésiculaire, comme outil pour marquer la voie de biosynthèse, a montré qu'une partie de VSVG reste sensible à la digestion par l'endoglycosidase H, c'est à dire qu'elle n'a pas traversé l'appareil de Golgi alors qu'une autre partie de la protéine, résistante elle à l'endoglycosidase H, est retrouvée au niveau des tubules-t et a donc traversé l'appareil de Golgi

Néanmoins il a été suggéré qu'après leur synthèse au sein du reticulum, les protéines du RS n'emprunteraient pas la voie de biosynthèse mais diffuseraient de leur lieu de synthèse jusqu'au RS jonctionnel ou longitudinal où elles résideraient (Rossi et al., 2008).

Le débat reste donc encore actuellement ouvert pour savoir comment les protéines musculaires seraient adressées à leur compartiment cible et si les protéines résidentes du RS diffuseraient dans le continuum de membranes réticulaires ou si elles emprunteraient la voie de biosynthèse classique ou muscle spécifique.

III. Adressage et rétention des protéines du complexe de relâchement de calcium à la triade

Le complexe de relâchement du calcium (CRC) regroupe un ensemble de protéines localisées spécifiquement et uniquement à la triade. Parmi ces protéines certaines sont situées dans le tubule-t et d'autres dans la lumière du RS ou dans les membranes du RS jonctionnel (les citernes terminales). Les mécanismes d'adressage et de rétention de ces protéines restent encore à définir même si différentes pistes sont évoquées.

1) Protéine du tubule-t : le DHPR

Le DHPR est la protéine majeure du CRC localisé dans les membranes du tubule-t, cependant ses mécanismes de trafic et de localisation dans les membranes du tubule-t sont encore incertains et plusieurs éléments pourraient avoir un rôle à jouer.

Tout d'abord concernant les mécanismes de transport du DHPR de son lieu de synthèse jusqu'au tubule-t sont encore discutés. Il a été montré que dans des cellules cardiaques, le DHPR atteindrait la membrane du tubule-t grâce à un transport vésiculaire clathrine dépendant qui utiliserait les microtubules pour accéder aux tubules-t. Les microtubules seraient directement ancrés aux tubules-t grâce à Bin1 (Fu and Hong, 2016; Hong et al., 2010). Cependant Linsley et al., suggèrent que le DHPR diffuserait plutôt dans la membrane du RS avant d'atteindre la

membrane du tubule-t suivant un mécanisme encore inconnu (Linsley et al., 2017) (Figure 39).

De plus, les sous-unités du DHPR notamment les sous-unités $\alpha 1s$ et β , semblent également jouer un rôle dans le bon adressage de la protéine. Il a été démontré que sans la sous-unité $\alpha 1s$, l'adressage de la sous-unité $\alpha 2$ dans les membranes du tubule-t est altéré (Flucher et al., 1991). La sous-unité β est également nécessaire au trafic de $\alpha 1s$ jusqu'au tubule-t (Buraei and Yang, 2010; Gregg et al., 1996; Linsley et al., 2017; Neuhuber et al., 1998) via la partie C-terminale de $\alpha 1s$ (Flucher et al., 2000).

Par rapport à la localisation spécifique du DHPR dans les membranes du tubule-t STAC3, protéine cytosolique localisée à la triade et impliquée dans le couplage excitation-contraction (Nelson et al., 2013), semble avoir un rôle à jouer. En effet, en l'absence de STAC3 dans des lignées cellulaires, la sous-unité $\alpha 1s$ exprimée dans ces cellules n'est localisée que dans le reticulum (Polster et al., 2015), suggérant un rôle de STAC3 dans la bonne localisation du DHPR aux tubules-t. Ce résultat a cependant été contredit par Linsley et al., qui suggèrent pour STAC3, un rôle plutôt stabilisateur du DHPR dans les tubules-t (Linsley et al., 2017) ainsi qu'un rôle dans la liaison du DHPR au RyR (Campiglio et al., 2018).

De plus, la composition lipidique du tubule-t pourrait également être impliquée dans la localisation du DHPR. Le tubule-t est un domaine de la membrane plasmique ayant une composition lipidique spécifique par rapport à celle de la membrane plasmique, vu qu'il est en effet plus riche en cholestérol et en phospholipides (sphingomyéline et phosphatidylsérine) (Pediconi et al., 1987; Roseblatt et al., 1981). Or, le DHPR est retrouvé majoritairement dans le tubule-t, et en de plus faible quantité dans les cavéoles (Jorgensen et al., 1989) ayant une composition lipidique proche de celle du tubule-t (cholestérol et sphingolipides) (Smart et al., 1999), ce qui laisse penser que la composition du tubule-t serait importante pour la localisation du DHPR.

Enfin, le RyR semble également avoir une place à jouer dans la localisation fine du DHPR en tétrades au sein du tubule-t. Effectivement, dans les cellules RyR KO, le DHPR est correctement localisé à la triade mais son organisation précise en tétrade est perdue (Protasi et al., 1998).

2) Les protéines du reticulum sarcoplasmique

Le RS se compose de différentes protéines ayant des rôles majeurs dans l'homéostasie calcique. Une partie de ces protéines est spécifiquement localisée dans les membranes ou dans la lumière du RS jonctionnel tandis que d'autres sont retrouvées au sein du RS longitudinal. Néanmoins leurs mécanismes d'adressage et de rétention dans leur compartiment de fonction, restent encore incertains.

a) Protéine de la lumière du RS : la calséquestrine

La calséquestrine est une protéine spécifiquement située dans la lumière du RS mais uniquement à la triade, ce qui signifie que certains éléments lui permettent de rester là. Il a été montré par Nori et al., que les modifications post-traductionnelles de la calséquestrine ainsi que ses interactions électrostatiques avec la junctine et la triadine ne sont pas impliquées dans sa rétention au sein du RS jonctionnel (Nori et al., 2001, 2000, 1999). Cependant dans les modèles de souris KO triadine et/ou junctine, la calséquestrine est délocalisée, suggérant que les interactions de la calséquestrine avec la triadine et la junctine seraient importantes pour maintenir la calséquestrine à la triade (Boncompagni et al., 2012). De plus, il a également été suggéré par l'utilisation de divers mutants de la calséquestrine, que les acides aminés N-terminaux 1 à 24 et C-terminaux 230 à 367 sont impliqués dans l'adressage de la calséquestrine dans les citernes terminales du RS ainsi que dans son agrégation (Nori et al., 2006).

Concernant le transport de la calséquestrine de son lieu de synthèse jusqu'à la lumière du RS jonctionnel, plusieurs hypothèses s'opposent. Certaines études sont en faveur d'un trafic vésiculaire de la calséquestrine. Il a été montré par l'utilisation de mutants Arf1 et Sar1, altérant respectivement la voie RE-Golgi et les ERES, que la calséquestrine une fois synthétisée sortirait du reticulum et emprunterait une voie muscle spécifique, sans traverser l'appareil de Golgi, lui permettant d'atteindre le RS jonctionnel (Nori et al., 2004). Des résultats précédant avaient déjà montré que la calséquestrine serait exclue d'un passage par le Golgi (Gatti et al., 1997) et donc qu'elle conserverait sa sensibilité à la digestion par l'endoglycosidase H (Campbell et al., 1983). D'autres études suggèrent qu'elle pourrait atteindre les compartiments

ERGIC/cis-Golgi avant d'être transportée jusqu'au RS jonctionnel. Il a en effet été montré dans des myotubes de poulet que la calséquestrine est transportée jusqu'au *cis*-Golgi avant de revenir au RS (Thomas et al., 1989) et elle a été trouvée accumulée au niveau de l'ERGIC dans des cardiomyocytes et des lignées cellulaires (Milstein et al., 2009). Ces résultats vont dans le même sens que ce qui a été observé pour une fraction de VSVG qui, au sein de cellules musculaires, irait jusqu'au compartiment intermédiaire ERGIC/*cis*-Golgi avant d'atteindre le RS (Rahkila et al., 1998). Il semblerait donc que dans le muscle, une voie de biosynthèse muscle spécifique existerait, en parallèle de la voie classique, et permettrait d'atteindre directement le RS. Ainsi les protéines emprunteraient plutôt l'une ou l'autre voie, suivant l'état de différenciation musculaire et/ou suivant la destination finale à atteindre.

Cependant des études plus récentes prônent plutôt un transport de la calséquestrine par diffusion dans le continuum de membranes RE/RS. En effet, au sein de cardiomyocytes, la calséquestrine sous forme monomérique diffuserait du RER périnucléaire au RS jonctionnel. Une fois ce compartiment atteint, elle polymériserait permettant ainsi d'y être retenue (McFarland et al., 2010; Sleiman et al., 2015) (Figure 39).

b) Protéines membranaires du RS

Plusieurs pistes sont également évoquées concernant les mécanismes qui permettent aux protéines transmembranaires du RS longitudinal ou jonctionnel d'être spécifiquement adressées dans leur compartiment cible et uniquement dans ce compartiment-ci.

SERCA est une protéine membranaire du RS longitudinal. La composition lipidique membranaire du RS pourrait être impliquée dans la rétention de SERCA car il a été montré qu'elle était insoluble dans certains détergents au contraire de protéines résidentes du RE (Kaakinen et al., 2008). De plus, la structure intrinsèque de SERCA semble jouer un rôle dans sa localisation puisqu'il a été montré que deux des dix hélices transmembranaires qu'elle comporte lui sont nécessaires pour sa rétention

dans le reticulum (Newton et al., 2003). Ces données suggèrent que la rétention de SERCA dans le RS longitudinal pourrait impliquer une interaction spécifique entre ses domaines transmembranaires et la composition membranaire du RS.

Le transport de SERCA jusqu'au RS longitudinal a été étudié au début des années 90 où il a été suggéré que SERCA ne quitterait jamais le continuum RE/RS (Karin and Settle, 1992) dans lequel elle diffuserait. Cependant des études plus récentes se positionne plutôt sur un passage de SERCA par le compartiment intermédiaire ERGIC avant son transport jusqu'au RS longitudinal (Newton et al., 2003). Ce résultat suppose donc que SERCA cyclerait entre le reticulum et l'ERGIC. De plus, le phospholamban et la sarcolipine, deux protéines transmembranaires interagissant avec SERCA, ont été trouvées localisées dans le RS et l'ERGIC dans des cardiomyocytes, mais pas dans le trans-Golgi (Butler et al., 2007). Ainsi, il semblerait que les protéines du RS longitudinal emprunteraient une voie muscle spécifique leur permettant d'être transporter jusqu'à l'ERGIC avant d'être ramenées dans le RS (Figure 39). Le processus permettant aux protéines résidentes du RS d'être ramenées de l'ERGIC au RS pourrait impliquer leurs domaines transmembranaires. En effet, il a été suggéré que la protéine RER1p, protéine transmembranaires de l'ERGIC/cis-Golgi, reconnaît des informations d'adressage au reticulum au niveau des domaines transmembranaires des protéines résidentes du reticulum. Ce mécanisme permettrait d'identifier ces protéines une fois dans l'ERGIC et de les renvoyer dans le reticulum à partir des compartiments post-reticulum (Sato et al., 2003, 2001, 1995).

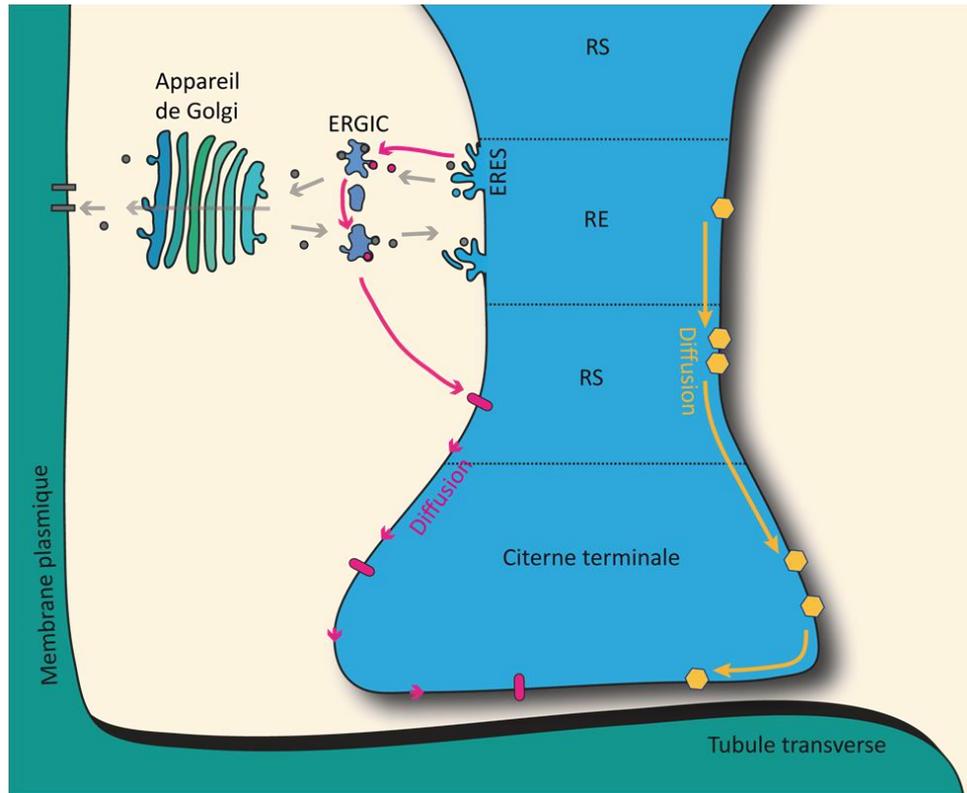


Figure 39 : Les voies potentielles de trafic au sein du muscle squelettique. Plusieurs hypothèses s'opposent par rapport au mécanisme d'adressage des protéines musculaires. Tout d'abord la voie de biosynthèse classique semble toujours être présente permettant à certaines protéines localisées à la membrane plasmique, et potentiellement au tubule-t, de traverser l'appareil de Golgi une fois sortie du reticulum pour atteindre la surface membranaire (voie grise). Concernant les protéines localisées dans le RS longitudinal ou jonctionnel/citerne terminale, les protéines pourraient soit diffuser dans le continuum de membrane RE/RS jusqu'à atteindre leur localisation finale (voie jaune), soit sortir du reticulum, aller jusqu'au compartiment ERGIC/cis-Golgi, avant qu'un signal inconnu ne les ramène dans le reticulum. Elles pourraient être ramenées directement dans leur compartiment final ou diffuser jusqu'à ce dernier (voie rose). RE = reticulum endoplasmique ; RS = reticulum sarcoplasmique ; ERES = Sites de sortie du RE ; ERGIC = Compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi.

Concernant RyR1, protéine transmembranaire du RS jonctionnel, il a été suggéré par expression des hélices transmembranaires de RyR1, dans des lignées cellulaires COS7, que ses hélices 1 et le 6 seraient responsables de sa rétention dans le reticulum (Meur et al., 2007). De plus, l'ankyrine B, protéine adaptatrice liée aux membranes, est connue pour se lier à différentes protéines comme RyR1 ou l'IP3R (Bourguignon et al., 1995, 1993) et permettrait de correctement les localiser dans les membranes du RS jonctionnel (Tuvia et al., 1999).

Le mode de transport de RyR1 jusqu'aux triades n'est pas connu. Néanmoins il a été montré que la cavéoline 3 (Cav3), protéine jouant un rôle dans le transport

vésiculaire intracellulaire, pourrait participer à son trafic vu qu'elle interagit avec RyR1 (Vassilopoulos et al., 2010).

Pour la triadine, une autre protéine du RS jonctionnel, il semblerait qu'elle ait dans sa séquence différents domaines lui permettant d'être correctement retenue à la triade. Ses parties N-terminale et C-terminale semblent jouer un rôle dans sa localisation au sein du RS jonctionnel (Rossi et al., 2014; Sanchez et al., 2018) et son domaine luminal C-terminal serait également impliqué dans son trafic (Fourest-Lieuvain et al., 2012; Rossi et al., 2014). Quant à la junctophiline, protéine de la triade permettant de lier le RS jonctionnel au tubule-t, il a récemment été montré que son domaine transmembranaire est responsable de sa localisation au sein du RS jonctionnel (Rossi et al., 2019).

Une fois leur localisation finale atteinte, les protéines du RS jonctionnel formeraient un complexe leur permettant d'être retenue (Rossi et al., 2008) et la triadine serait la protéine du CRC servant d'ancre aux autres protéines (Cusimano et al., 2009).

Toutes ces études montrent que dans le muscle, quelque soit le compartiment cible d'une protéine (tubule-t, RS longitudinal ou jonctionnel), les mécanismes d'adressages (diffusion dans le continuum RE/RS et/ou trafic vésiculaire) et de rétention des protéines ne sont pas encore totalement compris.

Objectifs de thèse

L'objectif général de ma thèse a été de comprendre comment les protéines de la triade sont-elles adressées dans leur compartiment spécifique, par quels mécanismes y sont-elles confinées.

La contraction musculaire est un mécanisme régi par de multiples éléments et chacun de ces éléments a un rôle prépondérant à jouer. Le message nerveux émit par le motoneurone doit être traduit en une libération massive de calcium permettant aux myofilaments de se contracter. C'est dans la transformation du message nerveux en un message chimique (libération calcique) que la triade a une place majeure. Pour aboutir à une importante sortie de calcium, il faut que la structure triadique en elle-même soit parfaitement formée c'est-à-dire que les contacts reticulum-membrane plasmique (RS/tubule-t) soient présents et que les protéines du CRC soient parfaitement localisées et agencées dans les triades. RyR1 et DHPR, chacun dans des membranes différentes, doivent se faire face pour interagir physiquement. Les autres protéines du CRC comme la triadine, la junctine ou la calséquestrine sont également des points clés dans la modulation des relâchements de calcium.

Néanmoins, peu de choses sont actuellement comprises sur les mécanismes responsables de l'adressage spécifique et de la rétention précise des protéines du CRC à la triade.

Mon travail de thèse a été divisé en trois parties. Les deux premières parties portent sur l'étude des mécanismes d'adressage et de rétention de la triadine à la triade, tout au long de la différenciation musculaire. Une partie de cette étude a fait l'objet d'un article en cours de soumission. J'ai également pris part à un projet visant à déchiffrer l'implication du réseau de microtubules, et notamment le rôle de MAP6, dans le fonctionnement musculaire. Cette partie de mon travail sera décrite dans un troisième chapitre et a fait l'objet d'une publication présentée dans ce manuscrit.

Matériel et Méthodes

I. Modèles animaux et éthique

1) Ethique

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

2) Lignée de souris KO triadine

Les souris invalidées pour le gène *TRDN* codant pour la triadine ont été créées et caractérisées par le laboratoire (Oddoux et al., 2009). Le KO a été induit par l'introduction de sites LoxP de part et d'autre de l'exon 1 du gène *TRDN* et par recombinaison après croisement avec des animaux transgéniques porteurs de la Cre recombinase. Les animaux viables et fertiles, présentent des défauts musculaires et cardiaques. L'entretien de la colonie se fait par croisement de souris hétérozygotes ou homozygotes permettant d'avoir les souris WT ou KO utilisées au cours de l'étude.

3) Lignée de souris KO MAP6

Les souris invalidées pour le gène MAP6 ont été développées par l'équipe du Dr. Annie Andrieux au sein du Grenoble Institut des Neurosciences. Elles ont été obtenues par l'insertion du gène LacZ à la place de l'exon 1 du gène MAP6 (Andrieux et al., 2002). La colonie étant maintenue à l'état hétérozygote à cause de l'infertilité des mâles KO MAP6, les souris KO MAP6 sont obtenues par croisement d'hétérozygote.

4) Lignée de souris KO RYR1

Les souris invalidées pour le gène du récepteur de la ryanodine de type 1 ont été données par le Pr. PD. Allen (Department of Anesthesia, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA). La souris KO n'est pas viable, les nouveaux-

nés meurent à la naissance d'insuffisance respiratoire. La colonie a été maintenue à l'état hétérozygote et les embryons ont été prélevés à E19-20.

II. Biologie moléculaire

1) Les plasmides

Certains plasmides étaient déjà disponibles au laboratoire comme les isoformes et mutants de la triadine ou les 6 domaines transmembranaires du RyR1 (RyR6TM). D'autres ont été achetés chez Addgene ou Clontech ou donnés par une autre équipe, comme détaillé dans le tableau ci-dessous. Enfin, certaines séquences ont été synthétisées par Genscript avant d'être sous-clonées dans un autre vecteur.

Plasmides	Description	Référence
pDsRed2-ER	Vecteur conçu pour marquer la lumière du RE, fusionné avec une RFP	#632409 (Clontech)
pPAGFP-VSVG	Protéine G du virus de la stomatite vésiculaire couplée à une PAGFP	#11915 (Addgene)
tdTomato-Sec61β-N-18	Sous-unité β du translocon, protéine transmembranaire du RE, couplée à une tdTomato	#58130 (Addgene)
pWPXLd	Vecteur lentiviral contenant une eGFP	#12258 (Addgene)
pDEST47-Arf1-GFP	ADP-ribosylation factor 1 (Arf1), impliqué dans le trafic des protéines au travers de la voie de sécrétion et couplé à une GFP	#67390 (Addgene)
pcDNA3 HA Arf1 DN T31N	Dominant négatif T31N déficient en GTP-binding	#10833 (Addgene)
pDEST47-Sar1-GFP	Secretion associated ras-superfamily gene1 (Sar1), impliqué dans les ERES et couplée à une GFP	#67409 (Addgene)
p150glued-CC1-DsRed	Domaine Coiled-coil 1 de p150glued, sous unité de la dynactine, couplé à DsRed	Dr Nicot (GIN)
EB3-mCherry	End-Binding Protein 3 marquant les bouts + des microtubules, couplée à mCherry	Dr Peris (GIN)
DHPRα1s-TurboGFP	Sous unité α 1s du DHPR couplé à une turboGFP	Dr Berthier (INMG)

Tous les plasmides ont été amplifiés par transformation bactérienne dans les souches Stbl3 ou DH5 α (Invitrogen). Les kits mini ou maxi prep (Macherey-Nagel) sont utilisés pour purifier l'ADN. Ce dernier est testé par transfection sur des cellules HEK293T puis envoyé à séquencer pour vérification avant de pouvoir être utilisé.

2) Les clonages

Afin de pouvoir produire des lentivirus, les différents plasmides utilisés au cours de l'étude ont tous été sous-clonés dans un vecteur lentiviral comme pWPXLd et couplé pour la majorité à une protéine fluorescente s'il ne l'était pas déjà.

J'ai réalisé d'autres sous-clonages comme expliqué ci-dessous.

Plasmides d'origine	Technique utilisée	Plasmides finales
- pPAGFP-VSVG - tdTomato-Sec61 β -N-18	Digestion EcoRI/NotI + ligation	pVSVG-tdTomato
- pVSVG-tdTomato - pWPXLd GFP	In-Fusion	pWPXLd VSVG-tdTomato
Hybrides : - pUC57 Sec61 ^{N-T95} - pUC57 Sec61 ^{TM-T95} - pUC57 T95 Δ Cter ^{TM-Sec61} - pWPXLd T95-PAGFP	Digestion EcoRI + ligation	Hybrides : - pWPXLd Sec61 ^{N-T95} -PAGFP - pWPXLd Sec61 ^{TM-T95} -PAGFP - pWPXLd T95 Δ Cter ^{TM-Sec61} - PAGFP

- L'Hybride Sec61^{N-T95} contient la partie N-terminal de la triadine et les parties TM et C-ter de Sec61 β
- L'hybride Sec61^{TM-T95} contient le domaine TM de la triadine et les N et C-ter de Sec61 β
- L'hybride T95 Δ Cter^{TM-Sec61} : contient le domaine TM de Sec61 β ainsi que les N et C-ter de T95 Δ Cter (un mutant de la triadine délété de sa partie C-terminale à partir de l'acide aminé 113)

3) Extraction d'ARN, RT-PCR et 5' RACE

a) Extraction d'ARN et RT-PCR

Pour l'extraction d'ARN, nous sommes repartis d'homogénats de muscles et de cerveaux de souris WT prélevés par Muriel Sébastien au cours de sa thèse et conservés à -80°C. Nous avons également utilisé des lignées de cellules C2C12, nous servant de cellules contrôles afin de s'affranchir de toute contamination nerveuse. Ces cellules ont été cultivées et différenciées puis les ARN totaux des homogénats et des cellules ont été extraits au Trizol (ThermoFisher Scientific) et reverse transcrits via l'utilisation d'amorce oligodT.

La réaction PCR a été faite avec le Phusion Master Mix (Thermo Scientific) et les amorces ont été créées de façon à amplifier les différents exons de MAP6 :

Exon	Direction	Séquence (5'- 3')
Exon 1	Sens	GAGGAGGTGGCGAGTACAGT
Exon 2	Sens	CCCCAGATGACAAGATGGTT
Exon 3	Antisens	TTCGCCTCAGCCAGTTTATT
Exon 4	Antisens	GATGCATCACTGGTGGGTTT

Puis les cycles et températures de PCR suivant ont été effectués :

- ❖ Dénaturation initiale : 1min à 98°C
 - ❖ Dénaturation : 10 sec à 98°C
 - ❖ Hybridation : 30 sec à 68°C
 - ❖ Extension : 15 sec à 72°C
- } 30 cycles
- ❖ Extension finale : 5 min à 72°C

Enfin, les contenus des tubes sont mis à migrer sur un gel d'agarose 1,5% pendant 1h à 100V.

b) 5' RACE

La 5' RACE a été réalisée avec le kit SMARTer® RACE 5'/3' (Clontech) à partir d'ARN totaux de souris WT.

En suivant le protocole du kit, l'ADNc a tout d'abord été synthétisé avant d'être amplifié par PCR. Un mix d'amorces universelles (fourni dans le kit) ainsi qu'une amorce spécifique de l'exon 2 du gène MAP6 (5'-GATTACGCCAAGCTTCTTCGGGCATTCTTGAAAGGCTCACTG -3') ont été utilisées.

Puis les cycles et températures suivantes ont été réalisés :

- ❖ 30 sec à 94°C
 - ❖ 4 min à 72°C
- } 5 cycles
-
- ❖ 30 sec à 94°C
 - ❖ 30 sec à 70°C
 - ❖ 4 min à 72°C
- } 5 cycles
-
- ❖ 30 sec à 94°C
 - ❖ 30 sec à 68°C
 - ❖ 4 min à 72°C
- } 25 cycles

Après la RACE PCR, les amplicons sont mis à migrer sur un gel d'agarose 1% pendant 1h15 à 100V. Les produits PCR sont ensuite purifiés par un kit PCR clean up (Macherey-Nagel) et séquencés.

III. Les cellules

1) Lignées cellulaires

a) Culture

Les lignées cellulaires utilisées ont été les HEK293T (ATCC), cellules humaines embryonnaires de rein immortalisées grâce à l'antigène T du SV40. Une fois décongelées en maintenant le tube à 37°C dans un bain mair, son contenu est repris dans du milieu de prolifération (DMEM 4,5g/l de glucose (Gibco 31966-021), FBS 10% (Gibco 10270) et PS 1% (Gibco 15140)) et centrifugé 5 min à 1500 rpm afin de culotter les cellules. Le culot est repris dans du milieu de prolifération et les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Ø 35 ou 100 mm. Une fois à confluence (environ $6 \cdot 10^6$ cellules), les cellules sont trypsinées (trypsine EDTA 0.05%, Gibco 25300) 5 min à 37°C, comptées puis à nouveau ensemencées dans une ou plusieurs autres boîtes suivant si l'on souhaite les garder ou les amplifier. Dès qu'elles ont environ atteint le passage 20, il a été convenu de ne pas les conserver. Les cellules HEK293T sont utilisées pour la production ou le titre des lentivirus (comme expliqué plus tard) ou pour tester des plasmides par transfection.

b) Congélation

Afin de maintenir des stocks de cellules à passage bas, les cellules sont congelées par passage dans du milieu de congélation (90% de FBS et 10% de DMSO (Sigma D2650) à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules par tube de congélation, et stockées dans des cryo-conservateurs.

c) Transfection

Pour tester l'expression de nos constructions, des transfactions sur HEK293T sont réalisées grâce à l'utilisation de Phosphate de Calcium (Clontech). Pour cela, à J1 100000 cellules sont ensemencées dans des boîtes de Ø 35mm. A J2, la transfection

est réalisée selon le protocole du kit (Ozyme) avec 3 µg d'ADN. Les cellules sont ensuite observées 48h après la transfection.

2) Cultures primaires

a) Dissection et stockage

A partir de nouveaux nés de souris, les muscles des pattes arrières sont prélevés et digérés pendant 30 min à 37°C dans de la trypsine à 0,25% (Gibco 25050-014) diluée au tiers dans du PBS (Gibco 14190-094) et supplémenté avec 2% de PS (Gibco 15140). Une dissociation mécanique est réalisée à l'aide d'une pipette pour libérer les cellules avant de procéder à deux centrifugations, l'une 5 min à 500 rpm et l'autre 10 min à 1500 rpm, pour se débarrasser des débris des fibres musculaires et ne garder que les cellules. Le culot obtenu est repris dans du milieu de prolifération (HAM F-10 (Gibco 41550-088), FBS certifié 20%, PS 2% et UltroSer 2% (Pall 15950-17)) et les cellules sontensemencées sur une boîte Ø 35mm/embryon préalablement recouvertes de laminine (BD Biosciences 354232) et mis à l'incubateur 37°C et 5% de CO₂ jusqu'à confluence.

Après 3 jours de prolifération, la confluence est atteinte, les cellules sont donc congelées pour être conservées. Pour ce faire, elles sont trypsinées, comptées, congelées dans un milieu composé de 25% de FBS certifié, 10% de DMSO et 65% de HAM F-10, puis stockées à -80°C et en azote.

b) Ensemencement et culture

Pour leur permettre une bonne adhésion, les cellules musculaires sont cultivées sur une couche de laminine ou de matrigel.

Pour constituer une couche de laminine, les boîtes sont recouvertes d'une goutte de 200µl de laminine (Corning) à 10 ng/µl diluée dans du PBS+Ca²⁺/+Mg²⁺ et mises en incubation 30 min à 37°C. Puis la laminine est retirée et les boîtes mises à sécher sous le PSM. Les boîtes coatées de laminine servent principalement pour les Western Blot réalisés sur cellules.

Pour constituer une couche de matrigel, une goutte de 50µl de matrigel (Corning) diluée au 100^{ème} dans du HAM F-10 supplémenté avec 2% de PS est déposée au fond des boîtes avant d'être mis à 37°C pendant 3h. Puis le matrigel est retiré avant d'ensemencer directement les cellules. Les boîtes recouvertes de matrigel sont principalement utilisées pour les expériences d'observation au microscope allant de 16h à 9 jours de différenciation.

Quelle que soit la méthode d'adhésion choisie, les cellules sont décongelées à 37°C puis le contenu du tube est repris dans du milieu de prolifération (HAM F-10 (Gibco 41550-088), FBS certifié 20%, PS 2% et UltroSer 2% (Pall 15950-17)) et centrifugé 5 min à 1500 rpm. Les cellules sont comptées afin d'ensemencer : 50 000 cellules dans une goutte de 50 µl de milieu de prolifération, sur les boîtes préalablement recouvertes de matrigel, ou 200 000 cellules dans une goutte de 200 µl de milieu de prolifération, sur les boîtes recouvertes de laminine. Les boîtes sont ensuite mises à l'incubateur 37°C et 5% de CO₂.

c) Transduction et différenciation

Le lendemain de l'ensemencement, les cellules peuvent être transduites par différents lentivirus suivant l'usage voulu. Dans ce cas, des volumes variables de virus sont déposés sur les cellules. Ces volumes sont calculés de manière à obtenir une MOI (Multiplicity Of Infection) de 5 représentant le nombre d'unité infectieuse par cellule. Ils sont calculés par la formule suivante:

$$\text{Volume du virus} = \frac{\text{MOI} \times \text{Nombre de cellules ensemencées}}{\text{Titre du virus}}$$

Après au moins 6h d'incubation avec le virus, les cellules sont induites en différenciation grâce au passage dans un milieu de différenciation (DMEM 1g/l de glucose (Gibco 21885-025), Sérum de Cheval 2% (Gibco 26050-070) et 1% PS). Les jours de différenciation sont comptés à partir de ce moment là.

Si les cellules sont gardées en différenciation sur du long terme, une 2^{ème} couche de matrigel est déposée par-dessus pour éviter qu'elles ne se détachent à cause des contractions spontanées. Pour cela, après 2 jours de différenciation, le matrigel est dilué au 1/3 dans du milieu de différenciation et 200 µl sont déposés par boîtes

directement sur les cellules. Puis du milieu de différenciation supplémenté en agrine (50ng/ml, R&D Systems) est ajouté afin de stimuler le processus de différenciation.

d) Transfection et différenciation

Le lendemain de l'ensemencement, les cellules ensemencées à 50 000 cellules dans 50µl, peuvent être transfectées par des siRNA contrôle ou contre la kinésine Kif5b (Dr Gache, INMG). Pour cela 0,2µl de siRNA 10µM ont été ajoutés dans 10µl de milieu Opti-MEM (Gibco 31985-047). En parallèle 1,2µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668-027) ont été mélangés à 10µl de milieu Opti-MEM, puis le mélange à base de lipofectamine 2000 a été mélangé à celui contenant le siRNA et mis à incuber 5min à température ambiante. Le milieu de prolifération des cellules a été retiré et remplacé par 35µl de milieu de prolifération sans antibiotique puis 20µl du mix siRNA/lipofectamine ont été déposés sur les cellules. Après au minimum 6h d'incubation, les cellules sont induites en différenciation grâce au passage dans un milieu de différenciation (DMEM 1g/l de glucose (Gibco 21885-025), Sérum de Cheval 2% (Gibco 26050-070) et 1% PS). Les jours de différenciation sont comptés à partir de ce moment là.

3) Electroporation et fibres dissociées

a) Electroporation

Le protocole de DiFranco et al. 2009 a été suivi. Après l'anesthésie de la souris avec de l'isoflurane 3%, 10 µl de Hyaluronidase (sigma) à 2 mg/ml sont injectés en sous-cutané dans la paume de la patte arrière de la souris et agissent pendant une heure. 50 à 100 µg de plasmide sont injectés dans la patte arrière de la souris, en sous-cutané avant de procéder à l'électroporation. Pour ce faire, des aiguilles d'acupuncture sont insérées perpendiculairement à la patte de la souris de façon à être espacées d'environ 1 cm, et elles sont reliées à l'électroporateur (BTX ECM830) par des électrodes. 20 impulsions de 20 ms chacune sont réalisées à un voltage de 100 V/cm et une fréquence d'1 Hz.

b) Préparation des fibres dissociées

Cinq jours après l'électroporation, les muscles FDB des souris sont prélevés et les fibres sont dissociées. Tout d'abord l'animal est euthanasié, pesé, ses pattes arrière sont prélevées et la peau une fois ouverte est épinglée sur un support. Le tendon de surface de la patte est coupé permettant de détacher le muscle, et les adhérences au niveau des doigts sont elles aussi sectionnées. Le FDB ainsi prélevé est ensuite digéré dans une solution contenant de la collagénase (sigma) à 1,5 mg/ml et du DMEM 4,5g/l de glucose, pendant 45 min à 37°C. Le muscle est rincé dans du DMEM et placé dans 250 µl de DMEM dans des tubes en verre, avant d'être dissocié mécaniquement grâce à l'utilisation de différentes pipettes en verre rodé de taille décroissante. Les fibres musculaires ainsi obtenues sont placées pendant 45 min à 37°C ou à 4°C sur la boîte pour qu'elles adhèrent puis soit elles sont placées dans des boîtes coatées au préalable avec du matrigel (1/10) soit elles sont fixées en suspension en PFA 4% (ajout de 750 µl de PFA 16%).

IV. Les lentivirus

1) Principe et fonctionnement

Les lentivirus sont une classe de rétrovirus dont fait partie le HIV (Human Immunodeficiency Virus). Ils ont la capacité de transduire des cellules quiescentes et en division. Ils peuvent contenir des transgènes jusqu'à 5-6 kpb mais la valeur haute recommandée est de 4kb à défaut d'avoir un titre viral moins bon. Ils permettent aux transgènes qu'ils contiennent de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, une fois que l'ARN aura été reverse transcrit.

Au cours de l'étude j'ai produit des lentivirus, au sein du laboratoire de l'institut (P2 virologie), par triple transfection de plasmides sur des HEK293T.

2) Production

Pendant sept jours, des cellules HEK293T (ATCC) ont été décongelées puis amplifiées afin de pouvoir avoir 36 boîtes de pétri (Ø 100mm) à $2,6 \cdot 10^6$ cellules/boîtes à J0. A J1, les boîtes sont transfectées grâce au Phosphate de Calcium (Clontech) avec les trois plasmides viraux nécessaires : psPAX2 (Addgene plasmid #12260) contenant les gènes de capsid gag et pol, VSVG (Addgene plasmid #14888) contenant le gène de l'enveloppe virale et le transgène d'intérêt. En fin de journée le milieu de culture (DMEM 4,5g/l glucose, FBS 10% et PS 1% (Gibco 15140)) est changé pour éviter une cytotoxicité des réactifs. A J3, le surnageant des boîtes, contenant les particules virales, est récupéré, filtré avec un filtre de 0,45 µm puis centrifugé à 20 000 rpm à 4°C pendant 2h. Les culots ainsi obtenus sont remis en suspension toute la nuit à 4°C dans 150 µl de milieu de culture (DMEM 4,5g/l glucose, FBS 10% et PS 1% (Gibco 15140)). Le lendemain, les particules virales sont aliquotées, congelées dans de l'azote et stockées à -80°C.

3) Titration

L'obtention du titre de chaque virus produit a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. Pour ce faire, à J1 des cellules HEK293T ont étéensemencées dans des plaques 6 puits ou dans des Ibdidis (#81156 Biovalley – Clinisciences) à une densité de 100 000 cellules/boîtes ainsi que dans deux boîtes de pétri (Ø 35mm). A J2 les cellules contenues dans les deux boîtes de Ø 35mm sont trypsinées et comptées dans le but d'obtenir un nombre précis de cellules au moment de la transduction. Les cellulesensemencées sur les ibididis ou sur les plaques 6 puits sont transduites avec des volumes croissants de virus préalablement dilué au 10ème dans du milieu de culture (DMEM 4,5g/l glucose, FBS 10% et PS 1% (Gibco 15140)). 48h plus tard, les cellules sont observées au microscope confocal Zeiss LSM 710, en transmission et en fluorescence (488 nm ou 561nm) ou après photo-activation (405 nm) pour les plasmides contenant la PAGFP.

Le pourcentage de cellules fluorescentes est calculé à partir des images acquises sur la totalité des champs, ce qui permet de calculer le titre de chaque virus en unités infectieuses par ml (UI/ml) grâce à la formule suivante :

$$\text{Titre} = \% \text{ de cellules fluo} \times \frac{\text{nombre de cellules transduites à J2}}{100} \times \text{facteur de dilution} \times \frac{\text{volume de milieu}}{\text{volume de virus ajouté}}$$

V. Immunomarquages et anticorps

Les différents anticorps primaires et secondaires utilisés dans l'étude sont listés dans les deux tableaux ci-dessous, ainsi que les dilutions ayant servi pour les immunomarquages et le nom du fournisseur.

1) Anticorps primaires

Protéine ciblée	Espèce	Dilution IF	Référence
GFP	Lapin	1/1000	Abcam ab290
GFP	Poulet	1/500	Abcam ab13970
RFP	Lapin	1/1000	Tebu-bio 600-401-379
ERGIC53/p58	Lapin	1/125	Sigma E1031
GM130	Souris	1/1000	BD Biosciences 610822
N-Ter Triadine	Lapin	1/500	Laboratoire
C-Ter Triadine	Lapin	1/500	Laboratoire
C-Ter Triadine	Cobaye	1/200	Laboratoire
C-Ter RyR1	Cobaye	1/200	Laboratoire
RyR1	Souris	1/500	DSHB 34C
DHPRα1s	Souris	1/500	Abcam ab2862
α-Actinine	Souris	1/500	Sigma A7811
β-Tubuline	Souris	1/100	Sigma T5201
Climp63	Lapin	1/500	Bethyl A302-257A
SERCA	Cobaye	1/100	Dr. Lompré
CSQ1	Souris	1/100	ABR MA3-913
Kinectine	Lapin	1/250	Sigma K1644
COPII	Lapin	1/100	Invitrogen PA1-069A

2) Anticorps secondaires

Cible	Fluorochrome	Dilution IF	Référence
Lapin	A488	1/500	Invitrogen 11008
	Cyanine 3	1/500	Jackson 115-165-144
	Cyanine 5	1/500	Jackson 711-175-152
Souris	A488	1/500	Invitrogen 11029
	Cyanine 3	1/500	Jackson 115-165-146
	Cyanine 5	1/500	Jackson 715-175-150
Cobaye	A488	1/500	Invitrogen 110074
	Cyanine 3	1/250	Jackson 706-165-148
	Cyanine 5	1/500	Jackson 706-175-148
Poulet	A488	1/200	Invitrogen A11039
Phalloïdine	TRITC	1/1000	Dr Peris (GIN)

3) Immunomarquage

Après fixation des cellules et des fibres adultes en PFA 4% pendant 20 min à température ambiante ou en Méthanol -20°C pendant 6 min, elles ont été perméabilisées dans du PBS-Triton 1% pendant 15 min. Pour bloquer les sites de fixations non spécifiques, les cellules et fibres adultes sont ensuite saturées pendant 20 min dans un tampon contenant du PBS-Triton 0,1%, du sérum de chèvre 2% et 0,5% de BSA (Bovin Serum Albumine). L'incubation avec les anticorps primaires dilués dans du tampon de saturation se fait à 4°C sur la nuit. Le lendemain, les cellules et les fibres sont lavées trois fois 10 min dans du PBS-Triton 0,1%, puis les anticorps secondaires, une fois dilués dans du tampon de saturation, sont déposés sur les cellules pendant 2h, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après un lavage de 10 min dans du PBS 1X, les cellules et les fibres sont mises en présence de Hoechst 1 µg/ml (Life Technologies 33258) dilué dans du PBS, pendant 10 min à l'abri de la lumière pour colorer les noyaux. Enfin, des lamelles sont montées avec du fluorosave (Calbiochem 345789) sur les boîtes Ibdidis, mises à sécher à température ambiante puis observées au microscope confocal.

VI. Microscopie et analyses

1) Traitements pharmacologiques

Comme répertorié dans le tableau ci-dessous, différents traitements pharmacologiques ont été utilisés, notamment pour étudier leurs effets sur les mouvements des vésicules de triadine. La concentration utilisée, le temps d'incubation sur les cellules ainsi que le fournisseur sont indiqués.

Nom	Concentration	Incubation	Référence
Nocodazole	10 μ M	1h	Sigma R17934
	75 nM	1h	
Ciliobrevine D	50 μ M	1h	Sigma 250401
Brefeldine A	5 μ g/ml	1h	Sigma B7651
Latrunculin A	5 μ M	1h	Sigma L5163
Di-8-ANEPS	10 μ M	45'	Life Technologies D3167

2) Imagerie confocale

a) Immunomarquages et analyse de colocalisation

Une fois les immunomarquages réalisés, les cellules et les fibres adultes sont observées au microscope confocal Zeiss LSM 710, couplé à un module Airy-scan, grâce à l'objectif à immersion x63 ayant une ouverture numérique (N.A) de 1.40. Les images générées sont traitées à l'aide des logiciels ImageJ et Adobe Photoshop 7.0.

Pour quantifier la colocalisation, des images acquises dans les mêmes conditions de taille de coupe optique et de taille de pixels sont utilisées. Une macro ImageJ a été réalisée précédemment au laboratoire et adaptée par le Dr Denarier. Cette macro d'analyse de colocalisation se base sur une méthode de corrélation. Des masques binaires sont réalisés pour chacun des deux canaux ciblés permettant d'obtenir le chevauchement entre les deux canaux et donc le nombre de pixel de l'image qui contient les deux canaux. Le ratio nombre de pixel obtenu/nombre total de pixel d'un

canal est calculé donnant ainsi le pourcentage de colocalisation de ce canal par rapport à l'autre.

b) Cellules vivantes

Spinning-Disk Confocal

Les cellules musculaires différenciées pendant le temps choisi sont observées au microscope inversé couplé à un système confocal spinning-disk (Zeiss). Elles sont placées dans une chambre d'incubation afin d'être maintenue à 37°C et 5% de CO₂ tout au long de l'expérience. Les cellules sont observées à l'objectif à immersion x63 avec une image/seconde pendant 121 secondes.

Pour analyser les mouvements des vésicules de triadine, le plugin MTrackJ d'ImageJ permet de tracer les trajectoires de chaque vésicule et d'en tirer les vitesses de déplacement correspondant. En ce qui concerne la fraction mobile, dans un ROI de 30 µm de côté pris aléatoirement sur une cellule, le nombre de vésicules qui bougent est compté puis est reporté au nombre total de vésicules présentes dans le ROI, donnant ainsi le pourcentage de vésicules qui se déplacent c'est-à-dire la fraction mobile.

Confocal Zeiss LSM 710

Les expériences de photoactivation ont été réalisées sur ce microscope. La photoactivation consiste à l'utilisation d'une GFP modifiée sur quelques acides aminés pour la rendre photoactivable (PAGFP) (Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002). Cela signifie que le spectre d'absorption de cette PAGFP est modifié de façon qu'une fois excitée à 488 nm, elle n'émette que peu de fluorescence. C'est l'utilisation d'un laser à 405nm qui entraîne un changement de conformation de la PAGFP, lui permettant ainsi d'absorber à 488 nm et ainsi d'émettre de la fluorescence et donc d'être détectée.

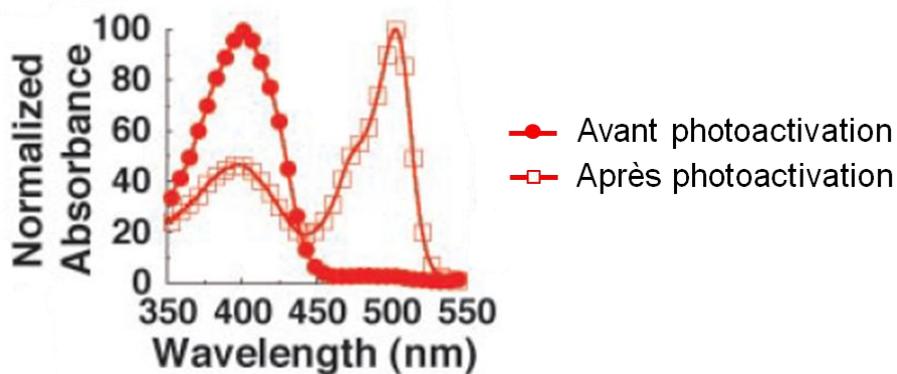


Figure M1 : Spectres d'absorbance de la PAGFP avant (rond rouge) et après (carré blanc) photoactivation. D'après (Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002).

Pour les expériences de photoactivation, les cellules vivantes sont placées sur un insert chauffant pour les maintenir à 37°C et sont observées à l'objectif à immersion x63. Les expériences de photoactivation ont été réalisées en mode spectral, avec le module de FRAP du logiciel ZEN (Zeiss). Ce mode spectral permet que les fluorescences émises (DsRed excitation 561 nm et PAGFP excitation 488 nm) soient obtenues en parallèle entraînant ainsi une réduction du temps d'acquisition. Toutes les expériences ont été faites avec les mêmes puissances laser et gains.

Pour réaliser la photoactivation des protéines photoactivables, une région d'intérêt (ROI) est choisie sur la cellule repérée puis un flash UV est appliqué dans cette région. Ce flash UV est réalisé avec le laser 405 nm et son paramétrage est le suivant : 50% dans la région d'intérêt désignée après les 3 images pré-activation, avec un balayage unidirectionnel de cette région de 1,58 μ s.

Deux protocoles différents ont été suivis : les simples activations ou les itérations. Le premier consiste à prendre 43 images au format 1024x1024, 8 bit, sans moyennage, pendant 169 secondes à raison d'une image toutes les 4 secondes et avec 3 images pré-activation. Le deuxième, comprend 43 images en 512x512, 8 bit, sans moyennage, pendant 87 secondes à raison d'une image toutes les 2 secondes. On parle d'itérations car un flash UV est appliqué toutes les 4 images au contraire du protocole de simple activation qui ne comprend qu'un seul flash UV.

Pour analyser les films ainsi obtenus, les logiciels ZEN, ImageJ et GraphPad ont été utilisés. Pour corriger le photoblanchiment des films, un rapport entre l'intensité de fluorescence du ROI sélectionné et celle de tout le champ, a été calculé. Ensuite,

pour chaque film, le bruit de fond a été soustrait en prenant la moyenne du bruit de fond présent sur les 3 images pré-activation. Afin d'observer la décroissance de fluorescence à l'intérieur du ROI, les films ont été normalisés entre 0 et 1 : 0 étant la ligne de base avant photoactivation et 1 l'intensité de la première image juste après la photoactivation. Les courbes ainsi obtenues suivent une exponentielle décroissante permettant d'en extraire les valeurs de $t_{1/2}$ de chacune des protéines suivies.

Résultats

**Partie 1 : Trafic de la triadine au
début de la différenciation
musculaire**

Au cours de ma thèse j'ai poursuivi et complété le travail de thèse de Muriel Sébastien concernant la dynamique des protéines du complexe de relâchement du calcium (CRC). Ces protéines sont uniquement retrouvées à la triade et y sont précisément organisées dans le but de permettre les relâchements de calcium nécessaire à la contraction musculaire. Néanmoins les mécanismes d'adressage et de rétention de ces protéines à la triade ne sont pas connus. C'est pourquoi l'étude présentée ici se focalise sur la triadine (T95), protéine du CRC qui servirait d'ancre aux autres protéines du complexe (Cusimano et al., 2009), grâce à ses différentes interactions avec RyR1, la calséquestrine et indirectement avec les microtubules via Climp63 (Guo and Campbell, 1995; Knudson et al., 1993; Kobayashi et al., 2000; J. M. Lee et al., 2004; Osseni et al., 2016). Dans le but de suivre le trafic de la triadine au sein du muscle, des chimères de triadine fluorescente ont été créées et exprimées dans des cultures primaires de myoblastes issus de souris triadine KO (*TRDN* KO). Ces myoblastes ont ensuite été mis en différenciation afin d'obtenir des myotubes à différents degrés de maturité, puis ils ont été observés au microscope et le trafic de la triadine fluorescente a pu être observé et analysé.

I. Caractérisation du modèle cellulaire

1) Les clusters de triadine sont mobiles dès le début de la différenciation

En ré-exprimant T95-GFP dans des myotubes en culture, nous avons donc pu suivre son trafic en vidéomicroscopie. Pour ce faire, les cellules *TRDN* KO ont été différenciées jusqu'au stade de myotubes immatures (DIF3 = 3 jours de différenciation) ou matures (DIF9 = 9 jours de différenciation). L'organisation spécifique des protéines du CRC dans des cellules musculaires en différenciation a déjà été décrite (Cusimano et al., 2009; Flucher et al., 1993; Takekura et al., 2001) et comme présenté dans ces études nous avons retrouvé cette organisation précise dans nos cellules en culture. T95-GFP était, effectivement, présente sous la forme de clusters éparpillés dans toute la cellule à DIF3 et organisés en doubles rangées de

points à DIF9. A DIF3, certains clusters de T95 étaient mobiles alors qu'à DIF9, aucun mouvement n'a été observé (Figure R1). De plus, à DIF3 nous avons aussi pu remarquer que différents types de clusters étaient présents : des gros clusters se déplaçant sur des distances relativement courtes et des petits clusters, mobiles sur de plus longues distances.

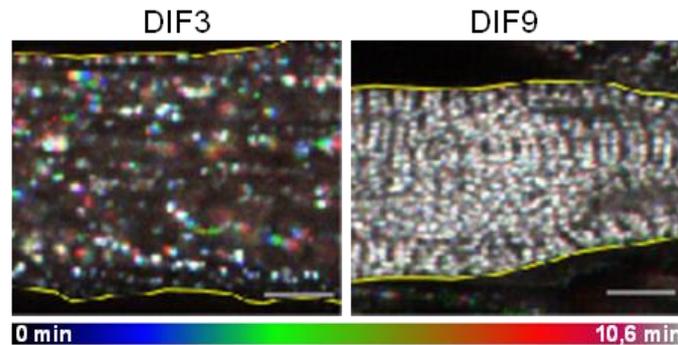


Figure R1 : Dynamique de T95 au cours de la différenciation musculaire. Projections codées couleur de film de 10,6 min représentant des myotubes *TRDN* KO à DIF3 (gauche) ou DIF9 (droite) exprimant T95-GFP. Seulement des mouvements des clusters T95-GFP sont observés à DIF3. A DIF9 aucun mouvement n'est présent et T95-GFP a atteint sa localisation finale à la triade (doubles rangées de points). Suivant l'échelle de couleurs, les 1ères images sont en bleues, les dernières en rouge et les clusters immobiles en blancs.

Pour passer d'un stade cellulaire immature avec des clusters éparpillés à un stade mature dans lequel les clusters de triadine ont atteint leur organisation finale, la triadine doit se déplacer. Notre problématique a donc été de comprendre ce que représente les clusters de triadine (de la triadine agrégée ? un groupe de protéines du CRC ? du transport vésiculaire ? une citerne terminale du RS ? etc) et comment se déplacent-ils pour atteindre leur localisation finale. Pour cela, je me suis concentrée sur l'étude des myotubes immatures avec comme première idée la caractérisation des clusters de T95-GFP. Deux paramètres ont alors été quantifiés : la vitesse des clusters et leur fraction mobile. Le premier paramètre consiste à l'enregistrement des mouvements de chaque cluster sur toute la durée du film afin d'en tirer leur vitesse moyenne de déplacement en $\mu\text{m/s}$. Quant à la fraction mobile des clusters elle correspond au pourcentage de clusters mobiles. Pour la calculer, un ROI de 30 μm de côté a été choisi et placé aléatoirement sur le myotube puis le nombre de clusters mobiles comparé aux immobiles a été calculé au sein du ROI. Pour ces analyses, tous les clusters ont été analysés sans tenir compte de leur taille

afin d'avoir une vision d'ensemble du comportement des clusters de T95 au cours de la différenciation.

A DIF3 nous avons observé que les clusters se déplaçaient à une vitesse moyenne de $0,56 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ mais que la majorité des clusters étaient immobiles, seulement $5,40\% \pm 0,35\%$ étaient mobiles. A DIF3 le pourcentage de clusters mobiles est faible tandis qu'à DIF9 il est nul. Nous avons donc émis l'hypothèse que la quantité de clusters mobiles pouvait varier suivant l'état de différenciation des myotubes. Pour essayer de confirmer cette hypothèse une cinétique a été réalisée afin de suivre l'évolution de la fraction mobile des clusters de T95-GFP au cours de la différenciation (Figure R2).

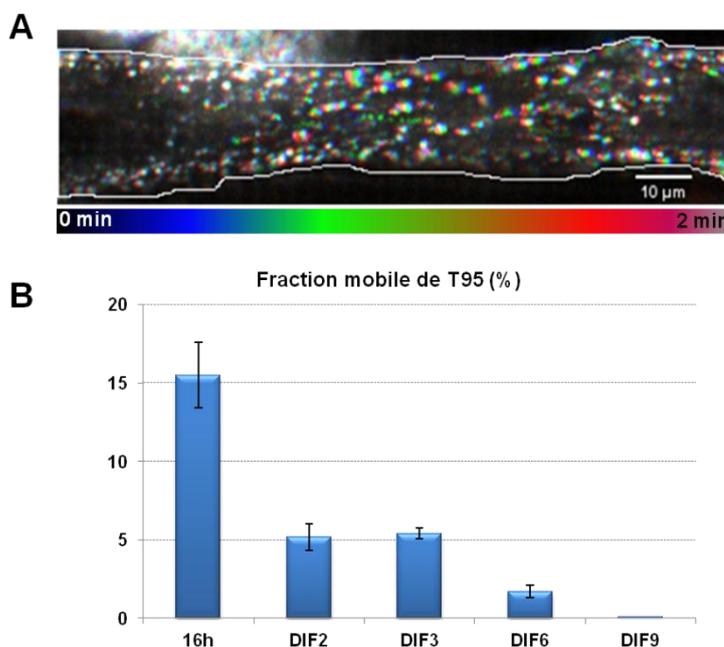


Figure R2 : Fraction mobile de T95 au cours de la différenciation. (A) Projection codée couleurs de film de 2 min représentant des myotubes *TRDN* KO à 16h exprimant T95-GFP. 1 image/s. Les 1ères images sont en bleues, les dernières en rouge et les clusters immobiles en blancs. **(B)** Quantification du pourcentage de clusters de T95-GFP mobile dans des myotubes observés à différentes étapes de différenciation : de 16h à 9 jours de différenciation. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM.

Ces résultats permettent de se rendre compte qu'à 16h de différenciation (16h), en moyenne, $15,5\% \pm 2,10\%$ des clusters de T95 sont mobiles puis leur nombre ne fait que chuter au fur et à mesure de la différenciation pour atteindre une valeur nulle à DIF9 quand la triadine a atteint son organisation finale.

La mobilité des clusters de T95 est donc bien un phénomène évoluant avec la différenciation musculaire. Pour poursuivre notre étude, j'ai donc réalisé les expériences suivantes à 16h de différenciation, moment où les mouvements des clusters de T95 sont les plus importants.

2) Caractérisation des clusters de triadine

16h de différenciation représente un temps très court dans la différenciation des myotubes par rapport à DIF3 ou DIF9. A ce stade précoce de différenciation, nous sommes demandés quelle était l'organisation de T95 par rapport à d'autres protéines du CRC ou partenaires de la triade mais également par rapport à la mise des myofibrilles et du cytosquelette. Des marquages immunofluorescents ont donc été réalisés afin de visualiser différentes protéines et comprendre si les clusters de T95 étaient associés à ces protéines.

a) Dès 16h, les clusters de T95 colocalisent avec des protéines de la triade

Dans un premier temps, des immunomarquages ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre RyR1 et DHPR afin d'observer comment les clusters de T95 se localisaient à 16h vis-à-vis des deux canaux calciques du CRC. Nous avons déjà montré qu'à DIF3 les clusters de T95 colocalisaient avec ceux de RyR1 et DHPR puis qu'ils restaient bien colocalisés une fois organisés en doubles rangées de points à DIF9. A 16h, les immunomarquages permettent de se rendre compte que dès ce stade précoce de différenciation, une colocalisation partielle des clusters de T95, RyR1 et DHPR existe. En effet, lors de la quantification nous avons remarqué qu'à 16h, au moins 64% des clusters de T95 colocalisaient avec ceux de RyR1 et DHPR, comparé à DIF9 (fixé à 100%) et que ce pourcentage de colocalisation ne faisait que croître au cours de la différenciation (Figure R3).

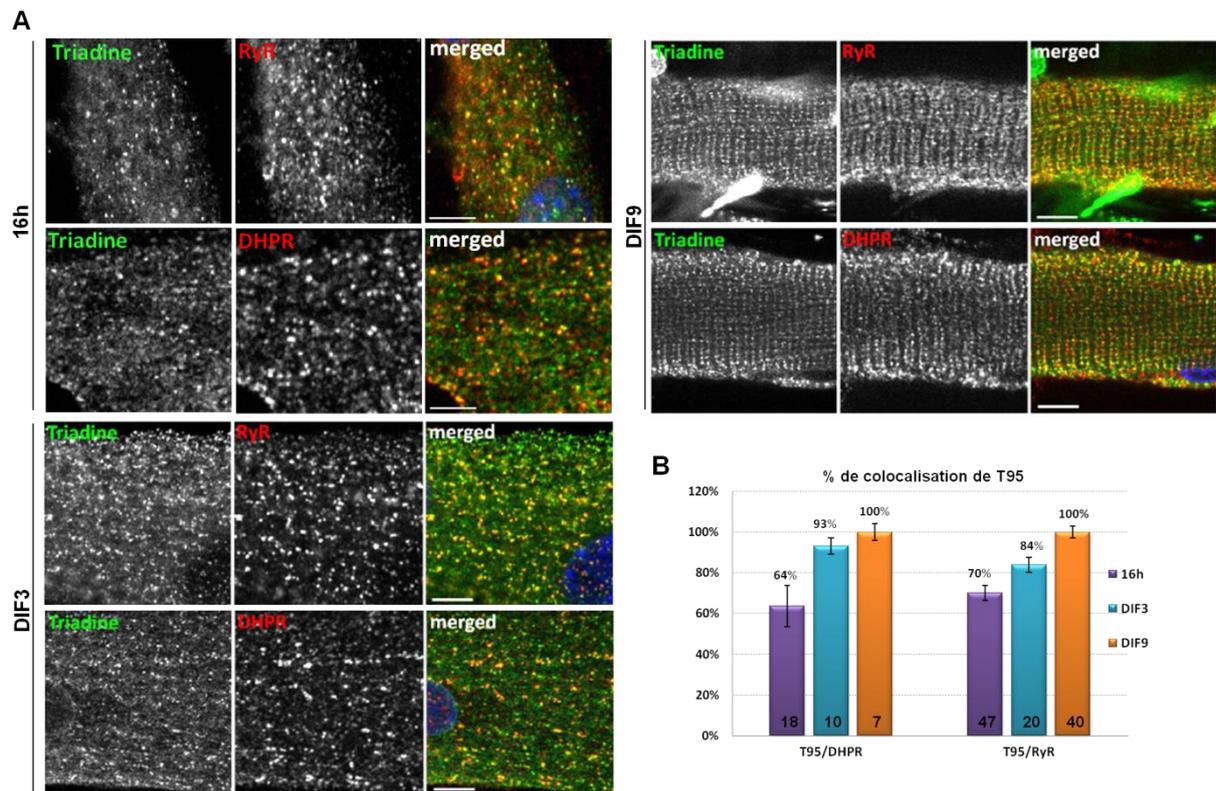


Figure R3 : Colocalisation des clusters de triadine (T95) au cours de la différenciation. (A) Images d'immunomarquages de myotubes *TRDN* KO différenciés jusqu'à 16h, 3 (DIF3) ou 9 (DIF9) jours de différenciation et transduits avec T95-GFP. Les marquages de T95 (anti-GFP, vert) et RyR1 ou DHPR (rouge) sont observés. Les noyaux des cellules ont été colorés au Hoechst (bleu). Dès 16h les clusters de T95 colocalisent avec ceux de RyR1 et du DHPR avant de s'organiser en doubles rangées de points à DIF9. Barres d'échelle = 5 μ m. **(B)** Graphique représentant le pourcentage de colocalisation de T95 par rapport à RyR1 ou au DHPR à 16h (violet), DIF3 (bleu) ou DIF9 (orange), et normalisé par rapport à DIF9. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. Les chiffres noirs en bas du graphique indiquent le nombre de cellules analysées.

Pour être sûr que la colocalisation observée à 16h sur des cellules *TRDN* KO était bien réelle et non pas due à une expression anticipée de T95 à cause de l'utilisation de lentivirus, j'ai observé la triadine endogène dans des cellules WT et comparé sa localisation à celles de RyR1 et DHPR. Comme observé sur la Figure R4, les clusters de T95 colocalisent partiellement avec ceux de RyR1 et DHPR dans des cellules WT à 16h de différenciation et présentent un marquage identique à celui des cellules *TRDN* KO ré-exprimant T95-GFP. Ce résultat permet de valider nos observations sur le suivi de T95-GFP dans des cellules *TRDN* KO.

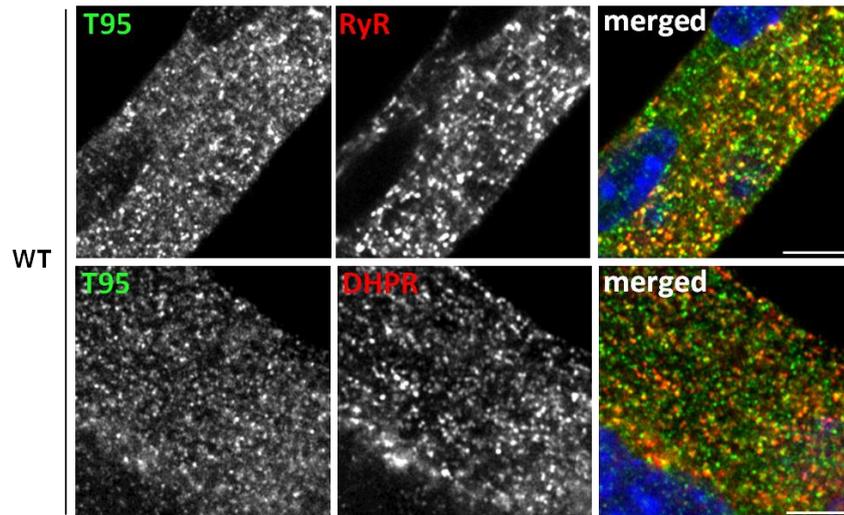


Figure R4 : Colocalisation des clusters de T95 endogène dans des cellules WT. Images d'immunomarquages de myotubes WT différenciés jusqu'à 16h de différenciation. Les marquages de T95 (vert) et RyR1 ou DHPR (rouge) sont observés. Les noyaux des cellules ont été colorés au Hoechst (bleu). Dès 16h les clusters de T95 endogène colocalisent avec ceux de RyR1 et du DHPR. Barres d'échelle = 5 μ m.

Dans un deuxième temps d'autres marquages fluorescents ont été réalisés avec des anticorps dirigés contre SERCA dans le but de voir l'état de différenciation du RS et contre la calséquestrine et Climp63 afin d'observer l'organisation de deux protéines interagissant avec T95 (Guo and Campbell, 1995; Kobayashi et al., 2000; Osseni et al., 2016), autre que RyR1.

Les immunomarquages de SERCA montrent un marquage réticulaire diffus et fenestré comme attendu au début de la différenciation musculaire, et qui ne colocalise pas avec les clusters de T95 (Figure R5). Concernant les immunomarquages réalisés avec la calséquestrine et Climp63, nous pouvons remarquer que dès 16h, les clusters de T95 colocalisent déjà en partie avec les clusters de Climp63 et de la calséquestrine (Figure R5).

Ces colocalisations suggèrent que dès un stade précoce de différenciation, les clusters de T95 sont déjà en partie associés avec les partenaires de triadine. Les clusters de triadine représenteraient donc des groupes de protéines de la triade déjà assemblés.

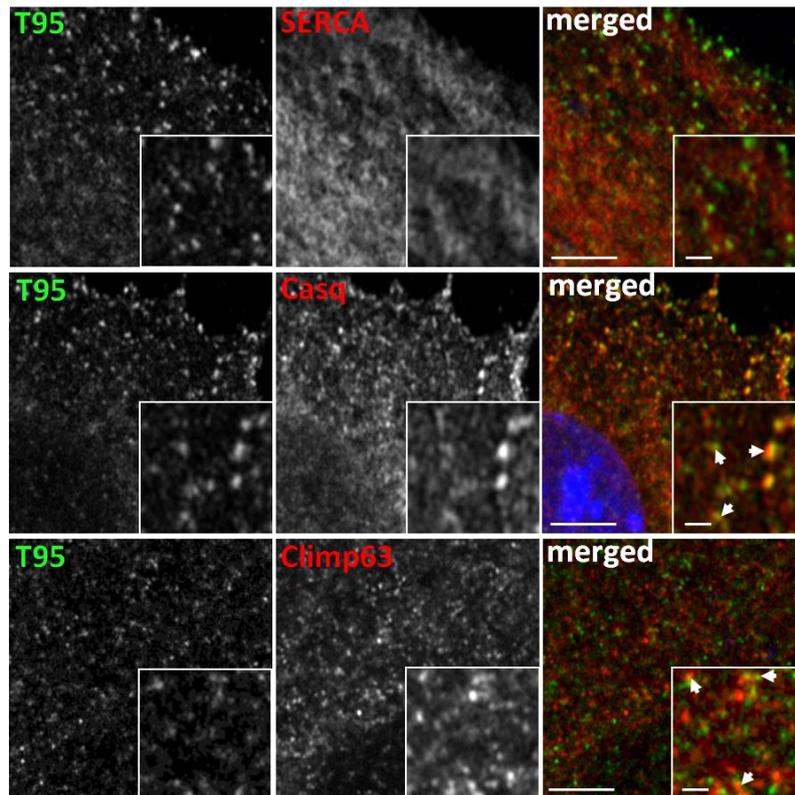


Figure R5 : A 16h de différenciation, les clusters de T95 colocalisent avec des partenaires triadiques. Immunomarquages de T95 (anti-GFP, vert), de SERCA, de la calséquestrine (Casq), ou de Climp63 (rouge) dans des cellules *TRDN* KO transduites avec T95-GFP. Les clusters de T95 colocalisent déjà partiellement avec ses partenaires comme la calséquestrine ou Climp63. SERCA permet de visualiser l'état de différenciation du RS longitudinal. Les noyaux ont été colorés au Hoechst (bleu). Barre d'échelle = 5 μ m et 2 μ m pour les zooms. Les flèches indiquent des exemples de clusters qui colocalisent.

b) A 16h les sarcomères et le cytosquelette ne sont pas organisés

Comme mentionné précédemment, à un temps de différenciation aussi précoce que 16h, nous nous questionnons sur l'état de différenciation des myotubes et d'organisation de T95 dans ces cellules.

Des immunomarquages ont donc été réalisés avec des anticorps dirigés contre l'actine pour marquer les sarcomères, l' α -actinine pour marquer la ligne Z et la tubuline pour marquer les microtubules et voir comment se localise les clusters de T95 vis-à-vis du cytosquelette de microtubules. Cependant, sans que nous puissions en déterminer la cause, les microtubules dans les cultures primaires de myoblastes sont difficilement observables.

Les différents marquages fluorescents réalisés montrent qu'à 16h, les sarcomères tout comme le cytosquelette de microtubules sont organisés longitudinalement dans la cellule, comme attendu au début de la différenciation musculaire (Figure R6).

A ce stade les cellules en culture sont donc dans un état immature de différenciation. Nous ne pouvons rien conclure de ces immunomarquages concernant la localisation des clusters de T95 étant donné que les marquages d' α -actinine, d'actine et de tubuline sont trop denses au sein des cellules.

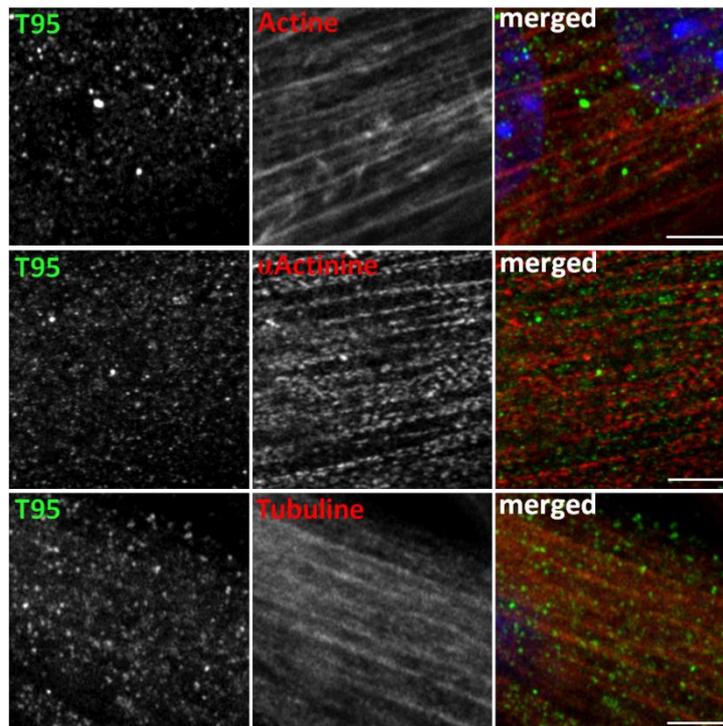


Figure R6 : A 16h de différenciation, les sarcomères et le cytosquelette ne sont pas organisés. Visualisation de cellules *TRDN* KO à 16h de différenciation transduites avec T95-GFP et immunomarqués pour T95 (anti-GFP, vert), l' α -actinine (ligne Z), la palloïdine (actine des sarcomères) ou la tubuline (microtubules) (rouge). Les noyaux (bleu) ont été colorés au Hoechst. Barre d'échelle = 5 μ m.

c) A 16h, les clusters de T95 pourraient représenter un transport vésiculaire

Il a été observé que les clusters de T95 étaient mobiles au début de la différenciation. L'hypothèse était donc que ces clusters seraient des vésicules empruntant la voie de biosynthèse.

Pour tester notre hypothèse la localisation de T95 a été étudiée par rapport à celle de COPII. En effet, les protéines COPII marquent la voie de biosynthèse puisqu'elles recouvrent les vésicules sortant du réticulum. Ces immunomarquages ont montré qu'à 16h de différenciation, les clusters de T95 colocalisent à hauteur de 24% avec ceux de COPII (Figure R7), suggérant que les clusters de T95 pourraient être des vésicules de la voie de biosynthèse.

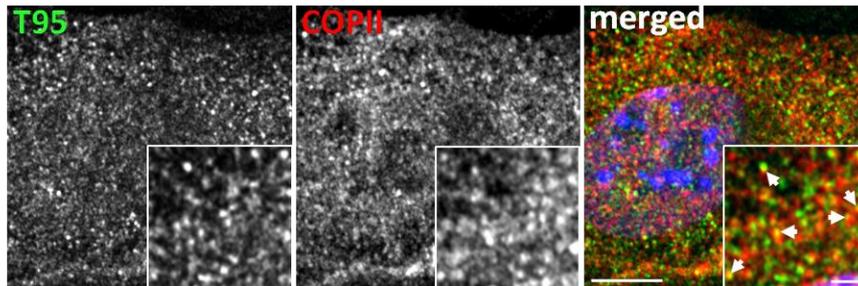


Figure R7 : Les clusters de triadine colocalisent avec ceux des COPII. Immunofluorescences de T95 (anti-GFP, vert) avec COPII (rouge), sur des cellules *TRDN* KO à 16h de différenciation et transduites avec T95-GFP. Les flèches blanches indiquent des exemples de clusters qui colocalisent. Barre d'échelle = 5 μ m et 2 μ m pour les zooms.

Tous ces résultats réunis permettent de dire que dès le début de la différenciation, les myotubes s'organisent petit à petit et la triadine commence à se clusteriser. Ces clusters sont en partie mobiles et lors de marquages fluorescents certains colocalisent avec des partenaires du CRC comme RyR1 et DHPR mais également avec un marqueur de la voie de biosynthèse (COPII). Les clusters de T95 pourraient représenter un transport vésiculaire et/ou des bouts de réticulum (associés ou non avec les tubules-t), contenant déjà les protéines de la triade et se déplaçant pour atteindre leur localisation définitive.

d) Les clusters de triadine sont-ils associés aux tubules-t ?

Je me suis donc intéressée à la question de l'association des clusters de T95 avec les tubules-t. Effectivement, les clusters de triadine pourraient représenter un assemblage précoce des différentes protéines du CRC. Or comme le DHPR est dans la membrane du tubule-t contrairement à la triadine ou à RyR1, les clusters de T95 pourraient représenter soit le compartiment triadique entier (réticulum associé aux

tubules-t) soit un morceau de réticulum seul contenant toutes les protéines du CRC et ce n'est qu'au cours de la différenciation que le DHPR atteindrait d'une façon ou d'une autre le tubule-t.

Le but de l'expérience a donc été de regarder si les mouvements des clusters de T95 se faisaient le long des tubules-t. C'est pourquoi nous avons utilisé du di-8-ANEPS afin de marquer les tubules-t dans les myotubes en culture. Tout d'abord ces expériences ont été réalisées à DIF3 et le di-8-ANEPS a été ajouté 45 min avant l'observation sur cellules vivantes. A DIF3, les tubules-t marqués par le di-8-ANEPS sont principalement longitudinaux, certains s'invaginent à partir de la membrane plasmique également marquée, et d'autres sont présents au centre de la cellule (Figure R8). Les clusters de T95-GFP sont en partie observés le long des marquages di-8-ANEPS et un cluster de T95-GFP a été vu se déplaçant en même temps qu'un tubule-t comme s'ils étaient tirés ensemble (Figure R8).

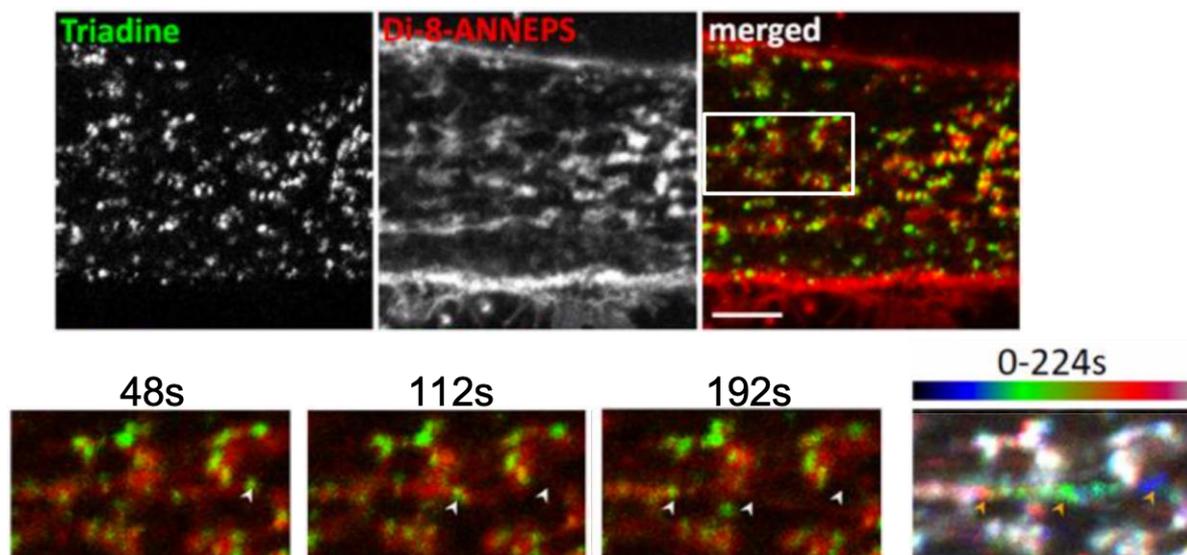


Figure R8 : La triadine est associée aux tubules-t. Images de T95-GFP (vert) transduites sur des cellules *TRDN* KO à 3 jours de différenciation. La membrane plasmique et donc les tubules-t ont été marqués par le Di-8-ANEPS (rouge, 45 min à 10 μ M) avant observation des cellules vivantes (images du haut). Barre d'échelle = 5 μ m. Les images du bas montrent une cinétique de la superposition de T95 et Di-8-ANEPS. Les têtes de flèches indiquent la localisation d'un même cluster de T95 au cours du temps. A droite est illustré le même mouvement du cluster en projection codée couleur selon l'échelle affichée (0-224s).

Cela suggère que les clusters de triadine pourraient correspondre à des morceaux de réticulum contenant entre autre la triadine et associés avec des tubules-t. Cette

pré-triade bougerait afin de se positionner à son emplacement définitif, au niveau de l'interface des bandes A-I.

Ce résultat a été obtenu à DIF3 quand les tubules-t sont bien visibles et que les clusters de triadine sont plus nombreux mais que seulement 5,4% d'entre eux sont mobiles. Qu'en est-il donc à 16h de différenciation, au tout début de la formation des myotubes et de la mise en place des protéines et structures ?

Nous avons donc voulu réitérer cette expérience à 16h, néanmoins dans le but de mieux caractériser les mouvements des clusters de triadine dans les cellules vivantes, nous sommes passé sur un Spinning Disk confocal (Zeiss) permettant d'avoir une meilleure résolution temporelle et donc de suivre les clusters de triadine à chaque seconde de l'enregistrement. Le di-8-ANEPS ne peut pas être utilisé au Spinning Disk c'est pourquoi nous avons essayé de trouver un autre marqueur des tubules-t.

En premier lieu nous avons testé le WGA (Wheat Germ Agglutinin) un marqueur de la membrane plasmique. Les films obtenus sur cellules vivantes à 16h exprimant T95-GFP et mises en contact du WGA pendant 10min, montrent principalement des vésicules à l'intérieur du myotube, probablement des vésicules d'endocytose. Mais aucune invagination de la membrane plasmique, ou tubules-t, au cœur de la cellule n'a été vue (Figure R9A). Le WGA ne permet donc pas de marquer les tubules-t.

J'ai alors produit des lentivirus codant pour une protéine fluorescente (mCherry) taguée par la séquence CAAX qui permet l'adressage de mCherry à la membrane plasmique par l'insertion de CAAX dans le feuillet interne de la membrane (Yan et al 2016). Après co-transduction de T95-GFP et de CAAX-mCherry, des vésicules sont visibles pour CAAX-mCherry au sein du myotube mais aucun marquage de tubules-t n'est observable (Figure R9B).

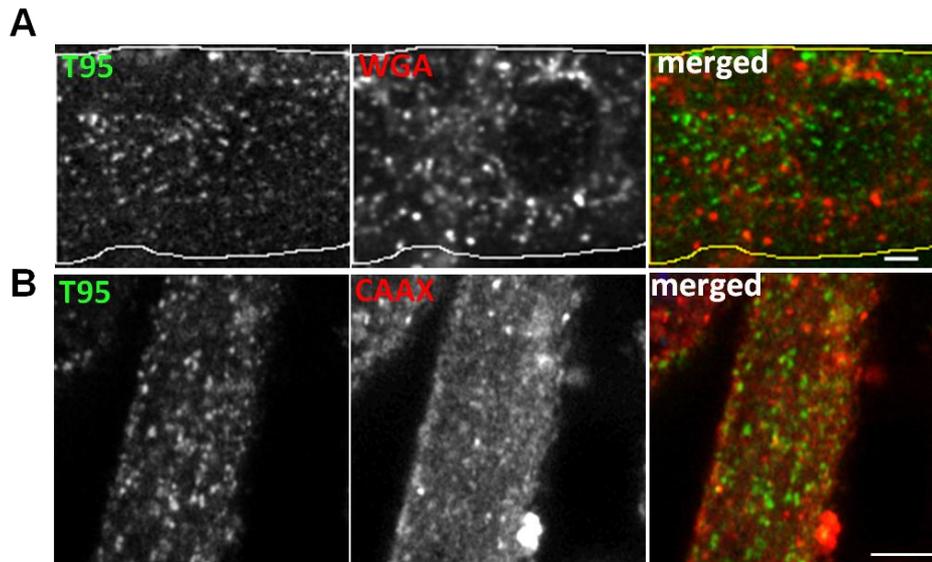


Figure R9 : Les potentiels marqueurs des tubules-t. Images de T95-GFP (vert) transduites sur des cellules *TRDN* KO à 16h de différenciation. **(A)** Le WGA (10min à 5 μ g/ml) marque la membrane plasmique et surtout des vésicules à l'intérieur de la cellule et qui sont différentes des clusters de T95. **(B)** Les cellules ont été co-transduites avec CAAX-mCherry et immunomarquées avec anti-GFP (vert) et anti-RFP (rouge) toujours dans le but de marquer la membrane plasmique voire les tubules-t. Là encore seulement des vésicules, probablement des vésicules d'endocytose, sont visibles. Barre d'échelle = 5 μ m.

Ces difficultés nous ont conduit à remettre en question la présence des tubules-t à 16h de différenciation. En effet, il a été montré chez la souris que dès le stade embryonnaire E15, les tubules-t étaient présents, qu'ils étaient d'abord majoritairement longitudinaux avant d'acquiescer petit à petit une orientation transversale, maturation qui se finira en post-natal (Flucher et al., 1993; Franzini-Armstrong, 1991; Takekura et al., 2001). Les myotubes en culture à 16h sont peut-être à un stade trop précoce de différenciation pour comporter des tubules-t visibles.

Pour valider la présence ou non de tubules-t dans nos cellules, lors d'un troisième essai, nous avons testé une sonde fluorescente MemBright qui marque les membranes (Collot et al., 2019). Nous l'avons testé à 16h mais également à DIF3, stade où nous savons grâce au di-8-ANEPS que les tubules-t sont présents.

Néanmoins, que ce soit à l'un ou l'autre stade de différenciation, un marquage principalement de la membrane plasmique ainsi que quelques vésicules d'endocytose sont observées, mais pas de tubules-t (Figure R10).

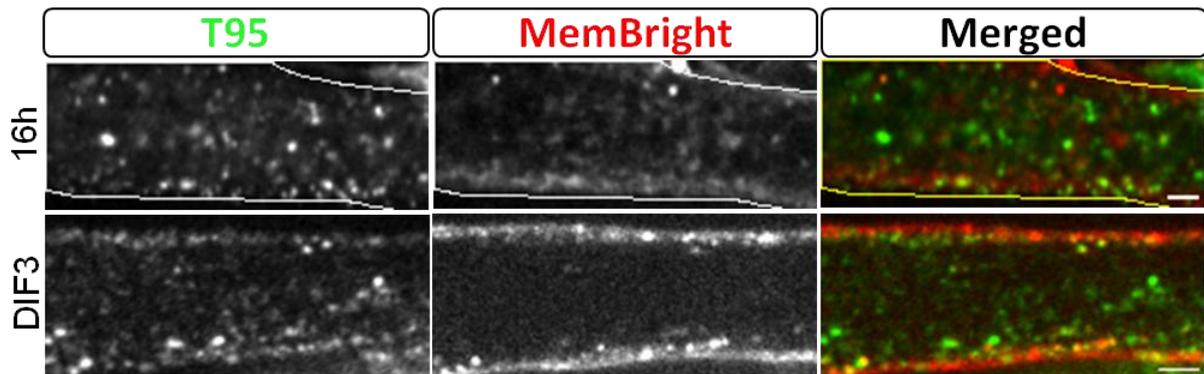


Figure R10 : La sonde MemBright ne marque pas les tubules-t. Images de T95-GFP (vert) transduites sur des cellules *TRDN* KO. Une sonde fluorescente MemBright (20nM) a été testée à 16h (haut) ou à DIF3 (bas) mais elle ne colore pas les tubules-t, seulement la membrane plasmique et quelques vésicules d'endocytose. Barre d'échelle = 5 μ m.

Au cours ma thèse nous n'avons pas pu trouver de marqueurs des tubules-t pouvant être utilisés au Spinning Disk. Nous n'avons donc pas pu observer si à 16h de différenciation les tubules-t sont déjà présents et si les clusters de T95-GFP se déplacent avec eux comme à DIF3. Aucune conclusion n'a donc pu être tirée de ces expériences qui visaient à comprendre si les clusters de T95 représentaient le compartiment triadique entier ou non. Une expérience alternative pouvant être tentée serait d'utiliser le di-8-ANEPS à 16h de différenciation mais d'observer les cellules vivantes sur le LSM710 comme ce qui a été fait à DIF3. Sachant que le di-8-ANEPS fonctionne à DIF3 cette expérience permettrait de vérifier la présence ou non des tubules-t à 16h de différenciation et d'observer le comportement des clusters de T95. Néanmoins la résolution temporelle de ce microscope étant moindre et les clusters de T95 étant bien mobiles à 16h, il se peut que les mouvements les plus rapides de T95 ne soient pas perçus.

De plus, il est possible que les clusters de T95 ne rentrent en contact des tubules-t que plus tardivement au cours de la différenciation, une fois que les tubules-t sont plus nombreux au cœur de la cellule. Dans cette l'hypothèse, à 16h de différenciation les clusters de T95-GFP pourraient (1) être des morceaux de réticulum seuls, contenant la triadine et d'autres protéines du CRC, se déplaçant jusqu'à entrer en contact de tubule-t plus tardivement puis de se positionner à l'interface des bandes A-I et/ou (2) représenter un trafic vésiculaire des protéines du CRC se déplaçant jusqu'à atteindre la citerne terminale du RS.

e) Comparaison du trafic de la triadine avec le trafic de RyR1 et du DHPR

N'ayant pas trouvé de marqueur des tubules-t pour remplacer di-8-ANEPS, nous avons décidé d'utiliser sur cellules vivantes d'autres marqueurs du CRC. Nous nous sommes concentrés sur RyR1 et DHPR car le premier est localisé dans la même membrane que la triadine, membranes du RS jonctionnel, et le deuxième est localisé dans la membrane du tubule-t. En effet, comparer le trafic de ces protéines majeures du CRC à celui de la triadine, devrait nous montrer si les clusters mobiles de T95 se déplacent avec ceux de RyR1 et/ou du DHPR et donc si les clusters de T95 représentent bien un groupe de protéines du CRC déjà associées.

Néanmoins les séquences codantes de ces canaux calciques sont trop grandes pour pouvoir être intégrées dans des lentivirus. C'est pourquoi nous avons tout d'abord utilisé les 6 domaines transmembranaires de RyR1 (RyR 6TM), construction réalisée par Marine Cacheux lors de sa thèse. Ces domaines transmembranaires notamment le 1 et le 6 ont été montrés comme nécessaire pour la bonne localisation de RyR1 dans le réticulum (Meur et al., 2007).

La construction RyR6TM-GFP a donc été transduite dans des cellules *TRDN* KO. Néanmoins aucun cluster n'a été observé dans les cellules vivantes. Le marquage du RyR6TM-GFP correspondait plutôt à un marquage réticulaire diffus et lors d'immunomarquages, le marquage de RyR1 endogène était bien différent de celui de la construction (Figure R11).

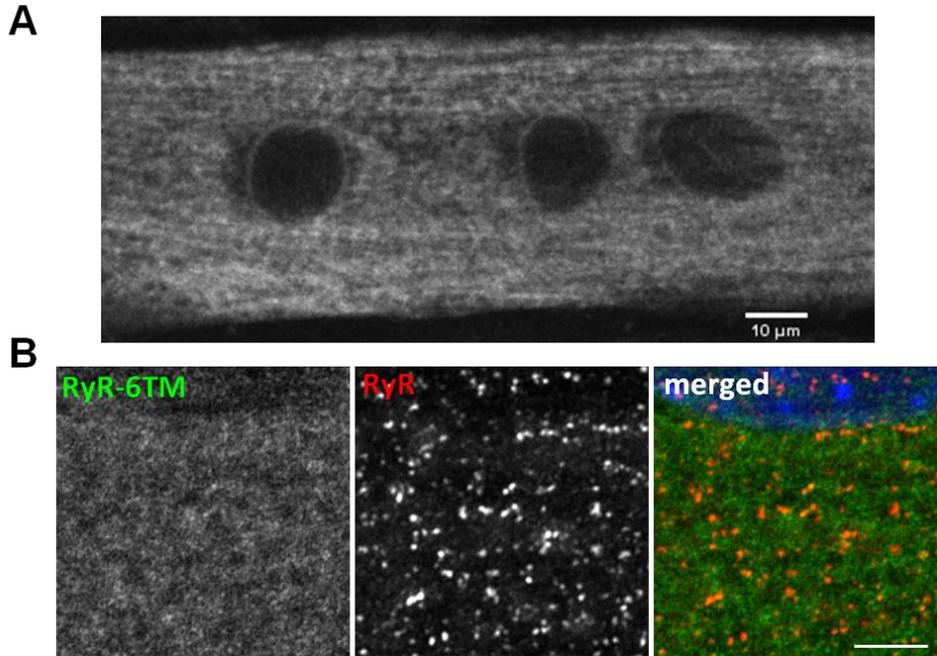


Figure R11 : Les 6 domaines transmembranaires de RyR1 ne se localisent pas à la triade. **(A)** RyR6TM-GFP transduit dans des cellules *TRDN* KO et observation des cellules vivantes au spinning disk. Barre d'échelle = 10 µm. **(B)** Marquage immunofluorescent de RyR6TM (anti-GFP, vert) et de RyR1 endogène (rouge), sur des cellules *TRDN* KO transduites avec RyR6TM-GFP. Les noyaux (bleu) ont été colorés au Hoechst. Barre d'échelle = 5 µm.

Donc soit les 6 domaines transmembranaires de RyR1 ne permettent pas la localisation à la triade soit la présence de RyR1 endogène dans les cellules, empêchent le RyR6TM de se localiser correctement à la triade. Dans tous les cas, cette construction ne peut être utilisée pour suivre le trafic de RyR1.

Ensuite, nous nous sommes servis de la sous-unité $\alpha 1s$ du DHPR couplée à une turboGFP (DHPR $\alpha 1s$ -tGFP). Cette sous-unité est à la fois le pore et le senseur du canal et permet l'interaction avec RyR1 (Rios and Brum, 1987; Serysheva et al., 2002; Tanabe et al., 1988).

Une fois co-transduite avec T95-tdTomato dans des cellules *TRDN* KO, il a été observé (1) que la majorité des cellules mourraient avant même de commencer à se différencier, (2) les cellules qui résistaient avaient du mal à se différencier et elle restait à l'état de petits et fins myotubes quel que soit le stade de différenciation, et (3) à 16h de différenciation DHPR $\alpha 1s$ -tGFP présentait un marquage diffus dans toute la cellule avec parfois quelques clusters observables.

De par la taille de la sous-unité $\alpha 1s$ du DHPR, le titre viral est faible se traduisant par une quantité plus importante de virus déposée sur les cellules. Il se peut donc que les problèmes cellulaires observés soient dus à cette quantité de virus déposée ou à l'expression d'un canal calcique membranaire que les cellules ne supporteraient pas à ce stade de différenciation. Pour tenter de palier ce problème nous avons décidé d'utiliser moitié moins de virus soit MOI 2,5 au lieu de MOI 5. Et nous avons observé les cellules à 16h et à DIF3. Avec moins de virus déposée, moins de cellules mourraient ce qui nous a permis d'avoir un groupe de cellules un peu plus importants qui se différenciait. Cependant les myotubes restaient toujours petits et fins.

En premier lieu nous avons commencé par réaliser des immunomarquages sur les cellules à 16h et à DIF3. Ces marquages ont montré que DHPR $\alpha 1s$ présente un marquage diffus au départ puis forme progressivement des clusters au cours de la différenciation et ces clusters colocalisent bien avec ceux de T95 (Figure R12). Nous n'avons pas pu tester la localisation de DHPR $\alpha 1s$ -tGFP par rapport au DHPR endogène à cause des espèces d'anticorps non compatibles.

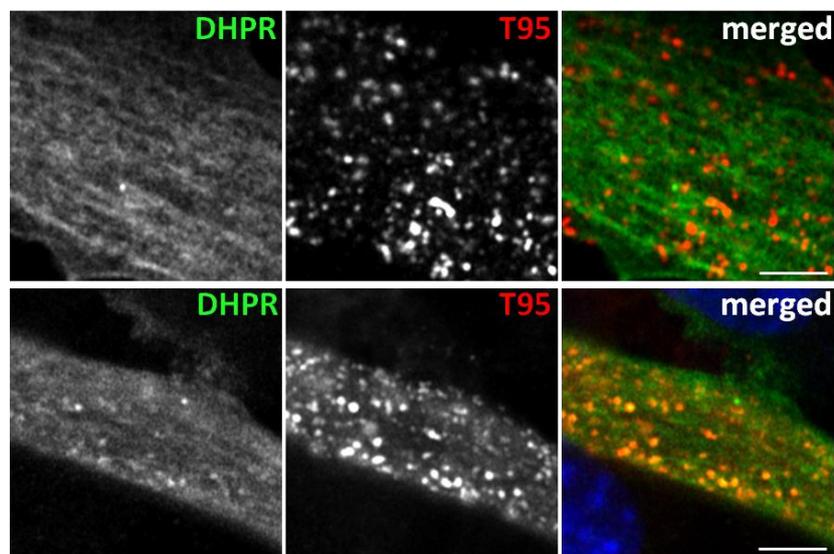


Figure R12 : Le DHPR forme des clusters au cours de la différenciation qui colocalise avec la triadine. Marquages immunofluorescents de DHPR $\alpha 1s$ -turboGFP (anti-turboGFP, vert) et T95-tdTomato (anti-RFP, rouge) sur des cellules *TRDN* KO transduites avec DHPR $\alpha 1s$ -turboGFP et T95-tdTomato et observées à 16h (panneaux du haut) ou 3 jours de différenciation (panneaux du bas). Les noyaux (bleu) ont été colorés au Hoechst. Barre d'échelle = 5 μ m.

Dans un deuxième temps nous avons également observé les cellules vivantes au microscope. De façon générale à 16h de différenciation, le marquage DHPR α 1s-tGFP est comme expliqué précédemment, diffus dans toute la cellule et quelques clusters peuvent également être vus suivant les cellules. En parallèle T95 commence à former des clusters et ces clusters semblent colocaliser avec ceux de DHPR α 1s quand il y en a. En amenant les cellules jusqu'à DIF3, nous avons pu voir que DHPR α 1s-tGFP formait de plus en plus de clusters qui colocalisaient avec ceux de T95 et se déplaçaient ensemble (Figure R13).

En essayant de laisser les cellules en culture jusqu'à un état mature (DIF9) afin de voir si l'organisation en doubles rangées de points était atteinte, il a été observé que les cellules qui avaient survécu jusque là présentaient un signal DHPR α 1s-tGFP très faible voire inexistant. Il semblerait que les cellules qui survivent sur le long terme n'aient pas été transduites avec DHPR α 1s-tGFP. Aucune conclusion n'a donc pu être tirée concernant l'adressage correct de DHPR α 1s-tGFP dans un myotube mature.

Ces expériences nous ont permis de conclure que les clusters de T95 contiendraient également du DHPR alors que ces deux protéines sont localisées dans deux membranes différentes une fois à la triade.

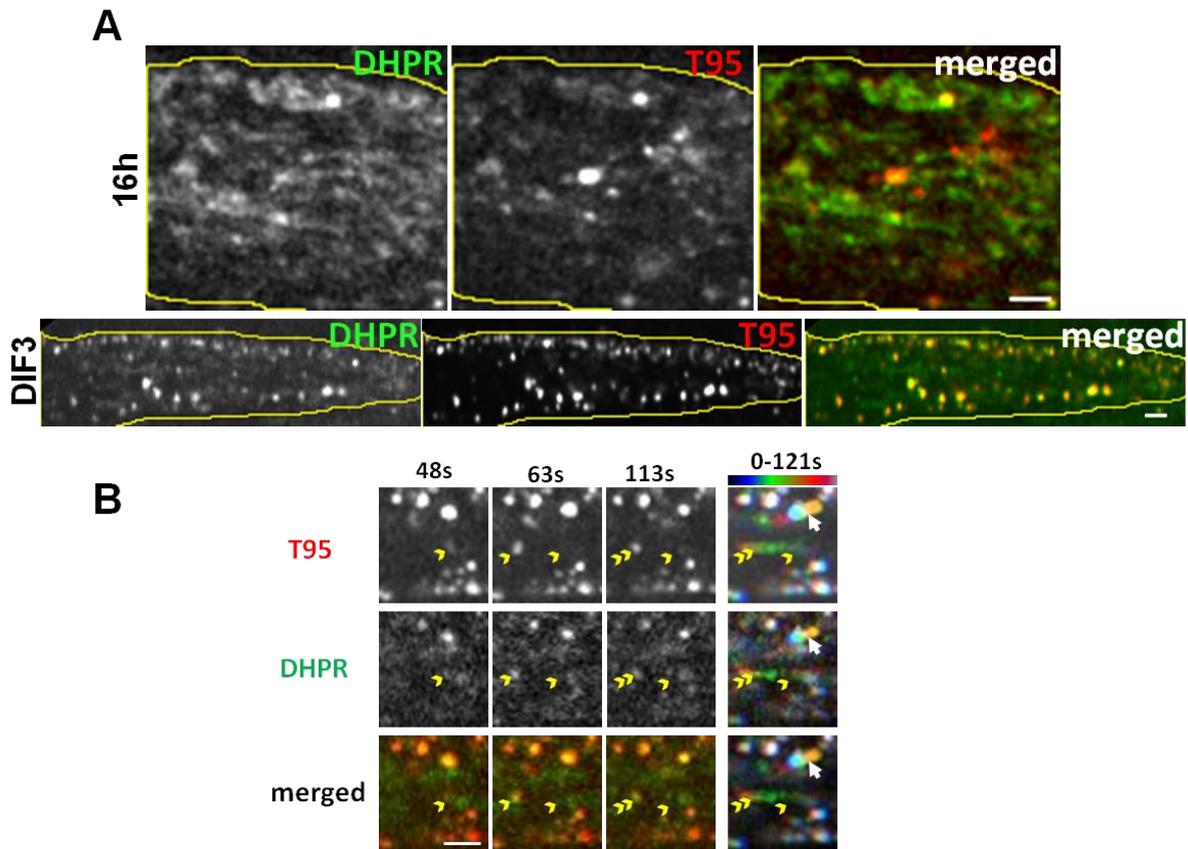


Figure R13 : Les clusters de triadine et le DHPR se déplacent ensemble. (A) Images de DHPR α 1s-turboGFP (vert) et T95-tdTomato (rouge) transduits sur des cellules *TRDN* KO à 16h ou 3 jours de différenciation. Barre d'échelle = 5 μ m. **(B)** Cinétique de T95 (rouge), DHPR α 1s (vert) et la superposition des deux (merged) à 16h de différenciation. Les têtes de flèches jaunes indiquent la localisation d'un même cluster au cours du temps. A droite est illustré le même mouvement du cluster en projection codée couleur selon l'échelle affichée (0-224s). La flèche blanche indique un autre cluster, plus gros, qui se déplace sur une plus courte distance. Barre d'échelle = 2 μ m.

En conclusion, nous avons vu que les clusters de T95 sont en partie mobiles dès le début de la différenciation et que ces clusters pourraient représenter un groupe de protéines du CRC se déplaçant ensemble pour atteindre la triade. Est-ce que ces clusters sont des vésicules en trafic ou des triades en pré-formation (réticulum accolé ou non à un tubule-t) ? La question reste ouverte. Tous ces résultats restent encore imprécis concernant la caractérisation des clusters de T95 et leurs mouvements, nous continuons donc nos expériences pour en apprendre davantage sur ce qu'ils représentent.

II. Implication du cytosquelette

Dans le but de comprendre ce que sont les clusters de triadine (vésicules ou triade en formation) et comment se déplacent-ils, nous avons voulu tester l'implication du cytosquelette. En effet que ces clusters soient des vésicules ou des pré-triades, leurs mouvements peuvent être dépendants du cytosquelette. Pour tester cela différentes drogues ont été utilisées.

1) Les filaments d'actine

Dans un premier temps, la Latrunculine A (LTA) a été utilisée. Cette drogue se lie aux monomères d'actine empêchant ainsi leur polymérisation. Nous avons donc voulu savoir si les filaments d'actine étaient impliqués dans le trafic de la triadine. La LTA avait déjà été utilisée sur des myotubes à DIF3 sans effet particulier. Cependant lors de son utilisation à 16h de différenciation (1h à 5 μ M), toutes les cellules sont mortes. Il a été montré qu'au cours de la myofibrillogenèse, les pré-myofibrilles étaient sensibles à la LTA au contraire des myofibrilles matures (Wang et al., 2005). A ce stade de différenciation, les myotubes commencent juste à se former, l'actine a donc l'air primordiale à ce moment là pour le maintien de la structure des cellules. Nous n'avons donc rien pu conclure sur l'impact de l'actine sur le trafic de la triadine.

2) Implication du cytosquelette de microtubules

a) Les clusters de triadine utilisent les microtubules pour se déplacer

Dans un deuxième temps, nous nous sommes concentrés sur le réseau de microtubules. Du nocodazole a été utilisé pendant 1h à une concentration de 10 μ M provoquant la dépolymérisation des microtubules. A cette concentration, la majorité des mouvements de triadine sont abolis se traduisant par une forte diminution de la

fraction mobile et de la vitesse des clusters de T95 (Figure R14). Les microtubules sont donc nécessaires pour le déplacement des clusters de T95.

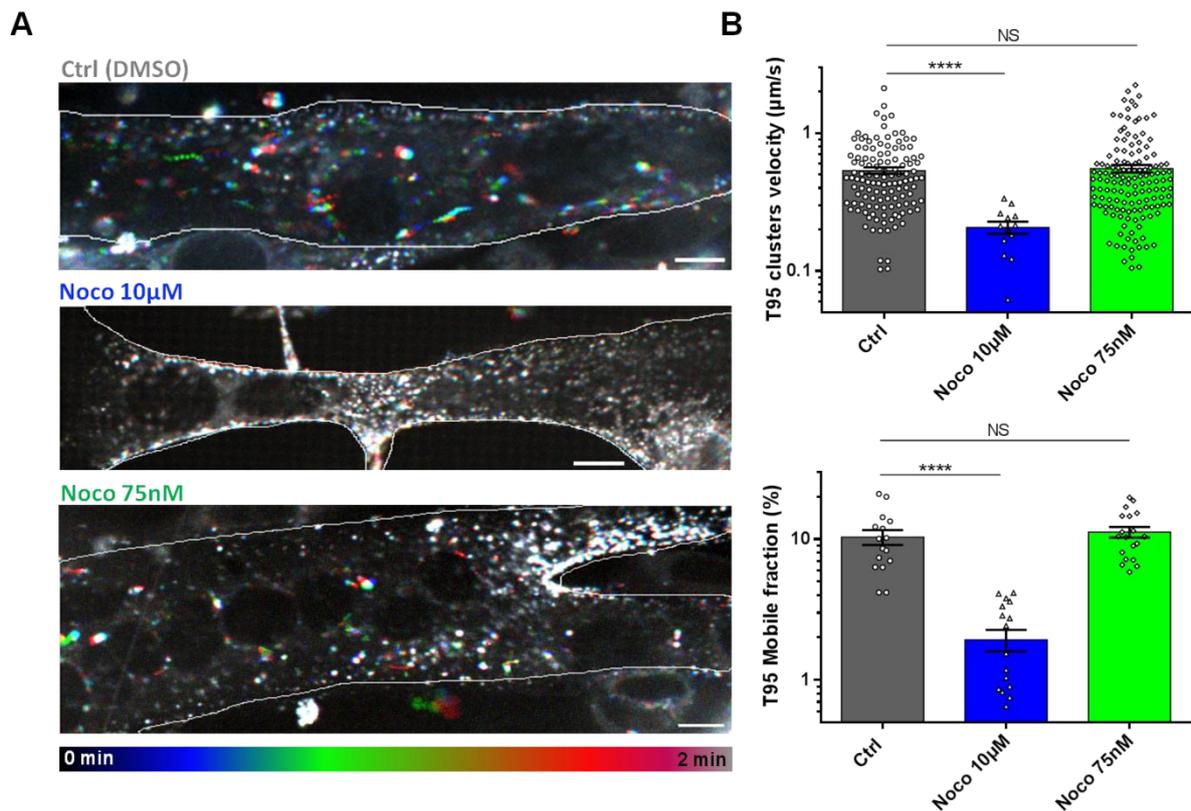


Figure R14 : La mobilité des clusters de triadine dépend des microtubules. (A) Projections codées couleurs de films de 2 min représentant des myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation exprimant T95-GFP et ayant été traités avec du nocodazole (Noco) 10µM ou 75nM pendant 1h, ou avec du DMSO (condition contrôle, Ctrl). 1 image/s. Les 1^{ères} images sont en bleues, les dernières en rouge et les clusters immobiles en blancs. Barre d'échelle = 10µm. **(B)** Quantification de la vitesse des clusters de T95 (en µm/s, panneau du haut) et de la fraction mobile (en %, panneau du bas) suivant le traitement reçu. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. n = 35-40 cellules analysées pour la vitesse et n = 16-19 cellules analysées pour la fraction mobile, 3 à 4 expériences indépendantes. One-way ANOVA, NS = Non significatif, ****p<0,0001.

b) Les clusters de triadine ne se lient pas aux bouts (+) des microtubules pour leurs déplacements

Les clusters mobiles de T95 qui utilisent le réseau de microtubules peuvent se servir des moteurs moléculaires (mécanisme de glissement) pour se déplacer et/ou se lier aux bouts (+) des microtubules et croître avec leur polymérisation, on parle alors de mécanisme de TAC (Tip Attachment Complex).

Pour définir quel(s) mécanisme(s) les clusters de T95 utilisent : moteurs moléculaires ou TAC, nous avons inhibé les TAC en utilisant du nocodazole à 75nM. A des concentrations nanomolaires, le nocodazole est connu pour stopper la dynamique des microtubules sans les dépolymériser (Waterman-Storer and Salmon, 1998) ce qui signifie que les mouvements de TAC sont abolis et donc seulement les mouvements dépendants des moteurs moléculaires seront encore observables.

Nous nous sommes servis du nocodazole 75nM pour quantifier la fraction mobile et la vitesse des clusters de T95, aucun changement par rapport à la condition contrôle n'a été observé (Figure R14). Ce qui signifie que la triadine n'utiliserait pas les évènements de TAC pour se déplacer sur le réseau de microtubules.

En parallèle et pour vérifier l'effet du nocodazole 75nM, la protéine de bouts (+) EB3-GFP a été co-transduite dans des myotubes avec T95-tdTomato. Comme attendu, sans drogue, EB3 présente un marquage en comètes représentant la croissance des bouts (+) des microtubules qui polymérisent, alors qu'avec du nocodazole à 75nM, ces comètes disparaissent. Avec ou sans drogue, T95 est toujours présente sous forme de clusters (Figure R15). Ce résultat valide l'effet du nocodazole à 75nM sur les myotubes en culture. Ainsi nous pouvons confirmer le résultat selon lequel les clusters de T95 ne se déplaceraient pas par liaison aux bouts (+) des microtubules.

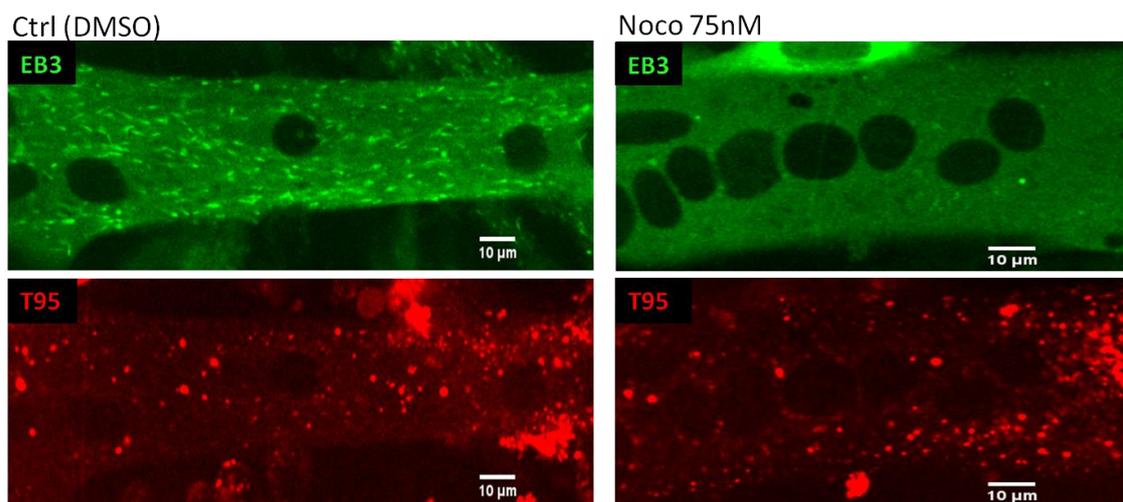


Figure R15 : Les évènements de TAC sont inhibés en présence de nocodazole 75nM. Myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation transduits avec T95-tdTomato (rouge) et EB3-GFP (vert), et traités 1h avec du nocodazole (Noco) à 75nM ou du DMSO (condition contrôle, Ctrl). Barre d'échelle = 10µm.

Pour confirmer nos résultats sur les mouvements des clusters de T95 le long des microtubules, nous avons réalisé des kymographes avec EB3 pour observer la dynamique des microtubules. Ces kymographes permettront de visualiser la trace d'un microtubule ainsi que la vitesse de polymérisation, et par des co-kymographes entre EB3 et T95 nous pourrions comparer leurs comportements.

Les kymographes illustrés sur la Figure R16 montrent (1) plusieurs traces d'EB3 témoignant de la polymérisation/dépolymérisation successive des microtubules. Ces traces sont de plus observées dans les deux sens (venant de la gauche et de la droite), signifiant qu'un faisceau de microtubules, avec des microtubules dans les deux orientations, est présent ; (2) pour T95 la trace verticale sur la droite de l'image illustre un cluster immobile de T95, la trace au centre de l'image illustre le mouvement d'un cluster de T95 qui était d'abord immobile (début du tracé vertical) puis s'est déplacé (trace horizontale) avant de s'arrêter à nouveau (trace verticale finale) ; (3) la trace observée pour T95 est également plus horizontale que les traces observées pour EB3, ce qui signifie que la mobilité du cluster de T95 était plus importante que la polymérisation des microtubules (Figure R16).

L'analyse de ce kymographe montre qu'à l'endroit où le kymographe a été réalisé, un faisceau de microtubules était présent et qu'un cluster de T95 s'est déplacé, probablement sur les microtubules. Il semble également y avoir une différence entre la vitesse de polymérisation des microtubules observée avec EB3 et la vitesse des clusters de T95, appuyant l'idée que la mobilité des clusters de T95 ne serait pas TAC-dépendante.

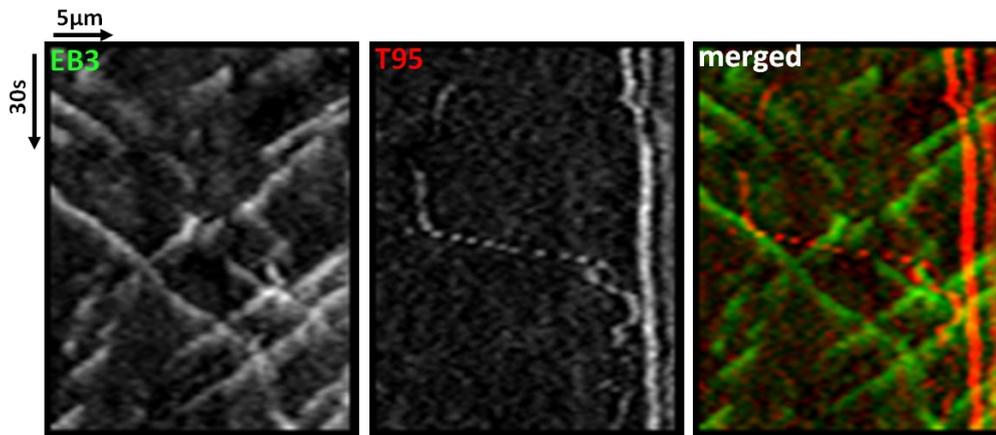


Figure R16 : Comparaison du mouvement des clusters de triadine par rapport aux mouvements d'EB3. Kymographes réalisés à partir d'un film de 2min représentant une cellule *TRDN* KO transduites avec EB3-GFP (vert) et T95-tdTomato (rouge) à 16h de différenciation. Plusieurs traces d'EB3 sont observées dans les deux sens illustrant la dynamique d'un faisceau de microtubules contenant des microtubules dans les deux orientations. Pour T95 la trace verticale sur la droite de l'image illustre un cluster immobile de T95, la trace au centre de l'image illustre le mouvement d'un cluster de T95 qui était immobile au début du film (trace verticale) puis s'est déplacé (trace horizontale) avant de s'arrêter à nouveau. L'image merged montrant la superposition des deux kymographes permet d'observer que la trace de T95 est plus horizontale que les traces d'EB3, signifiant que le cluster mobile de T95 s'est déplacé plus rapidement que la dynamique des microtubules. Echelles : barre verticale (temps) = 30s, barre horizontale (distance) = 5μm.

c) Les mouvements des clusters de triadine sont dépendant des moteurs moléculaires

Pour vérifier l'implication des moteurs moléculaires dans le déplacement des clusters de triadine, nous avons voulu les inhiber en utilisant la ciliobrevine D, drogue utilisée pour inhiber l'un des moteurs moléculaires : la dynéine. De la même façon que pour le nocodazole, la ciliobrevine D (1h à 50μM) a été mise en contact de myotubes à 16h de différenciation et transduits préalablement avec T95-GFP. Lors de l'analyse des mouvements des clusters de T95, aucune différence n'a été trouvée pour la vitesse des clusters mais la fraction mobile a chuté atteignant 5%, contre 20% en moyenne dans la fraction contrôle (Figure R17). Ce résultat signifie que lorsque la dynéine est inhibée, moins de clusters de T95 sont mobiles mais que ceux toujours mobiles se déplacent à la même vitesse.

Donc soit la drogue n'inhibe pas à 100% la dynéine soit la kinésine, le deuxième moteur moléculaire, est également impliquée dans ces mouvements.

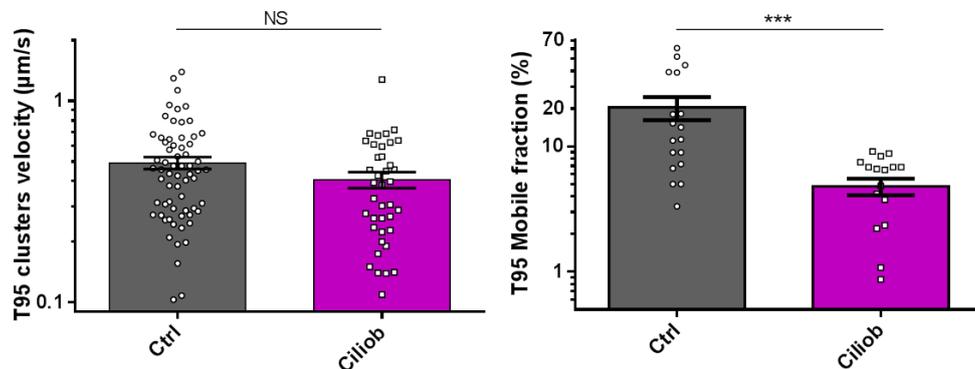


Figure R17: Les clusters de triadine se déplacent grâce aux moteurs moléculaires. Quantification de la vitesse des clusters de T95 (en µm/s, gauche) et de la fraction mobile (en %, droite) suivant le traitement reçu (Ciliobrevine D 50µM 1h) ou non (Ctrl). Quantification effectuée à partir de myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation transduits avec T95-GFP. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. n = 21 cellules analysées pour la vitesse et n = 18-19 cellules analysées pour la fraction mobile, 2 expériences indépendantes. Test t de Student, NS = Non significatif, ***p<0,001.

Pour confirmer ce résultat, nous avons ensuite utilisé p150glued, une sous-unité de la dynactine. La surexpression du domaine coiled-coil 1 (CC1) de p150glued est connue pour altérer les processus dynéine/dynactine dépendant et donc pour inhiber la dynéine (Quintyne et al., 1999; Reck-Peterson et al., 2018). Nous nous sommes donc servi d'une construction lentivirale contenant le domaine CC1 de p150glued (p150glued-GFP) que nous avons exprimé dans les cellules en culture à 16h de différenciation. Au moment de l'observation, nous avons sélectionné les cellules vertes c'est-à-dire celles surexprimant le mutant p150glued-GFP.

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence concernant la vitesse des clusters de T95 mais leur fraction mobile chute de 25 à 17% en présence du mutant de p150glued (Figure R18), ce qui confirme les résultats trouvés avec l'utilisation de la ciliobrevine D.

L'ensemble de ces résultats permet de dire que les clusters de triadine utiliseraient le cytosquelette de microtubules et plus précisément les moteurs moléculaires pour se déplacer dans les cellules et atteindre la triade.

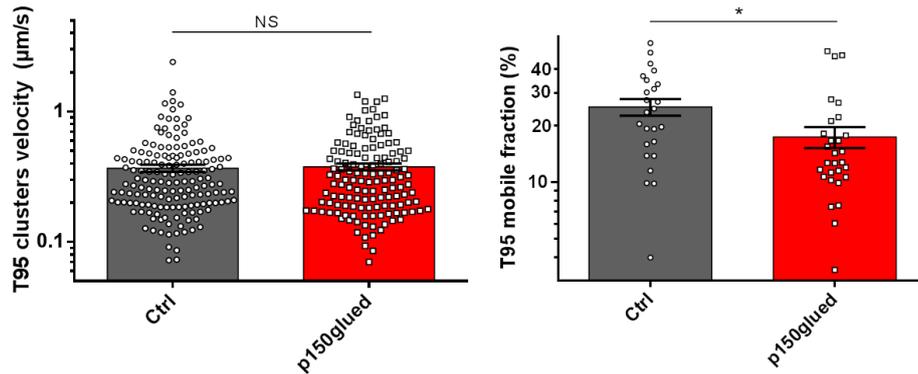


Figure R18 : Les clusters de triadine se déplacent grâce aux moteurs moléculaires.

Quantification de la vitesse des clusters de T95 (en $\mu\text{m/s}$, gauche) et de la fraction mobile (en %, droite), effectuée à partir de myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation transduits avec T95-tdTomato et p150glued-GFP (domaine CC1). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. $n = 24-27$ cellules analysées pour la vitesse et $n = 25-29$ cellules analysées pour la fraction mobile, 3 expériences indépendantes. Mann Whitney, NS = Non significatif, $*p=0,0101$.

La dynéine semble donc bien jouer un rôle pour les mouvements de T95, et peut être que c'est également le cas pour la kinésine, c'est ce que nous avons voulu vérifier. Cependant il existe beaucoup plus de kinésines que de dynéines : 50 réparties en 14 familles (Endow et al., 2010). Au contraire de la dynéine, il n'existe donc pas de drogue pouvant inhiber toutes les kinésines. Nous avons donc ciblé la kinésine Kif5b qui a été montrée comme impliquée dans les mouvements des noyaux au cours de la différenciation musculaire (Gache et al., 2017; Metzger et al., 2012; Wilson and Holzbaur, 2015, 2012).

Nous avons donc utilisé un siRNA contrôle ou dirigé contre Kif5b que l'on a transfectés sur les cellules musculaires transduites en parallèle avec T95-GFP. Cependant à 16h de différenciation, nous n'avons rien observé de particulier compte tenu du fait que le siRNA n'avait pas eu le temps d'agir. Nous avons donc poussé les cellules jusqu'à DIF3. A ce stade nous avons observé un phénotype caractéristique de cellules ayant un défaut de Kif5b, se traduisant par l'agrégation des noyaux au sein du myotube (Figure R19A) et signifiant que le siRNA avait bien agi sur les cellules à DIF3. Néanmoins aucune différence n'a été observée sur la vitesse et la fraction mobile des clusters de T95 dans les cellules ayant reçu le siRNA contre Kif5b (Figure R19B).

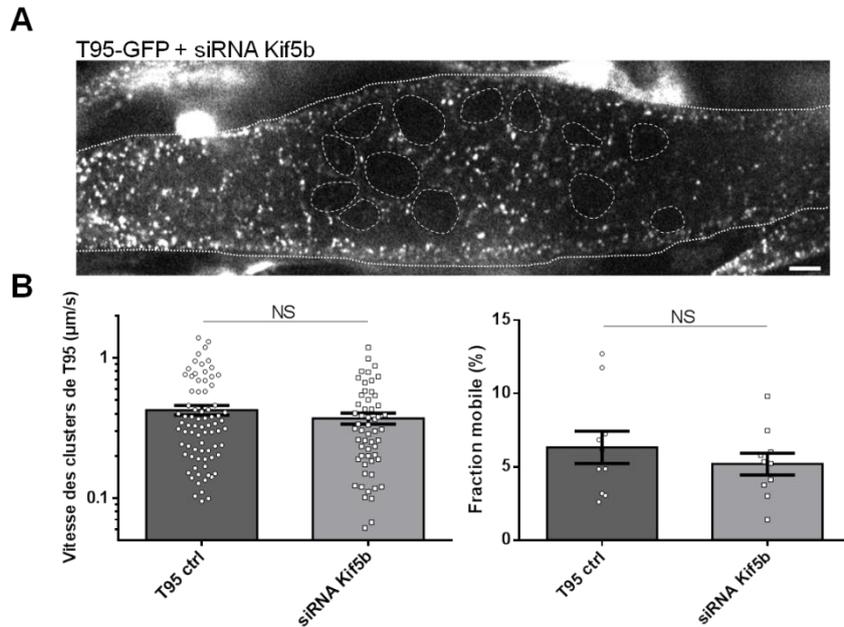


Figure R19 : La déplétion de Kif5b altère le mouvement des noyaux mais pas la mobilité des clusters de T95. **(A)** Myotube *TRDN* KO à 3 jours de différenciation transduit avec T95-GFP et transfecté avec un siRNA contre Kif5b. Comme attendu, la déplétion de Kif5b affecte le positionnement des noyaux. Barre d'échelle = 10μm. **(B)** Quantifications de la vitesse des clusters de T95 (en μm/s, gauche) et de la fraction mobile (en %, droite), effectuées à partir des myotubes *TRDN* KO à DIF3 transduits avec T95-GFP et transfectés avec un siRNA contrôle (T95 ctrl) ou dirigés contre Kif5b. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. n = 9-10 cellules analysées pour la vitesse et n = 10 cellules analysées pour la fraction mobile, 1 expérience. Test-t de Student : NS = Non significatif.

Kif5b ne semble donc pas nécessaire pour les mouvements des clusters de triadine à DIF3. Il serait tout de même intéressant de voir si c'est également bien le cas à 16h de différenciation. Or, comme l'utilisation de siRNA n'est pas réalisable dans un délai aussi court, nous pourrions essayer d'utiliser des lentivirus contenant un siRNA contre Kif5b pour voir si une fois intégré dans les cellules, l'action de déplétion de Kif5b est plus rapide, et/ou jouer sur le moment sur lequel nous transfectons les cellules avec le siRNA. En effet, dans ces expériences nous avons transfecté le siRNA sur les cellules, le lendemain de leur ensemencement et environ 6h avant de les induire en différenciation. Nous pourrions donc essayer de transfecter les cellules rapidement après leur ensemencement afin de les laisser plus en contact du siRNA.

Ces différents résultats indiquent que les clusters de triadine utiliseraient le cytosquelette de microtubules et notamment les moteurs moléculaires, pour se déplacer au sein d'une cellule musculaire en cours de différenciation.

III. Voie de biosynthèse muscle-spécifique

L'utilisation du réseau de microtubules et des moteurs moléculaires par les clusters de triadine, ainsi que la colocalisation de ces clusters avec le marqueur des vésicules COPII, suggère que les clusters de triadine pourraient représenter un trafic vésiculaire au sein d'une voie de biosynthèse. Les microtubules sont en effet largement utilisés dans la voie de biosynthèse.

1) La triadine et VSVG emprunteraient la même voie de sécrétion

Afin de mieux définir le trafic des clusters de triadine, nous avons utilisé VSVG (protéine G du virus de la stomatite vésiculaire), une protéine connue pour emprunter la voie classique de sécrétion (RE>Golgi>Membrane Plasmique). Nous avons comparé le trafic de VSVG à celui de la triadine par co-expression des deux protéines dans des myotubes à 16h de différenciation et suivi de leurs comportements au microscope. Nous avons observé que les clusters de VSVG sont en grande majorité tous mobiles au contraire de ceux de T95. De plus, certains clusters de T95 colocalisent et se déplacent avec ceux de VSVG (Figure R20).

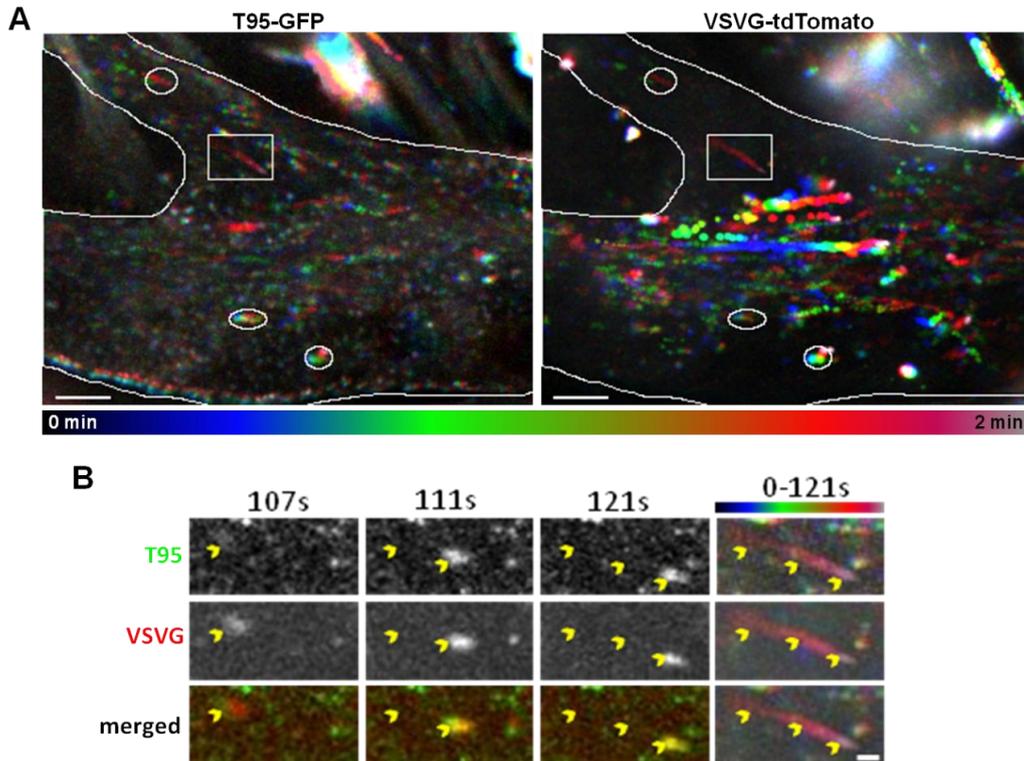


Figure R20 : Les clusters triadine et VSVG se déplacent en partie ensemble. (A) Projections codée couleurs de films de 2 min représentant des myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation exprimant T95-GFP (gauche) et VSVG-tdTomato (droite). 1 image/s. Les 1^{ères} images sont en bleues, les dernières en rouge et les clusters immobiles en blancs. Les ronds blancs indiquent des exemples de clusters de T95 et VSVG se déplaçant ensemble. Le rectangle blanc a été zoomé en B. Barre d'échelle = 10 μ m. **(B)** Cinétique de T95 (vert), VSVG (rouge) et la superposition des deux (merged) provenant du rectangle blanc en A. Les têtes de flèches jaunes indiquent la localisation d'un même cluster au cours du temps. A droite est illustré le même mouvement du cluster en projection codée couleur selon l'échelle affichée (0-121s). Barre d'échelle = 2 μ m.

Lors de marquages immunofluorescents, une colocalisation partielle entre T95 et VSVG (autour de 20%) a également été observée à 16h de différenciation autant sur des cellules *TRDN* KO que WT (Figure R21). Il semblerait donc qu'au début de la différenciation les clusters de T95 et ceux de VSVG empruntent au moins en partie la même voie de biosynthèse.

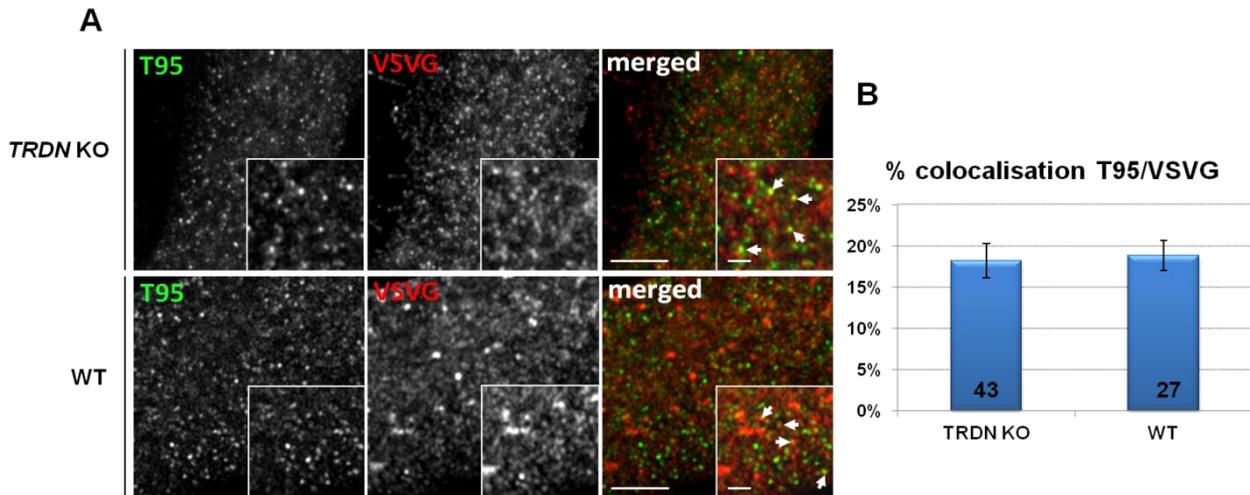


Figure R21 : Les clusters de triadine et de VSVG colocalisent en partie au début de la différenciation. A) Immunomarquages de T95 (anti-GFP, vert) et VSVG (anti-RFP, rouge) sur des cellules *TRDN KO* (haut) ou *WT* (bas) à 16h de différenciation et transduites avec T95-GFP et VSVG-tdTomato. Les flèches blanches indiquent des exemples de clusters qui colocalisent. Barres d'échelle = 5µm et 2µm pour le zoom. **(B)** Pourcentage de colocalisation de T95 avec VSVG à 16h de différenciation dans les cellules *WT* ou *TRDN KO*. Les chiffres noirs en bas du graphique indiquent le nombre de cellules analysées pour au moins 3 expériences indépendantes. Les valeurs sont les moyennes ± SEM.

2) Les clusters triadine emprunteraient une voie muscle spécifique

Dans le but de caractériser la voie de trafic empruntée par les clusters de T95, des immunomarquages ont été réalisés en utilisant des marqueurs de différents compartiments : le Golgi marqué par GM130 et le compartiment intermédiaire ERGIC marqué par l'ERGIC53 (Figure R22A). De plus, lors des premières immunomarquages réalisées dans le but de caractériser les clusters de T95 nous avons également noté une colocalisation partielle avec COPII (Figure R7). Une fois la quantification réalisée, tous ces immunomarquages ont montré que les clusters de T95 ne semblaient que peu colocalisés avec le Golgi (0,06%) alors qu'une colocalisation partielle avec l'ERGIC (18%) et avec COPII (24%) (Figure R22B) est présente à 16h. Toutes ces données suggèrent qu'au début de la différenciation les clusters de triadine sortiraient du réticulum jusqu'à atteindre l'ERGIC, mais ne traverseraient pas l'appareil de Golgi.

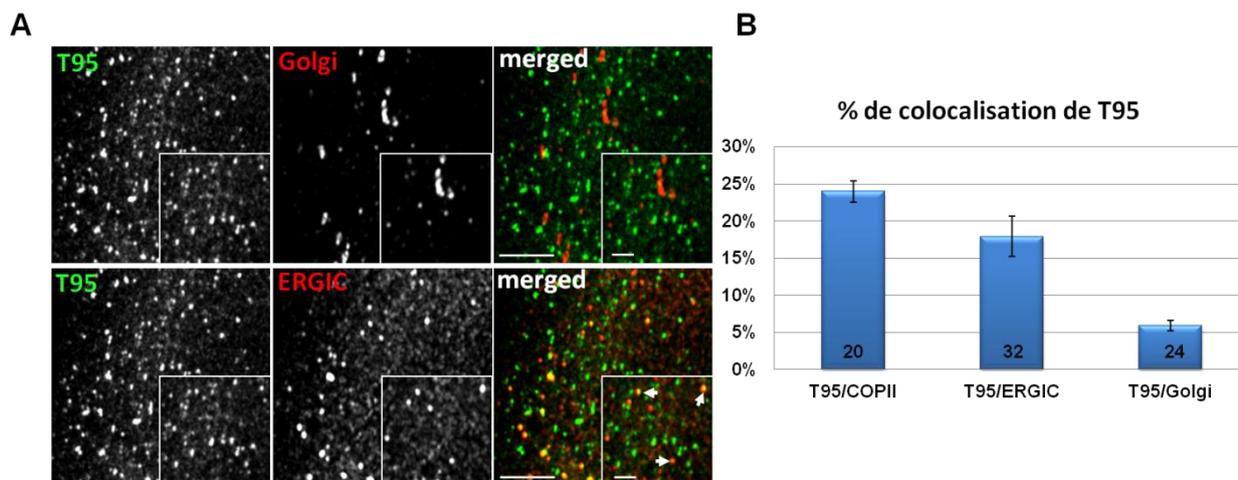


Figure R22 : Les clusters de triadine colocalisent partiellement avec l'ERGIC et COPII mais pas avec le Golgi. **A**) Immunomarquages de T95 (anti-GFP, vert) et ERGIC ou Golgi (anti-ERGIC53 ou anti-GM130, rouge) sur des cellules *TRDN* KO à 16h de différenciation et transduites avec T95-GFP. Les flèches blanches indiquent des exemples de clusters qui colocalisent. Barres d'échelle = 5µm et 2µm pour le zoom. **B**) Pourcentage de colocalisation de T95 avec COPII, l'ERGIC et le Golgi à 16h de différenciation dans les cellules *TRDN* KO. Les chiffres noirs en bas du graphique indiquent le nombre de cellules analysées pour 2-3 expériences indépendantes. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM.

Ensuite nous avons voulu nous servir de VSVG comme d'un marqueur des différents compartiments. En effet le mutant thermosensible ts045 de VSVG peut être retenu dans différents compartiments de la voie de biosynthèse suivant la température, ce qui permet de marquer ces compartiments (Presley et al., 1997). A la température permissive de 32°C, le mutant parcourt l'ensemble de la voie de biosynthèse jusqu'à atteindre la membrane plasmique, à 40°C il est retenu dans le RE, à 20°C il est bloqué dans le Golgi et à 15°C dans l'ERGIC (Figure R23).

Des cellules ont été transduites avec le mutant de VSVG et fixées à 16h de différenciation, après un temps d'incubation à différentes températures dans le but d'accumuler VSVG dans les différents compartiments de la voie de sécrétion. Cependant cette expérience n'a pas fonctionné comme prévu : nous ne sommes pas arrivés à accumuler VSVG dans les différents compartiments, sans que nous puissions en déterminer la cause. Ces expériences ont donc été arrêtées là.

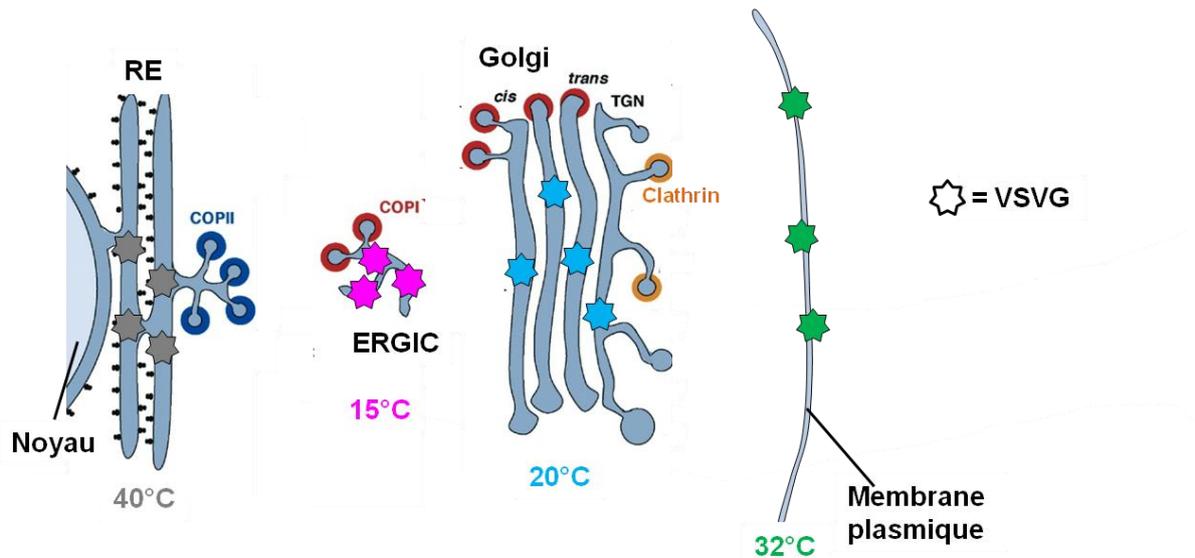


Figure R23 : Le mutant ts045 de VSVG peut être utilisé comme marqueur des compartiments de la voie de biosynthèse. Schéma représentant les compartiments de blocage de VSVG suivant la température imposée : 40°C dans le réticulum, 32°C à la membrane plasmique, 20°C dans le Golgi et 15°C dans l'ERGIC).

Si les clusters de T95 se déplacent bien du réticulum jusqu'à l'ERGIC avant d'atteindre la triade, une altération des voies de transport antérograde et/ou rétrograde de la voie de biosynthèse devrait impacter le trafic des clusters de T95.

Pour tester cette hypothèse, de la Brefeldine A (BFA) a été utilisée sur les myotubes en culture. Cette drogue bloque la formation des vésicules COPI au niveau du Golgi, ce qui entraîne l'effondrement du Golgi et donc inhibe le transport RE-Golgi. Tout d'abord nous avons vérifié que la BFA avait l'effet escompté sur l'appareil de Golgi des cellules en culture. Effectivement autant dans les fibroblastes que dans les myotubes, l'appareil de Golgi perd sa structure de base et se retrouve éparpillé dans la cellule (Figure R24).

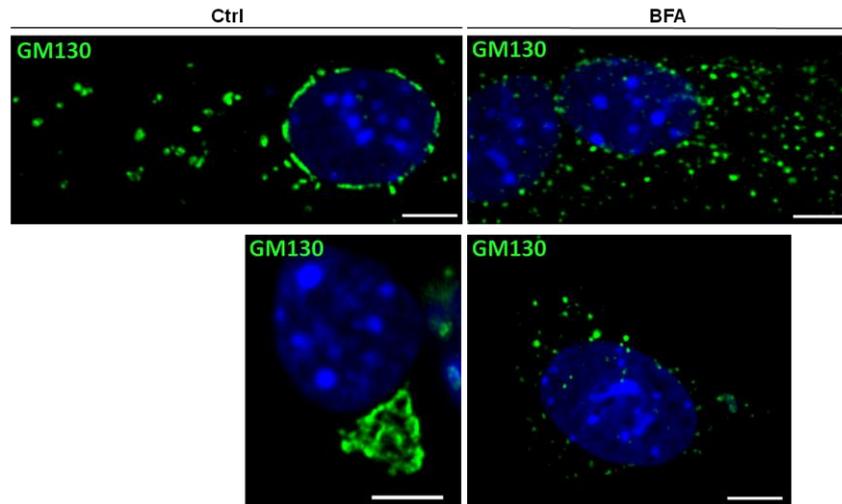


Figure R24 : La structure de l'appareil de Golgi est altérée en présence de Brefeldine A (BFA). Immunomarquages de GM130 (Golgi) (anti-GM130, vert) sur des cellules *TRDN* KO à 16h de différenciation et traités avec la BFA (1h à 5µg/ml, droite) ou non (condition contrôle Ctrl, gauche). Que ce soit les myotubes (images du haut) ou les fibroblastes (images du bas), l'appareil de Golgi perd son organisation de base. Les noyaux ont été marqués au Hoechst (bleu). Barres d'échelle = 10 µm.

Ensuite, le trafic de la triadine et de VSVG ont été comparés sur cellules vivantes à 16h de différenciation, avec ou sans BFA. L'analyse de la vitesse et de la fraction mobile de ces deux protéines montrent que : (1) les clusters de T95 et VSVG se déplacent à la même vitesse (0,4 µm/s en moyenne) mais (2) la fraction mobile des clusters de VSVG est beaucoup plus importante que celle de T95 (50% contre 13%). (3) La BFA n'a pas d'effet ni sur la vitesse ni sur la fraction mobile des clusters de T95 et de VSVG (Figure R25). Or, nous nous attendions au moins à ce que la BFA ait un effet sur le transport de VSVG, connue pour emprunter la voie de biosynthèse. Cependant il a été montré que dans une cellule musculaire, VSVG emprunterait en partie une voie spécifique du muscle, qui la ferait sortir du réticulum, contourner le Golgi, avant de revenir dans le réticulum (Rahkila et al., 1998). Il se pourrait donc que le non effet de la BFA sur VSVG soit dû au fait qu'au début de la différenciation musculaire, la majorité de VSVG ne traverserait pas l'appareil de Golgi.

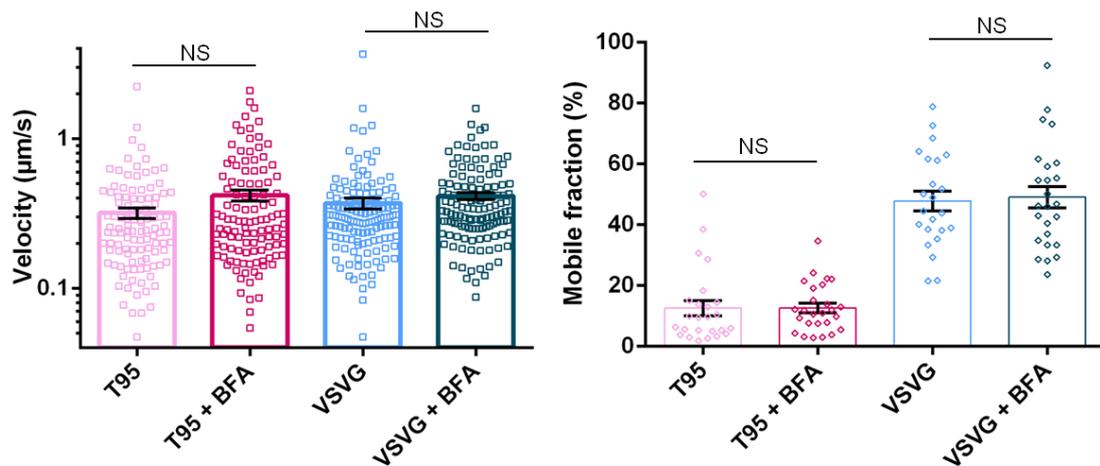


Figure R25 : Le trafic des clusters de triadine et de VSVG n'est pas impacté en présence de Brefeldine A (BFA). Quantifications de la vitesse des clusters de T95 (en $\mu\text{m/s}$, gauche) et de la fraction mobile (en %, droite), effectuées à partir de myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation transduits avec T95-GFP et VSVG-tdTomato. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. $n = 23\text{-}26$ cellules analysées pour la vitesse et la fraction mobile, 3 expériences indépendantes. Test t de Student et Mann Whitney, NS = Non significatif.

N'ayant pas observé d'effet de la BFA sur le trafic de VSVG ou de la triadine, nous avons voulu tenter d'altérer la voie de biosynthèse d'une autre manière. Pour cela nous avons utilisé des dominants négatifs de protéines connues pour jouer un rôle dans le transport des protéines au sein de la voie de biosynthèse. Il s'agit d'Arf1, une GTPase impliquée dans la formation des vésicules COPI au niveau du Golgi et de l'ERGIC, et de Sar1, une GTPase impliquée dans la formation des vésicules COPII au niveau des ERES. L'utilisation des dominants négatifs Arf1 T31N (Arf1 DN) et Sar1 T39N (Sar1 DN) permettent donc d'altérer respectivement le transport rétrograde Golgi>RE et l'export du reticulum (Ward et al., 2001) (Figure R26).

Chaque forme WT ou dominant négatif des protéines a été couplée à une GFP, ce qui nous a permis de directement repérer les cellules exprimant l'une ou l'autre des protéines. Les cellules ont donc été transduites avec T95-tdTomato et Arf1 WT-GFP ou Arf1DN-GFP ou Sar1 WT-GFP ou Sar1 DN-GFP, puis observées vivantes ou fixées, à 16h de différenciation.

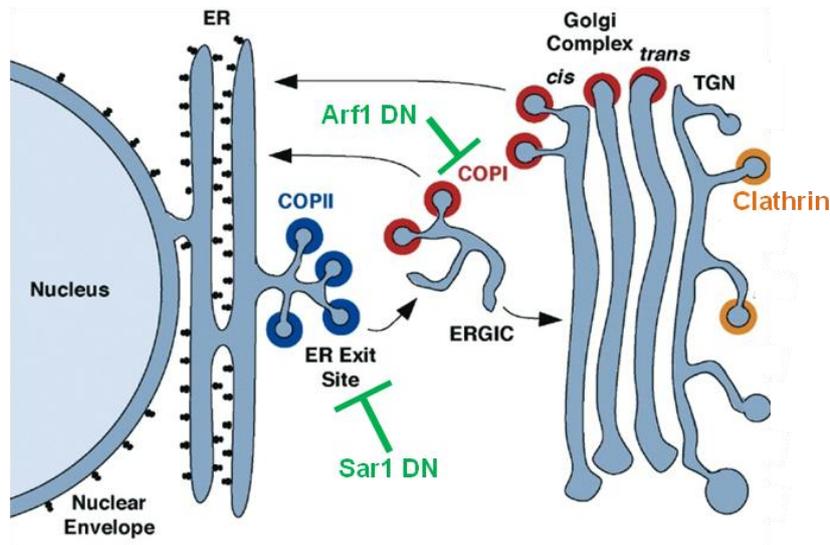


Figure R26 : Schéma illustrant le rôle des dominants négatifs de Sar1 et Arf1. Sar1 T39N est un dominant négatif (Sar1 DN) empêchant la formation des sites de sortie du réticulum et donc bloquant l'export du réticulum. Arf1 T31N est un dominant négatif (Arf1 DN) qui bloque la formation des vésicules COPI, inhibant ainsi la voie rétrograde Golgi>Réticulum.

Concernant les immunomarquages, il aurait été intéressant de voir si avec l'altération de la voie de biosynthèse par les dominants négatifs, les clusters de T95 présentaient une localisation modifiée par rapport aux compartiments cibles comme l'ERGIC ou l'appareil de Golgi. Néanmoins nous n'avons pas pu réaliser certains de ces marquages immunofluorescents car les anticorps anti-ERGIC53, anti-COPII et les anti-RFP (reconnaissant T95-tdTomato) sont de la même espèce. Par contre nous avons pu vérifier (1) la localisation de T95 par rapport à GM130 en présence de Sar1 WT, Sar1 DN, Arf1 WT ou Arf1 DN et (2) si le Golgi était altéré avec les dominants négatifs comme attendu.

Avec les dominants négatifs et majoritairement avec Arf1 DN, la structure de l'appareil de Golgi est altérée et c'est principalement le marquage péri-nucléaire qui a disparu. Cela nous conforte sur le fait que les dominants négatifs jouent bien leur rôle de perturbateur de la voie de biosynthèse. Les clusters de T95, localisés proche des points de Golgi mais sans colocaliser avec eux, ne présentent pas de changement dans leur localisation vis-à-vis de GM130 en présence des dominants négatifs (Figure R27).

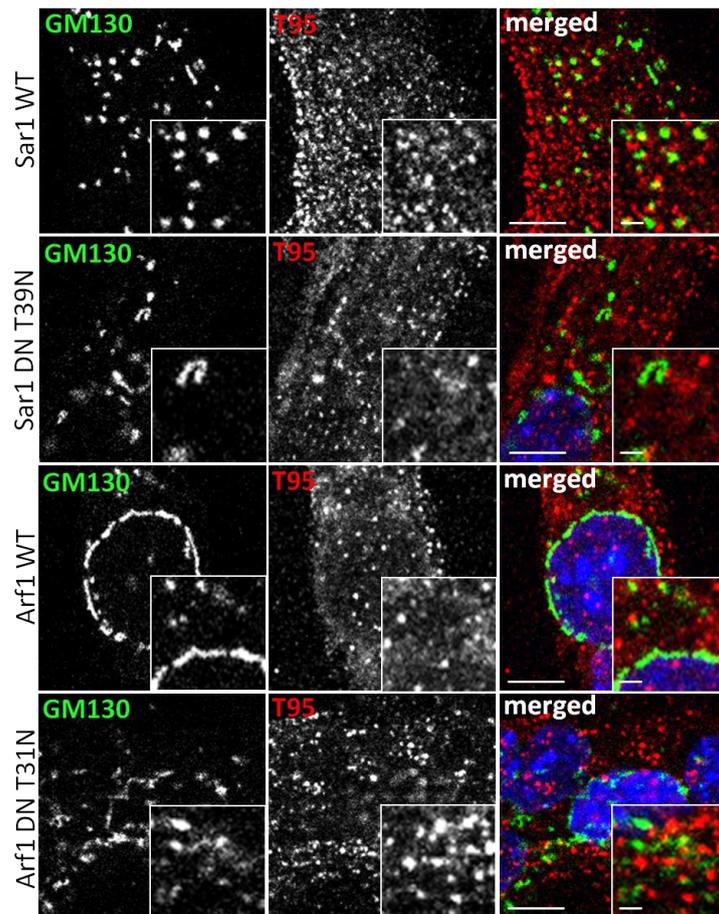


Figure R27 : La localisation des clusters de triadine n'est pas modifiée lors de l'altération de la voie de biosynthèse mais la structure du Golgi est altérée. Immunomarquages de GM130 (Golgi) (anti-GM130, vert) et T95 (anti-RFP, rouge) sur des cellules *TRDN* KO à 16h de différenciation et transduites avec T95-tdTomato et Sar1 WT ou Sar1 T39N ou Arf1 WT ou Arf1 T31N-GFP. Barres d'échelle = 5µm et 2µm pour le zoom.

Les observations sur cellules vivantes montrent que Sar1 et Arf1 ont leurs localisations attendues à savoir reticulum et appareil de Golgi, respectivement. Arf1 DN conduit comme attendu à marquage altéré du Golgi avec anneau péri-nucléaire moins présent et plus de clusters éparpillés dans toute la cellule (Figure R28A). La quantification de la vitesse et de la fraction mobile des clusters de T95 en présence des formes WT ou dominant négatif de Sar1 et Arf1, a montré que (1) bloquer la formation des sites de sortie du réticulum avec Sar1 DN, diminue la fraction mobile de 23 à 13% et (2) altérer la voie rétrograde avec Arf1 DN augmente en moyenne la vitesse des clusters de T95 de 0,25 à 0,37 µm/s (Figure R28B).

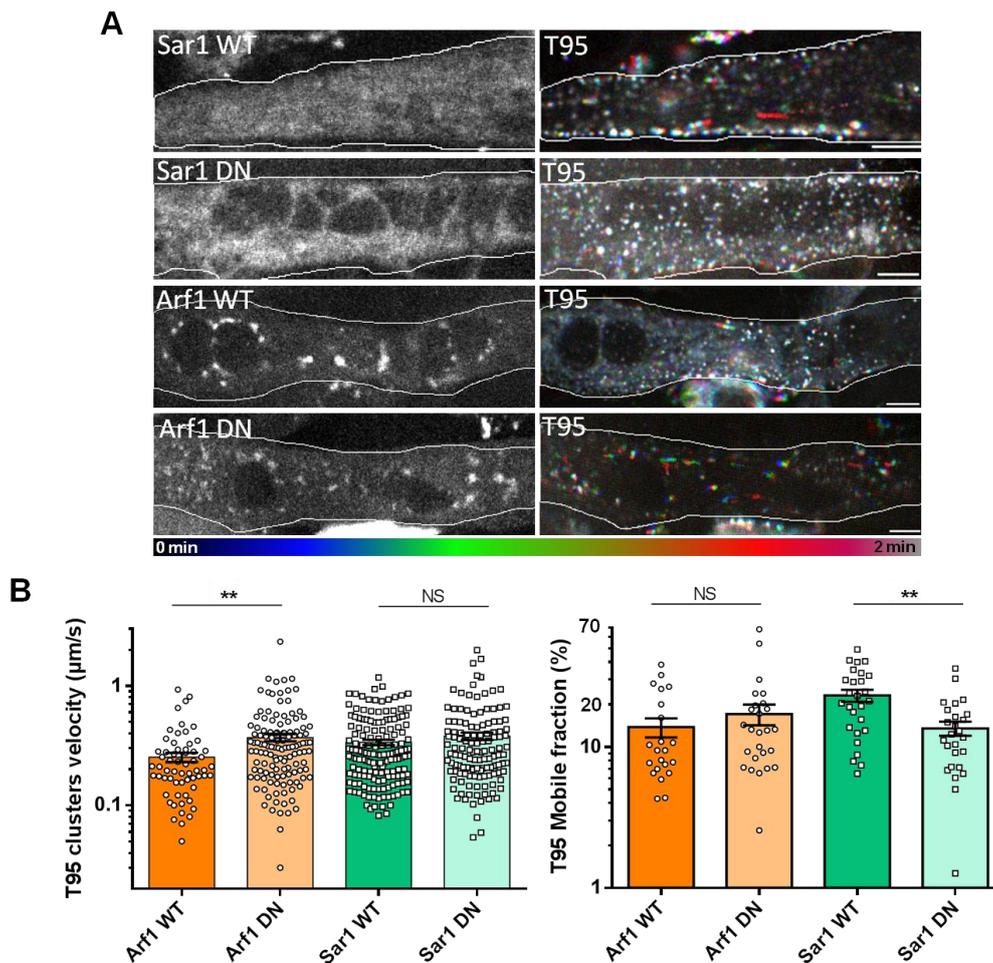


Figure R28 : Le trafic des clusters de triadine est impacté par les altérations de la voie de biosynthèse. (A) Projections codées couleurs de films de 2 min représentant des myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation exprimant T95-tdTomato (droite) et Sar1 WT ou Sar1 DN T39N ou Arf1 WT ou Arf1 DN T31N-GFP (gauche). 1 image/s. Les 1^{ères} images sont en bleues, les dernières en rouge et les clusters immobiles en blancs. Barre d'échelle = 10µm. **(B)** Quantifications de la vitesse des clusters de T95 (en µm/s, gauche) et de la fraction mobile (en %, droite), effectuées à partir de myotubes *TRDN* KO à 16h de différenciation transduits avec T95-tdTomato et Sar1 WT ou Sar1 DN T39N ou Arf1 WT ou Arf1 DN T31N-GFP. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. n = 21-27 cellules analysées pour la vitesse et n = 22-27 cellules analysées pour la fraction mobile, 3 expériences indépendantes. Test t de Student : NS = Non significatif, **p<0,01.

Il semblerait donc qu'altérer la voie de biosynthèse perturbe d'une façon ou d'une autre le trafic des clusters de triadine. Il serait intéressant d'observer le trafic de VSVG en présence de Sar1 et Arf1 afin de le comparer aux résultats obtenus pour la triadine et de voir si on confirme ou non les résultats obtenus avec la BFA.

De façon générale, ces résultats suggèrent que les clusters de triadine seraient des vésicules empruntant une voie de biosynthèse spécifique du muscle squelettique dans laquelle, les clusters sortiraient du reticulum après leur synthèse, traverseraient l'ERGIC mais pas le Golgi et seraient adressés au RS où ils atteindraient la triade.

IV. Conclusions partie 1

L'utilisation d'un système *in vitro* de cellules primaires mises à différencier nous a permis de suivre et de mieux comprendre le trafic d'une protéine du CRC, la triadine, à un stade très précoce dans la différenciation musculaire (16h de différenciation).

Les cellules observées sont en cours de développement, les sarcomères et le cytosquelette ne sont pas encore organisés tandis que les protéines de la triade, présentes sous forme de clusters colocalisent déjà à 16h de différenciation.

Nous avons pu observer qu'à ce stade de différenciation, les clusters de triadine sont d'autant plus mobiles et que cette quantité de clusters mobiles ne faisait que diminuer au cours de la différenciation.

Nous avons également montré que les clusters de triadine se déplaçaient avec ceux du DHPR α 1s, suggérant que ces clusters représentent des groupes de protéines du CRC déjà associées et se déplaçant pour s'organiser en doubles rangées de points à la triade.

De plus, ces clusters seraient des vésicules empruntant une voie muscle spécifique, ce qui signifie qu'ils passeraient par l'ERGIC de manière COPII-dépendante, et retourneraient dans le RS avant d'atteindre la triade et d'y rester. Pour se déplacer, ils utiliseraient les microtubules et notamment les moteurs moléculaires.

Il se peut que les citernes terminales soient déjà associées à un tubule-t et donc lorsque les protéines du CRC atteignent la citerne terminale, chaque protéines se localisent dans son compartiment final (tubule-t ou citerne terminale).

Une autre hypothèse serait qu'au début de la différenciation les citernes terminales ne sont pas accolées à un tubule-t et elles se déplacent jusqu'à en contacter un puis finissent par atteindre une organisation en double rangée au fur et à mesure de la différenciation (Figure R29).

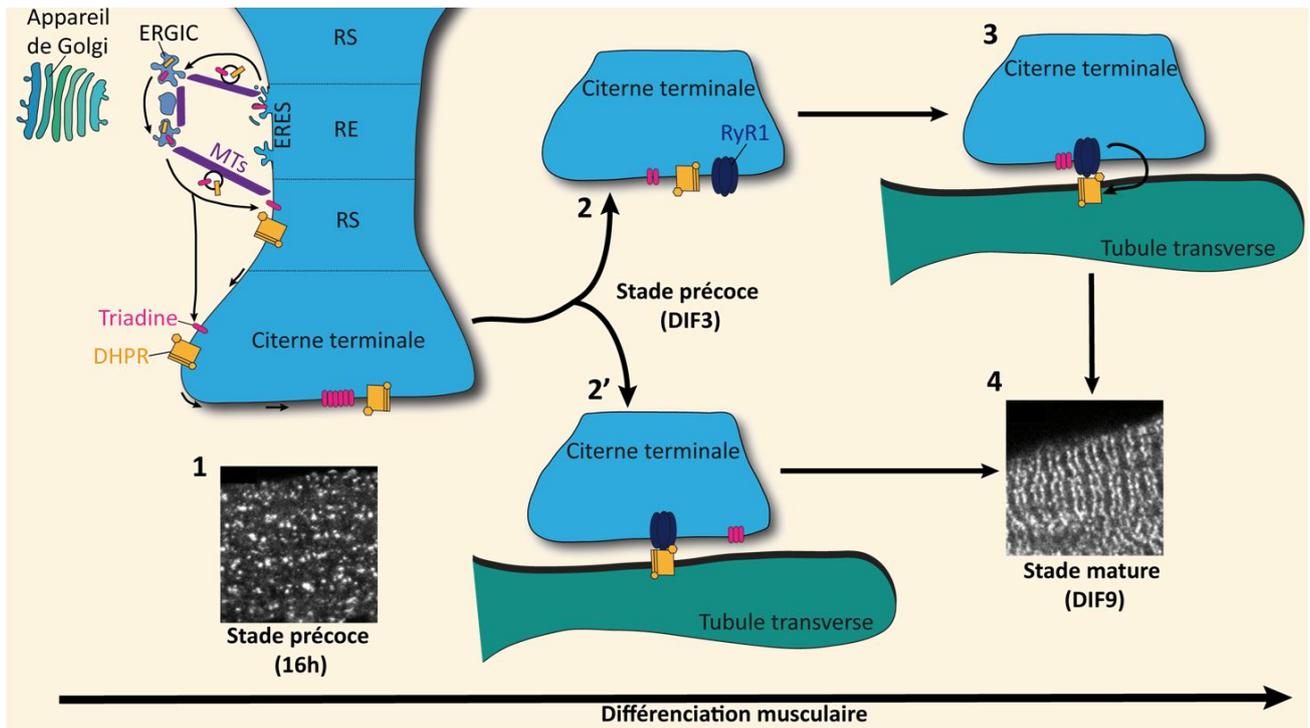


Figure R29 : Trafic des protéines du CRC : de leur synthèse à leur organisation finale. Schéma illustrant différentes hypothèses concernant le trafic des protéines du CRC. **(1)** A 16h de différenciation et après leur synthèse au sein du RE, les protéines du CRC, présentes sous forme de clusters éparpillés, sortiraient du réticulum, traverseraient l'ERGIC et reviendraient au sein du RS ou directement dans la citerne terminale, grâce au réseau de microtubules. **(2 et 2')** Les citernes terminales ne seraient pas nécessairement accolées à un tubule-t mais quand elles établissent un contact avec l'un d'eux au cours de la différenciation musculaire, les protéines du CRC s'organiseront dans leurs membranes respectives **(2' et 3)** et atteindront leur organisation finale en doubles rangées de points **(4)**. RE = réticulum endoplasmique, RS = réticulum sarcoplasmique, ERES = Sites de sortie du réticulum (Endoplasmic Reticulum Exit Sites), ERGIC = compartiment intermédiaire réticulum-Golgi, MTs = microtubules, 16h ou DIF3 ou DIF9 = 16h ou 3 jours ou 9 jours de différenciation.

Partie 2 : Adressage et rétention de la triadine à la triade

I. Caractérisation du modèle cellulaire

Nous avons vu au début de la partie 1 (Figure R1), qu'à DIF9, aucun mouvement de T95 n'est observé lors d'expériences en vidéo-microscopie. Cependant par des techniques de FRAP il a été montré qu'une fraction de T95 était mobile (16%) (Cusimano et al., 2009) et nous avons confirmé ce résultat sur des cellules *TRDN* KO transduites avec T95-GFP. Ces résultats confirment donc qu'une petite fraction de T95 est toujours mobile à DIF9 mais que la vidéo-microscopie n'est pas assez sensible pour percevoir ces mouvements.

Dans le but d'observer les mouvements de triadine, nous avons utilisé une chimère de T95 photoactivable (T95-PAGFP) (Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002) et nous avons comparé son trafic à celui de protéines contrôles, non localisées à la triade : Sec61 β -PAGFP et PAGFP-KDEL. Sec61 β est une sous-unité du translocon, c'est une protéine transmembranaire localisée dans les membranes du réticulum (Greenfield and High, 1999). Elle contient un seul domaine transmembranaire de 21 acides aminés (Rapoport et al., 1996b), comme celui de la triadine. PAGFP-KDEL est localisé dans la lumière du réticulum grâce à sa séquence signal et au motif de rétention KDEL (Munro and Pelham, 1987) (Figure R30A).

Dans un premier temps les protéines PAGFP contenues dans les lysats cellulaires *TRDN* KO ont été analysées en Western blot avec un anticorps anti-GFP. Les bandes obtenues autour de 150, 37 et 28 kDa, correspondent bien à T95-PAGFP, Sec61 β -PAGFP et PAGFP-KDEL (Figure R30B). Dans un second temps, des immunomarquages ont été réalisés pour observer la localisation de ces différentes protéines, comparée au marqueur de la triade RyR1, dans des myotubes *TRDN* KO à DIF3 ou DIF9 (Figure R30C). Comme attendu, T95-PAGFP colocalise avec RyR1 sous forme de clusters éparpillés à DIF3 ou organisés en doubles rangées de points à DIF9. Sec61 β -PAGFP et PAGFP-KDEL, quant à eux, ne colocalisent pas avec RyR1 à aucun des stades de différenciation, et présentent un marquage réticulaire plutôt diffus. A DIF9, les striations de PAGFP-KDEL s'intercalent entre celles de RyR1.

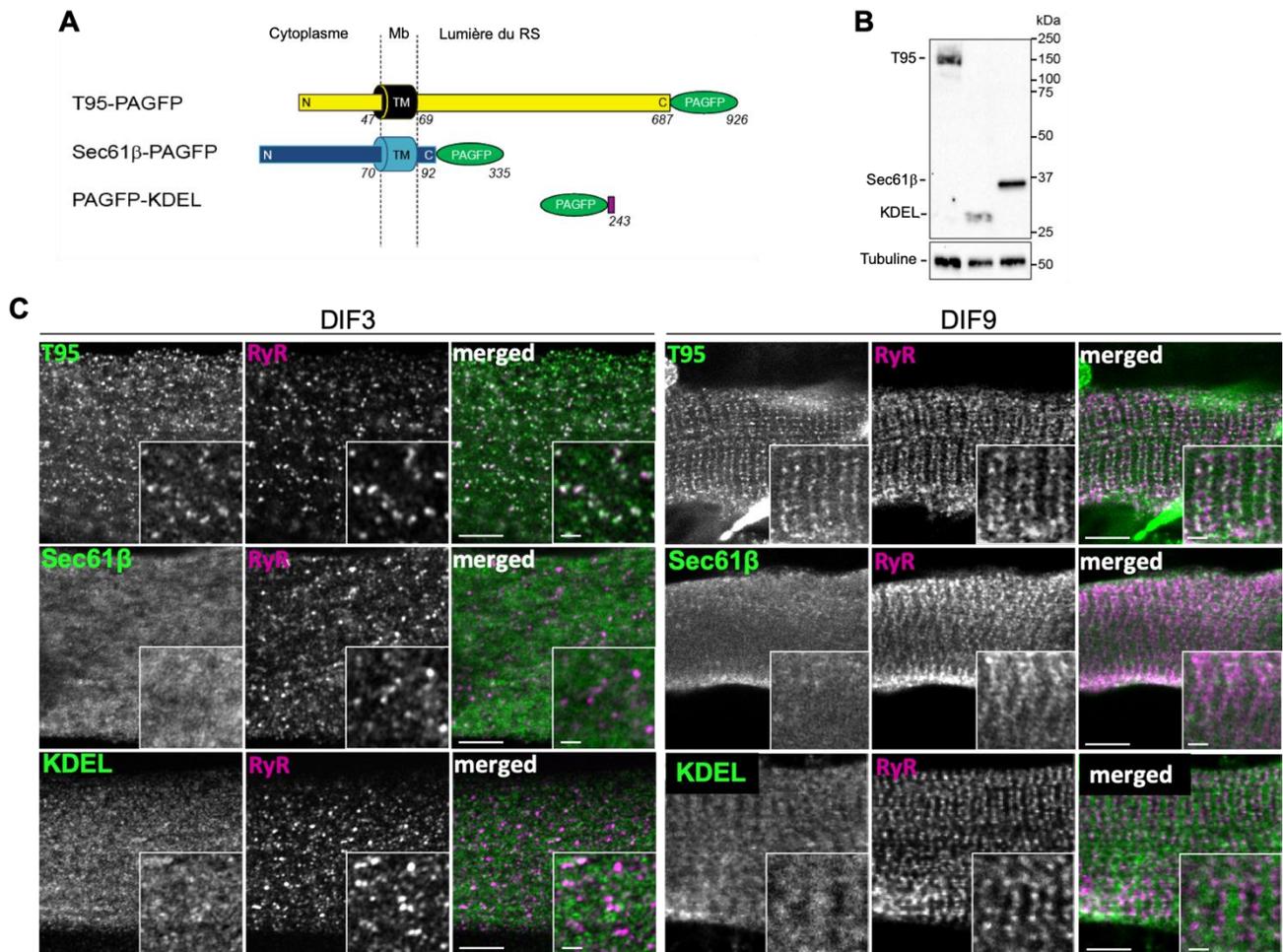


Figure R30 : Les protéines utilisées se localisent comme attendu dans leur compartiment cible : membranes ou lumière du RS. (A) Schéma représentant T95-PAGFP, Sec61 β -PAGFP et PAGFP-KDEL avec leurs domaines N-terminaux (N), C-terminaux (C) et transmembranaires (TM) ainsi que la localisation de chaque domaine vis-à-vis de la membrane du RS (Cytoplasme, Membrane (Mb) et Lumière du RS). Les chiffres noirs indiquent le nombre d'acides aminés de la protéine. **(B)** Western blot réalisé avec un anticorps anti-GFP sur 10 μ g de lysats cellulaires *TRDN* KO transduits avec T95-PAGFP ou Sec61 β -PAGFP ou PAGFP-KDEL. Trois bandes sont détectées à 150 kDa (T95-PAGFP), 37 kDa (Sec61 β -PAGFP) et 28 kDa (PAGFP-KDEL). La β -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **(C)** Myotubes à DIF3 (gauche) ou DIF9 (droite) exprimant T95-PAGFP, Sec61 β -PAGFP ou PAGFP-KDEL immunomarqués avec un anti-GFP (vert) et un anti-RyR1 (magenta). Barres d'échelle = 5 μ m et 2 μ m pour les zooms.

Ces expériences permettent de valider l'expression et la localisation correctes des trois protéines au sein des cellules différenciées *TRDN* KO. Ces protéines ont donc été utilisées pour suivre et comparer leur trafic.

II. Dynamique de la triadine

1) La triadine est dynamique dans les membranes du RS

a) La triadine est dynamique quel que soit le stade de différenciation

Pour suivre le trafic de la triadine, la photoactivation a été utilisée. Cette expérience consiste à révéler la fluorescence d'une protéine après un flash UV (405nm) dans une région d'intérêt (ROI) prédéfinie (Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002). Toutes les protéines photoactivables ont été suivies pendant 169s et un marqueur DsRed-KDEL a été co-transduit en parallèle de chaque protéine afin d'observer l'état de différenciation des myotubes.

Une fois photoactivée, la fluorescence de PAGFP-KDEL détectée dans le ROI sort rapidement de ce dernier puis disparaît et cela au deux stades de différenciation analysés (Figure R31A). Ce phénomène est ce qui est attendu pour une protéine diffusant librement dans la lumière du réticulum.

Sec61 β -PAGFP présente une fluorescence diffuse à l'intérieur du ROI et qui colocalise avec le marqueur DsRed-KDEL. Puis au cours du temps, la fluorescence de Sec61 β -PAGFP diminue dans le ROI et un halo de fluorescence s'étend à l'extérieur, et cela également aux deux stades de différenciation (Figure R31B).

Comme attendu, la fluorescence de T95-PAGFP est, quant à elle, présente sous forme de clusters éparpillés à DIF3 ou de doubles rangées de points à DIF9. Aucune fluorescence en dehors du ROI n'est détectée au cours du temps, seulement la diminution de fluorescence dans le ROI est observée (Figure R31C).

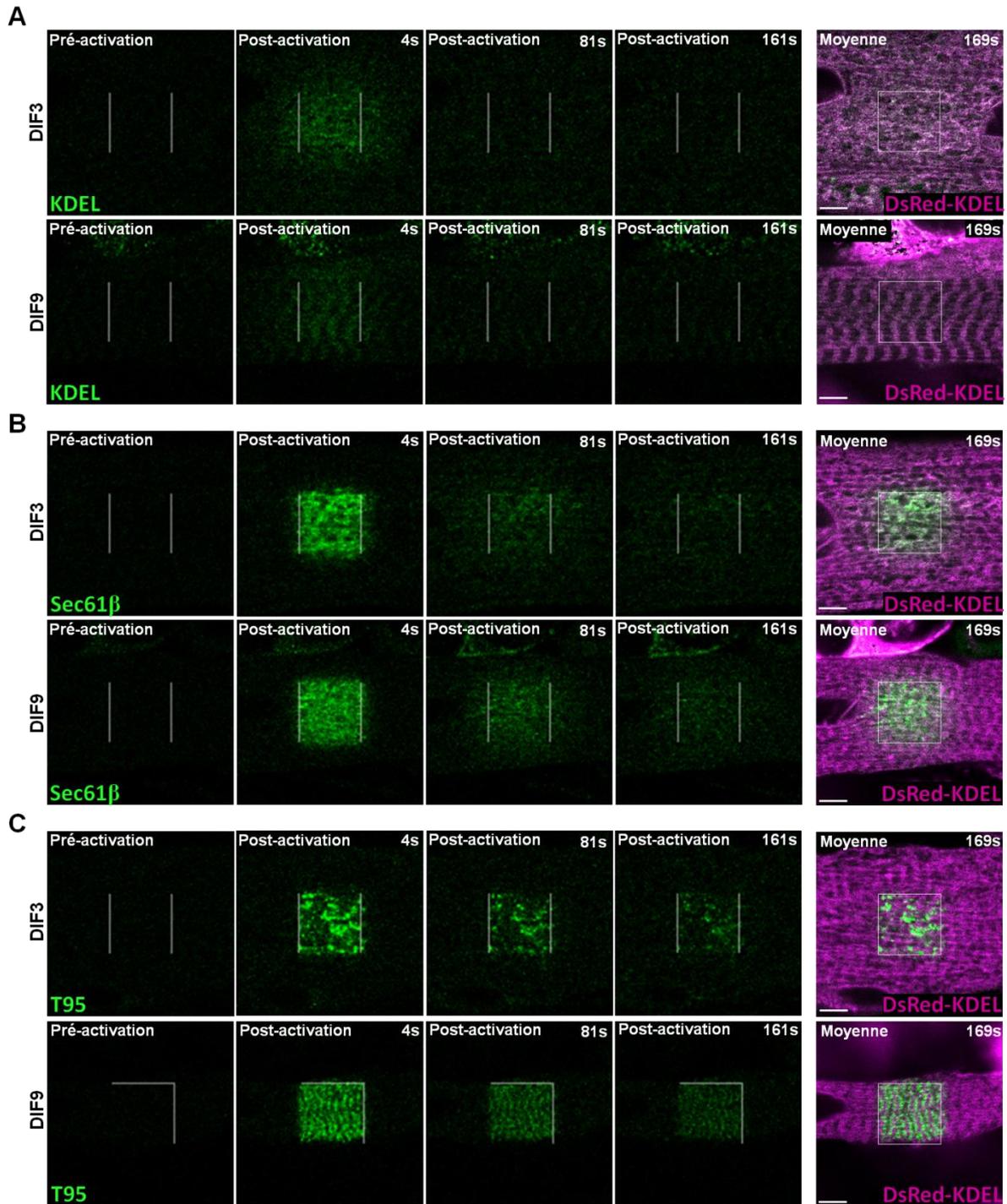


Figure R31 : Dynamique de T95 comparée à Sec61 β et KDEL. Protocole de simple activation de myotubes à DIF3 (haut) ou DIF9 (bas) co-transduits avec PAGFP-KDEL (**A**) ou Sec61 β -PAGFP (**B**) ou T95-PAGFP (**C**) (vert) et DsRed-KDEL (marqueur luminal, magenta). L'activation est réalisée dans le cadre blanc (ROI) et la fluorescence est suivie pendant 169s. Une image pré-activation et 3 images post-activation (4, 81 et 161s) sont présentées. Le panneau de droite représente une projection de l'intensité moyenne de chaque image après photoactivation, avec le marqueur DsRed-KDEL (magenta). Barre d'échelle = 5 μ m.

Pour ces trois protéines, la diminution de la fluorescence au sein du ROI, a été modélisée suivant une courbe de type exponentielle décroissante et le $t_{1/2}$ a été calculé. Au préalable, le bruit de fond des trois premières images pré-activation est

soustrait à tout le film puis chaque film a été corrigé pour le photoblanchiment. Enfin l'intensité de fluorescence a été normalisée entre 0 et 1 (cf. Matériels & Méthodes VI.2b).

Les courbes et les $t_{1/2}$ obtenus confirment les résultats observés sur les films, à savoir les trois protéines sont dynamiques mais avec des cinétiques différentes (Figure R32). La fluorescence de KDEL décroît rapidement avant d'atteindre un plateau, s'illustrant par un $t_{1/2}$ plus bas que pour T95 et Sec61 β et caractérise le fait que KDEL diffuse librement dans la lumière du réticulum. T95 et Sec61 β se comportent de façon similaire même si leurs $t_{1/2}$ suggèrent que la dynamique de T95 est plus restreinte. De plus, entre DIF3 et DIF9, il est observé que les $t_{1/2}$ des trois protéines augmentent tous d'environ 47%, pouvant s'expliquer par une complexité cellulaire plus importante à DIF9 (Figure 32B).

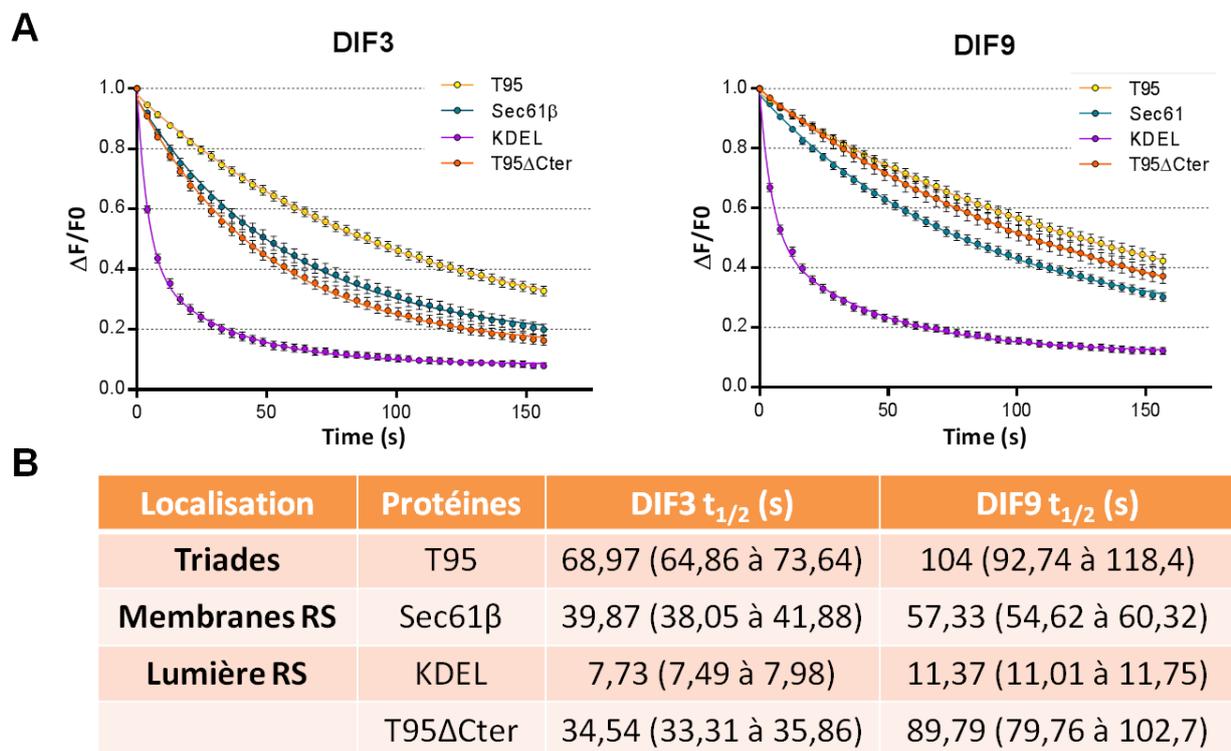


Figure R32 : La triadine diffuse plus lentement que les autres protéines. (A) Courbes représentant la décroissance de l'intensité de fluorescence quantifiée pour chaque protéine dans le ROI activé après une simple activation, de myotubes à DIF3 (gauche) ou DIF9 (droite). Chaque image a été corrigée pour le bruit de fond et le photoblanchiment et normalisées à 100% de l'intensité de la 1^{ère} image post-activation. Les valeurs obtenues évoluent suivant une exponentielle décroissante permettant d'en extraire les $t_{1/2}$. Les moyennes \pm i.c. sont représentées pour n = 28 à 40 cellules analysées de 4 expériences indépendantes. **(B)** Valeurs des $t_{1/2}$ (en s) de T95, Sec61 β , KDEL et T95 Δ Cter à DIF3 et DIF9. Les valeurs représentent les moyennes (i.c.) pour n = 28 à 40 cellules analysées de 4 expériences indépendantes.

b) La partie luminale de la triadine restreint sa dynamique à DIF3

Nous nous sommes demandés si la diffusion plus limitée de T95 pouvait être due à sa partie C-terminale luminale de grande taille, contrairement à celle de Sec61 β qui est courte. Un mutant de la triadine T95 Δ Cter déplété à partir de l'acide aminé 112, a donc été utilisé. Cette déplétion permet d'enlever tous les domaines fonctionnels (KEKE, Coiled-Coil et les deux cystéines) de la partie C-terminale de la triadine. A DIF3, la fluorescence de T95 Δ Cter-PAGFP présente un marquage diffus et clustérisé. Cette fluorescence diminue rapidement au sein du ROI et un halo de fluorescence apparaît à l'extérieur. A DIF9, un marquage en doubles rangées de points apparaît de part et d'autre des striations du marqueur DsRed-KDEL (Figure R33). Après analyse, les courbes de fluorescence et les $t_{1/2}$ pour T95 Δ Cter, sont similaires à Sec61 β à DIF3 puis à T95 à DIF9 (Figures R32).

Nous pouvons également remarqué que le $t_{1/2}$ de T95 Δ Cter augmente de 160% entre DIF3 et DIF9 par rapport au 47% en moyenne de changement pour les $t_{1/2}$ de T95, Sec61 β et KDEL. Cette différence illustre également le fait que quelque chose ralentit fortement T95 Δ Cter au cours de la différenciation et lui permet de se comporter comme T95.

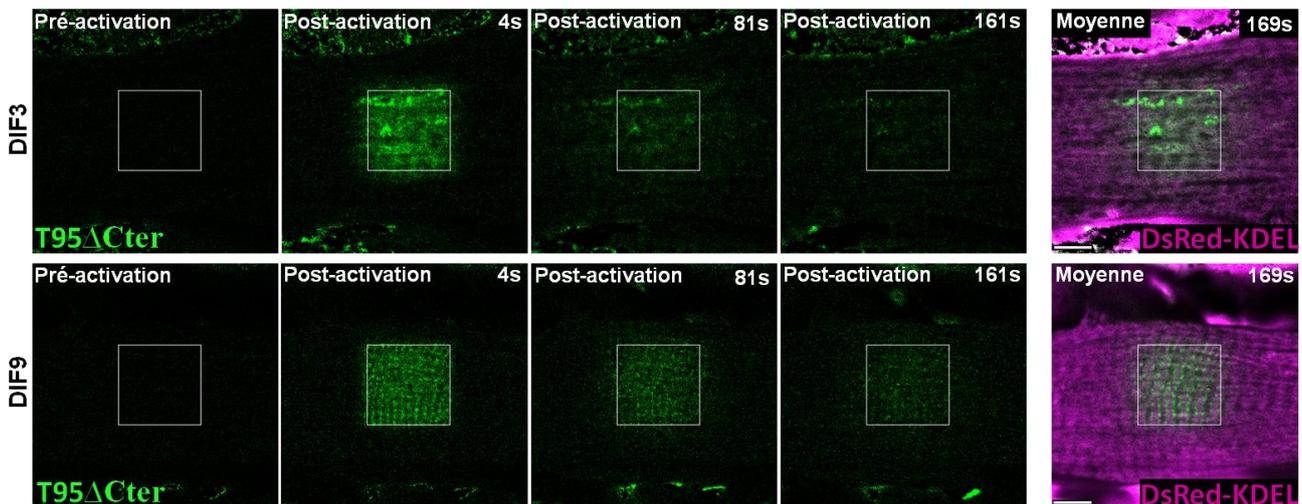


Figure R33 : T95 Δ Cter change de comportement au cours de la différenciation musculaire. Protocole de simple activation de myotubes à DIF3 (haut) ou DIF9 (bas) co-transduits avec T95 Δ Cter-PAGFP et DsRed-KDEL (marqueur luminal, magenta). L'activation est réalisée dans le cadre blanc (ROI) et la fluorescence est suivie pendant 169s. Une image pré-activation et 3 images post-activation (4, 81 et 161s) sont montrées. Le panneau de droite représente une projection de l'intensité moyenne de chaque image après photoactivation, avec le marqueur DsRed-KDEL (magenta). Barre d'échelle = 5 μ m.

Ces expériences suggèrent que (1) la partie luminale de T95 est utile au début de la différenciation musculaire pour restreindre sa diffusion mais que (2) un autre mécanisme indépendant du domaine C-terminal de T95 est également impliqué plus tardivement. C'est pourquoi T95 Δ Cter acquiert certaines propriétés de T95 au cours de la différenciation musculaire, lui permettant de se comporter comme une protéine de la triade et de s'y localiser.

2) La triadine diffuse avant d'être retenue dans les triades

La triadine semble donc bien dynamique dans les membranes du reticulum mais nous n'avons pas pu percevoir ses mouvements. Ces observations sont en lien avec le fait qu'une faible fraction mobile de triadine a été détectée en FRAP et suggère que trop peu de molécules de T95-PAGFP ont quitté le ROI d'activation pour être perçue. Pour essayer de contrer ce problème, nous avons pensé que la simple activation ne permet pas de faire apparaître assez de fluorescence de T95 pour être détectée. Pour tenter de résoudre ce problème nous avons adapté le protocole de photoactivation en activant plus de fluorescence de T95 grâce à des activations répétées (itérations) dans un ROI plus petit.

Pour Sec61 β , les activations répétées résultent en une fluorescence diffuse dans le ROI et qui s'étend comme une onde dans toute la cellule au cours du temps. Cette onde colocalise avec le marqueur du réticulum DsRed-KDEL (Figure R34A) ce qui suggère une diffusion de Sec61 β -PAGFP dans les membranes du RS.

Pour T95, plusieurs phénomènes sont observés : (1) la fluorescence dans le ROI décroît au cours du film. Nous supposons que c'est dû au photoblanchiment de la fraction de T95 peu ou pas mobile. (2) L'apparition de la fluorescence dans le ROI, sous forme de clusters, est suivie par une onde de fluorescence qui diffuse hors du ROI et devient très rapidement indétectable. (3) Des clusters sont détectés en dehors du ROI à DIF3 et DIF9 et s'organisent de part et d'autres des striations du DsRed-KDEL à DIF9, localisation caractéristique des triades (Figure R34B).

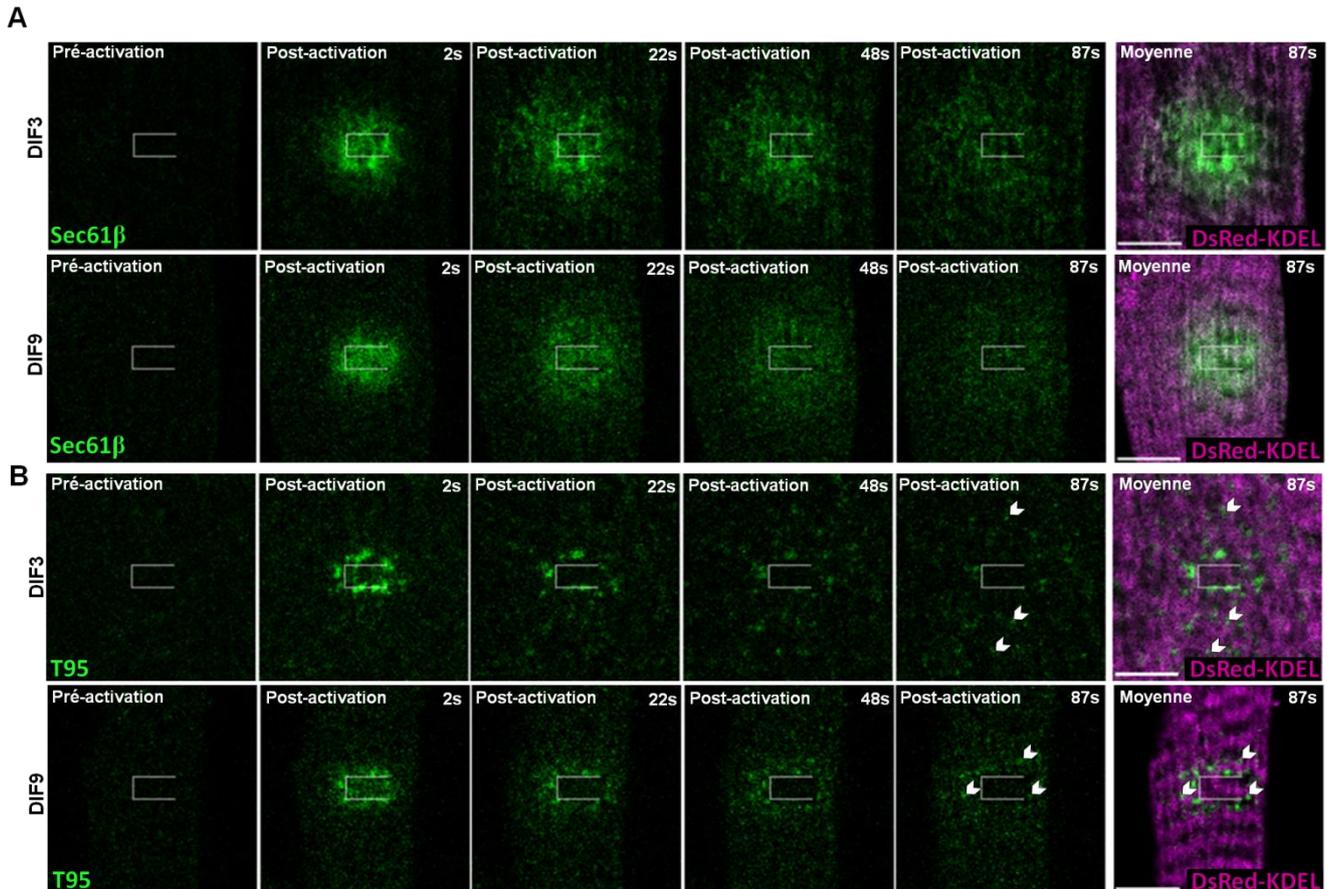


Figure R34 : T95 diffuse dans les membranes du RS. Protocole d'itérations sur des myotubes à DIF3 (haut) ou DIF9 (bas) co-exprimant Sec61 β -PAGFP (**A**) ou T95-PAGFP (**B**) avec DsRed-KDEL (marqueur luminal, magenta). Une image pré-activation et quatre images post-activation (2, 22, 48 et 87s) d'un film de 87s sont montrées. Les panneaux de droite représentent une projection de l'intensité moyenne de chaque image après photoactivation, avec le marqueur DsRed-KDEL (magenta). Barre d'échelle = 5 μ m. Les têtes de flèches indiquent des clusters de T95 détectées en dehors du ROI d'activation.

Pour décrire ces mouvements, deux paramètres ont été quantifiés : la vitesse de l'onde de fluorescence et le taux de décroissance de la fluorescence en fonction de la distance au ROI.

Quand ces deux paramètres sont calculés pour T95, nous avons pu observer que l'onde de fluorescence est de courte durée de vie et ne s'étend pas plus loin que 3 μ m autour du ROI. La vitesse de l'onde entre T95 et Sec61 β est similaire à DIF3 (5,0 et 5,57 μ m/min, respectivement) alors qu'elle est plus lente à DIF9 pour T95 que pour Sec61 β (4,01 et 6,70 μ m/min, respectivement). Le taux de décroissance de T95 (DIF3 : 59,57% et DIF9 : 61,67%) est, quant à lui, plus élevé que celui de Sec61 β (DIF3 : 42,97% et DIF9 : 41,32%) aux deux stades de différenciation (Figure R35).

T95-PAGFP activée dans le ROI atteint des zones (clusters) plus ou moins éloignées de la zone d'activation et cela quel que soit le stade de différenciation musculaire. Ces clusters, de part leurs localisations, semblent être des triades. L'onde de fluorescence similaire à celle de Sec61 β , témoigne du fait que T95, tout comme Sec61 β , diffuse dans les membranes du RS, avant d'être retenue dans les triades.

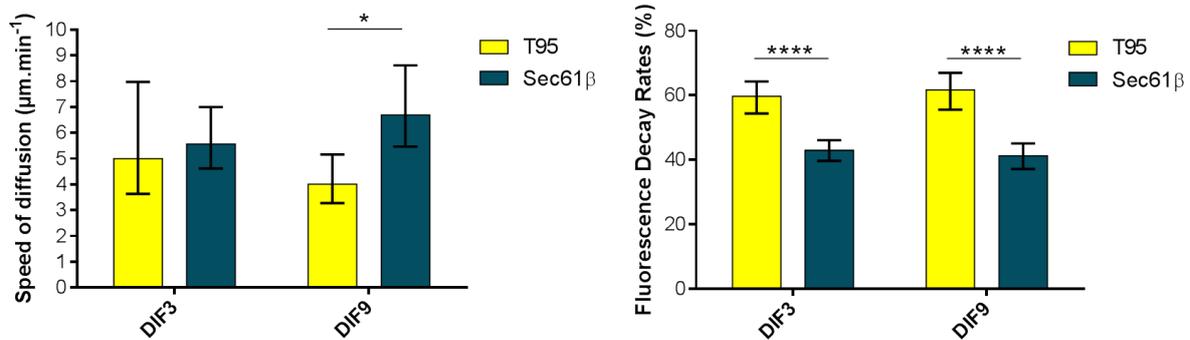


Figure R35 : T95 diffuse avant de s'accumuler dans des triades. Graphiques représentant la vitesse de diffusion de l'onde de fluorescence (gauche) ainsi que le taux de décroissance de fluorescence (droite) de Sec61 β -PAGFP et T95-PAGFP à DIF3 et DIF9. Les valeurs représentent les moyennes \pm i.c. Modèle de comparaison de régressions linéaires * $p < 0,05$ ou d'exponentielle décroissante **** $p < 0,0001$. $n = 7-12$ cellules analysées de 3 expériences indépendantes.

3) Dans un muscle adulte, la triadine diffuse également avant d'être retenue dans les triades

Nous avons voulu savoir si le comportement dynamique de la triadine dans les cellules en culture avait également lieu dans un muscle adulte. T95-PAGFP et DsRed-KDEL ont donc été électroporés dans des FDB de souris *TRDN* KO (DiFranco et al., 2009) et des expériences de photoactivation ont été réalisées.

Dans un premier temps, lors de l'utilisation de la simple activation et comme attendu, la fluorescence de T95-PAGFP est apparue dans le ROI activé, sous forme de doubles rangées de points s'intercalant autour des striations du marqueur DsRed-KDEL. Aucun halo de fluorescence n'est observé en dehors du ROI, seulement une décroissance de fluorescence à l'intérieur du ROI est visible (Figure R36A). Le $t_{1/2}$ obtenu, 98,14s (i.c. 72,67 à 151,1), est similaire à celui de T95 à DIF9.

Dans un deuxième temps nous avons réalisé des itérations pour voir si les mouvements de T95-PAGFP pouvaient également être observés dans une fibre

musculaire adulte. La fluorescence initiale dans le ROI décroît tout au long de l'expérience, probablement à cause du photoblanchiment de la fraction peu voire pas mobile de T95. De plus, une onde de fluorescence apparaît directement après l'activation, et est détectée en dehors du ROI puis disparaît rapidement. L'observation des films montre également que la fluorescence de T95-PAGFP s'accumule dans des clusters en dehors du ROI et que ces clusters s'organisent de part et d'autre des striations du DsRed-KDEL, localisation typique des triades (Figure R36B).

Ces résultats confirment donc que le comportement dynamique de T95 observé dans des cellules en culture et également vrai au sein d'une fibre musculaire adulte : T95 diffuse dans les membranes du reticulum avant de s'accumuler dans les triades.

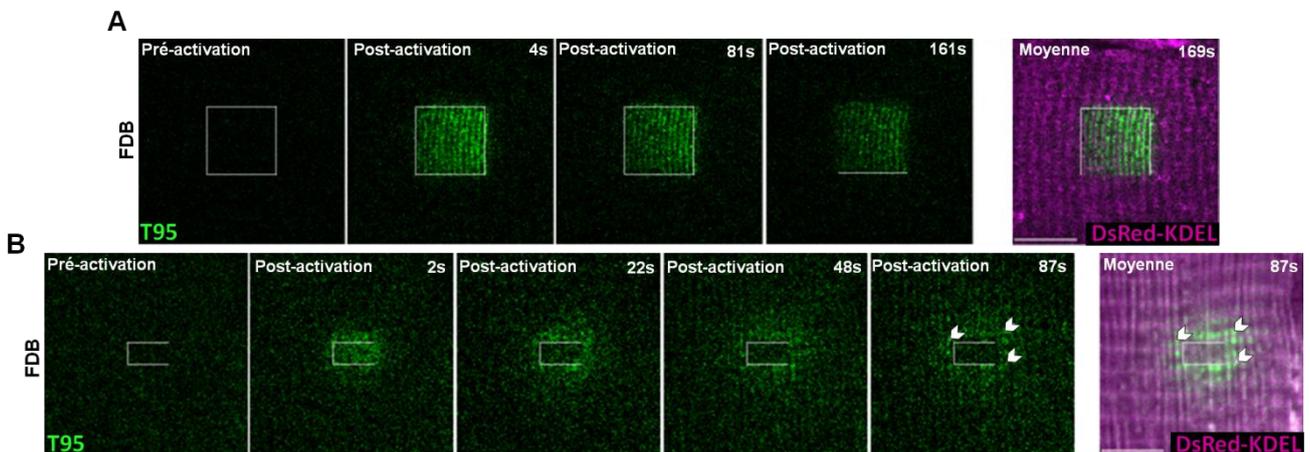


Figure R36 : T95 est dynamique dans une fibre musculaire adulte. (A) Simple activation de fibre musculaire adulte (FDB) co-transduits avec T95-PAGFP et DsRed-KDEL (marqueur luminal, magenta). L'activation est réalisée dans le cadre blanc (ROI) et la fluorescence est suivie pendant 169s. Une image pré-activation et 3 images post-activation (4, 81 et 161s) sont montrées. **(B)** Itérations sur les FDB co-exprimant T95-PAGFP avec DsRed-KDEL (marqueur luminal, magenta). Une image pré-activation et quatre images post-activation (2, 22, 48 et 87s) d'un film de 87s sont montrées. Les panneaux de droite présentent des projections de l'intensité moyenne de chaque image après photoactivation, avec le marqueur DsRed-KDEL (magenta). Barre d'échelle = 5 μm. Les têtes de flèches indiquent des clusters de T95 détectés en dehors du ROI d'activation et s'organisant de part et d'autre des striations de DsRed-KDEL.

III. Rétention de la triadine à la triade

1) Le RyR n'est pas impliqué dans la dynamique de T95 au début de la différenciation

Nous avons voulu savoir ce qui permettait à la triadine de rester à la triade une fois ce compartiment atteint. Nous avons vu précédemment que la partie luminale C-terminale de T95 jouerait un rôle dans sa diffusion à 3 jours de différenciation puisque le mutant T95 Δ Cter se comportait comme Sec61 β . De plus, la partie C-terminale de la triadine est impliquée dans son oligomérisation et dans sa liaison aux autres protéines du CRC (Froemming et al., 1999; Knudson et al., 1993; Kobayashi et al., 2000; J. M. Lee et al., 2004) et elle pourrait jouer un rôle dans sa rétention à la triade (Fourest-Lieuvain et al., 2012; Rossi et al., 2014).

Nous avons testé si l'interaction T95/RyR1 via le domaine KEKE dans la partie C-terminal de la triadine avait un rôle dans sa localisation. En effet, RyR1, canal calcique massif du CRC, peut être envisagé comme protéine permettant l'ancrage à la triade des autres protéines du CRC.

Dans ce but-là, nous avons exprimé T95-PAGFP, T95 Δ Cter-PAGFP et Sec61 β dans des cellules *RYR1* KO. Tout d'abord nous avons vérifié la localisation des protéines dans ces cellules. Les immunomarquages réalisées à DIF3 montrent que les marquages de T95, T95 Δ Cter et Sec61 β sont comme attendu c'est-à-dire que T95 présente des clusters éparpillés dans toute la cellule, qui colocalisent avec ceux du DHPR ; le mutant T95 Δ Cter présente un marquage diffus avec quelques clusters qui colocalisent également avec DHPR, tandis que Sec61 β est présent sous la forme d'un marquage diffus ne colocalisant pas avec le DHPR (Figure R37A).

Une fois ces immunomarquages réalisées et la localisation des protéines confirmées à DIF3, la dynamique de T95-PAGFP a donc été testée dans des cellules *RYR1* KO et des cellules WT (servant de cellules contrôles) puis comparée avec la dynamique de T95 Δ Cter-PAGFP et Sec61 β -PAGFP dans ces mêmes cellules. Des expériences de simple activation ont été effectuées et ont permis d'extraire les $t_{1/2}$ de chaque protéine (Figure R37B). Ces expériences nous permettent d'observer que les $t_{1/2}$ sont

similaires entre les cellules WT et *RYR1* KO pour chacune des protéines, à DIF3. Ainsi T95-PAGFP, Sec61 β -PAGFP et T95 Δ Cter-PAGFP diffusent de la même façon dans des cellules ne contenant pas de RyR1.

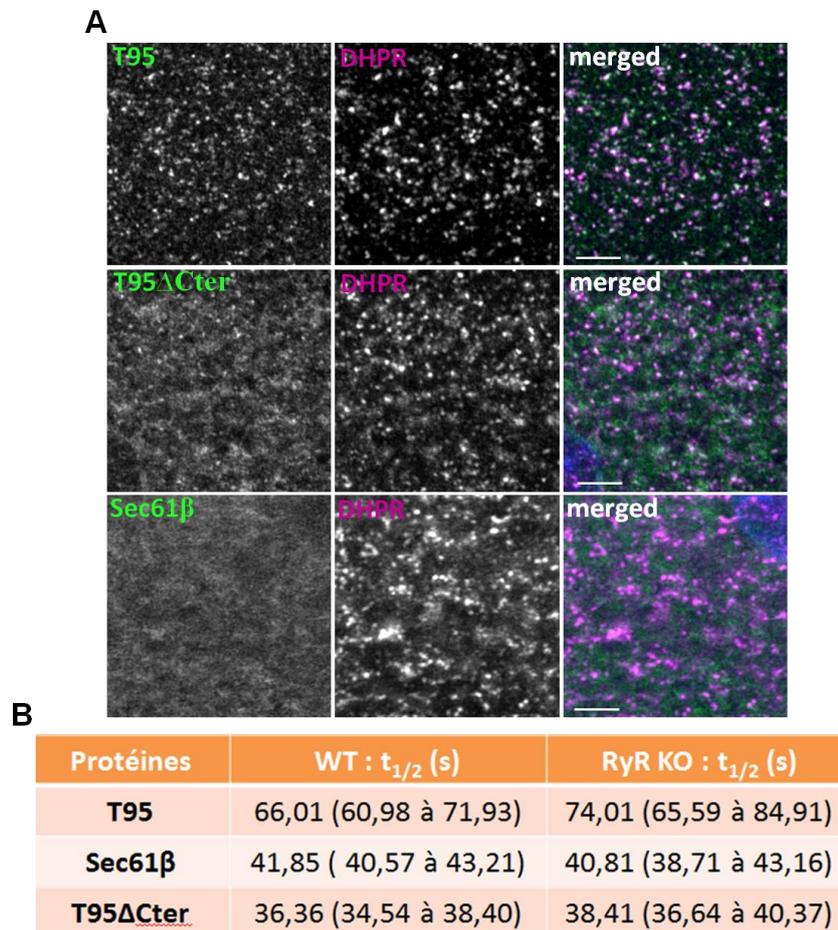


Figure R37 : L'absence de RyR1 n'affecte pas la diffusion de la triadine ni sa localisation à la triade au début de la différenciation musculaire. (A) Myotubes *RYR1* KO à DIF3 transduits avec T95-PAGFP ou Sec61 β -PAGFP ou T95 Δ Cter-PAGFP et immunomarqués avec un anti-GFP (vert) et un anti-DHPR (magenta). Barres d'échelle = 5 μ m. **(B)** Valeurs des $t_{1/2}$ (en s) de T95, Sec61 β et T95 Δ Cter à DIF3 dans des cellules WT ou *RYR1* KO. Les valeurs représentent les moyennes (i.c.) pour n = 32 à 37 cellules analysées de 4 expériences indépendantes

L'absence de RyR1 à DIF3 n'affecte ni la localisation à la triade ni la diffusion de la triadine. L'interaction de la triadine avec RyR1 par la partie C-terminale de la triadine ne serait donc pas un élément important pour la rétention de la triadine à la triade à DIF3.

Précédemment nous avons vu qu'à DIF9, le mutant T95 Δ Cter se comporte comme T95 et est organisé en doubles rangées de points, donc un mécanisme plus tardif semble avoir lieu et permettrait la rétention de T95 Δ Cter à la triade. De plus, la

triadine peut également interagir avec RyR1 par son domaine cytoplasmique N-terminal (Groh et al., 1999). Il aurait donc été intéressant de pouvoir refaire ces expériences sur les cellules *RYR1* KO à DIF9. Cependant, les cellules *RYR1* KO à DIF9 n'atteignent pas un état de différenciation mature comme attendu à DIF9. De plus, peu de cellules étaient encore présentes à ce stade. Il se peut qu'elles soient en train de mourir sans la présence de ce canal calcique, nous n'avons donc pas pu vérifier notre hypothèse.

2) Le domaine transmembranaire de la triadine est nécessaire pour sa bonne localisation à la triade

Au vu de la capacité de T95 Δ Cter de se localiser à la triade dans des myotubes matures, nous nous sommes demandés si le domaine N-terminal ou transmembranaire (TM) de ce mutant étaient importants pour son ancrage.

Nous avons donc créé des hybrides, en échangeant les domaines N-terminaux et TM de T95 Δ Cter et Sec61 β , couplés à une PAGFP (Figure R38A):

- Sec61^{N-T95} : contient le N-terminal de la triadine et les TM et C-terminal de Sec61 β
- Sec61^{TM-T95} : contient les domaines N et C-terminaux de Sec61 β et le domaine TM de la triadine
- T95 Δ Cter^{TM-Sec61} : contient les domaines N et C-terminaux de T95 Δ Cter ainsi que le domaine TM de Sec61 β .

Nous avons vérifié la bonne expression de ces différents hybrides par Western blot, une fois transduits dans des cellules *TRDN* KO. Les protéines contenues dans les lysats cellulaires ont été analysés en Western blot avec un anticorps anti-GFP. Les résultats ont permis de détecter des bandes autour de 37-40 kDa (Figure R38B) : celles correspondant à T95ΔCter, Sec61^{TM-T95} et T95ΔCter^{TM-Sec61} sont aux tailles attendues. Par contre Sec61^{N-T95} présente deux bandes, l'une à 40 kDa et l'autre à 25 kDa (Figure R38B flèches jaune et verte). Or, la protéine devrait migrer vers 35 kDa ce qui ne correspond pas au profil observé. De plus, T95ΔCter^{TM-Sec61} et Sec61^{N-T95} semblent présents en des quantités moins importantes que T95ΔCter et Sec61^{TM-T95}.

Un deuxième Western blot a été réalisé avec un anticorps anti domaine N-terminal de la triadine (Figure R38C). Tout d'abord une bande non spécifique apparaît avec cet anticorps pour toutes les protéines testées (flèche bleue). Ensuite et comme attendu cet anticorps reconnaît bien T95ΔCter et T95ΔCter^{TM-Sec61} qui contiennent la partie N-terminale de la triadine et ne reconnaît pas Sec61^{TM-T95} qui contient le N-terminal de Sec61β. Concernant Sec61^{N-T95} une seule bande est apparue autour de 40 kDa (Figure R38C, flèche jaune). Cette bande représente donc bien notre hybride, même s'il est présent en faible quantité et à un poids moléculaire supérieur à ce qu'on attendait (40kDa au lieu de 35kDa). La bande à 25 kDa (flèche verte) détecté dans le Western blot précédant n'est pas observée avec l'anticorps anti-N-terminal de la triadine, suggérant que cette bande représente surement une PAGFP seule. Pour une raison dont nous ne connaissons la cause, l'hybride Sec61^{N-T95} est présent dans les cellules sous la forme d'une PAGFP seule en plus de l'hybride en tant que tel.

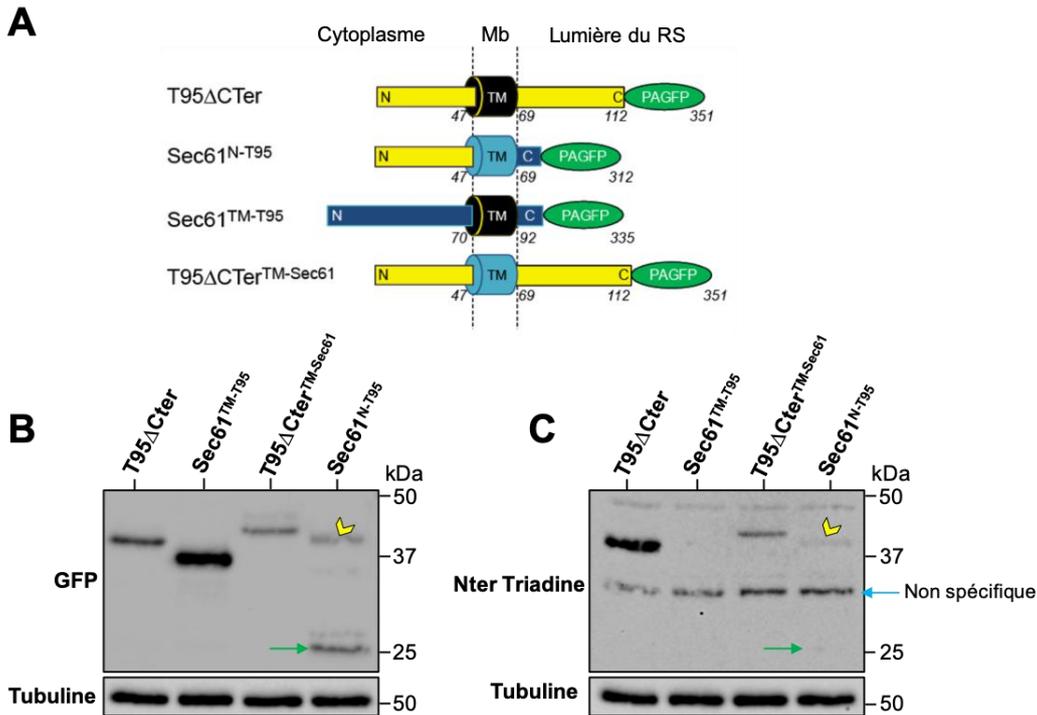


Figure R38 : Les différents mutant et hybrides utilisés. (A) Schéma représentant T95ΔCter-PAGFP, Sec61^{N-T95}-PAGFP, Sec61^{TM-T95}-PAGFP et T95ΔCter^{TM-Sec61}-PAGFP avec leurs domaines N-terminaux (N), C-terminaux (C) et transmembranaires (TM) ainsi que la localisation de chaque domaine vis-à-vis de la membrane du RS (Cytoplasme, Membrane (Mb) et Lumière du RS). Les chiffres noirs indiquent le nombre d'acides aminés de la protéine. (B) Western blots réalisés avec un anticorps anti-GFP sur 10 μg de lysats cellulaires TRDN KO transduits avec T95ΔCter-PAGFP ou Sec61^{N-T95}-PAGFP ou Sec61^{TM-T95}-PAGFP ou T95ΔCter^{TM-Sec61}-PAGFP. L'anti-GFP détecte des bandes autour de 40 kDa pour T95ΔCter et T95ΔCter^{TM-Sec61}, à 37 kDa pour Sec61^{TM-T95} ainsi que deux bandes à 40 kDa (flèche jaune) et 25 kDa (flèche verte) pour Sec61^{N-T95}. (C) Western blots réalisés avec un anticorps anti-N-terminal de la triadine sur 10 μg de lysats cellulaires TRDN KO transduits avec T95ΔCter -PAGFP ou Sec61^{N-T95}-PAGFP ou Sec61^{TM-T95}-PAGFP ou T95ΔCter^{TM-Sec61}-PAGFP. L'anticorps détecte seulement des bandes pour T95ΔCter, Sec61^{N-T95} et T95ΔCter^{TM-Sec61}. Une seule bande à 40 kDa (flèche jaune) est détectée pour Sec61^{N-T95} alors que la bande à 25 kDa (flèche verte) a disparu, indiquant qu'elle ne contient pas la partie N-terminale de la triadine. Des bandes non spécifiques (flèche bleue) sont également détectées avec cet anticorps. La β-tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

La localisation de ces hybrides a également été étudiée à DIF9 grâce à des immunomarquages afin de pouvoir comparer leurs localisations à celle de T95ΔCter, étant donné qu'à ce stade T95ΔCter se localise à la triade.

La colocalisation de T95ΔCter avec RyR1 a été quantifiée, elle atteint 80% de la colocalisation T95/RyR1, illustrant que T95ΔCter à DIF9 est bien localisée à la triade. En comparaison la colocalisation de Sec61β avec RyR1 atteint la valeur de 55% de la colocalisation T95/RyR1. Cette valeur bien qu'élevée est due au marquage diffus de Sec61β dans les cellules (Figure R39).

Concernant les hybrides, Sec61^{N-T95} montre un marquage diffus ne colocalisant pas avec RyR1 et présentant donc un pourcentage de colocalisation avec RyR1 similaire à celui de Sec61 β . T95 Δ Cter^{TM-Sec61} s'accumule dans de petits clusters différents de ceux de RyR1. Son pourcentage de colocalisation est lui aussi similaire à celui de Sec61 β . Sec61^{TM-T95} forme des doubles rangées de points qui colocalisent avec RyR1, à hauteur de 75% de la colocalisation T95/RyR1 et de façon similaire à la colocalisation de T95 Δ Cter avec RyR1 (Figure R39).

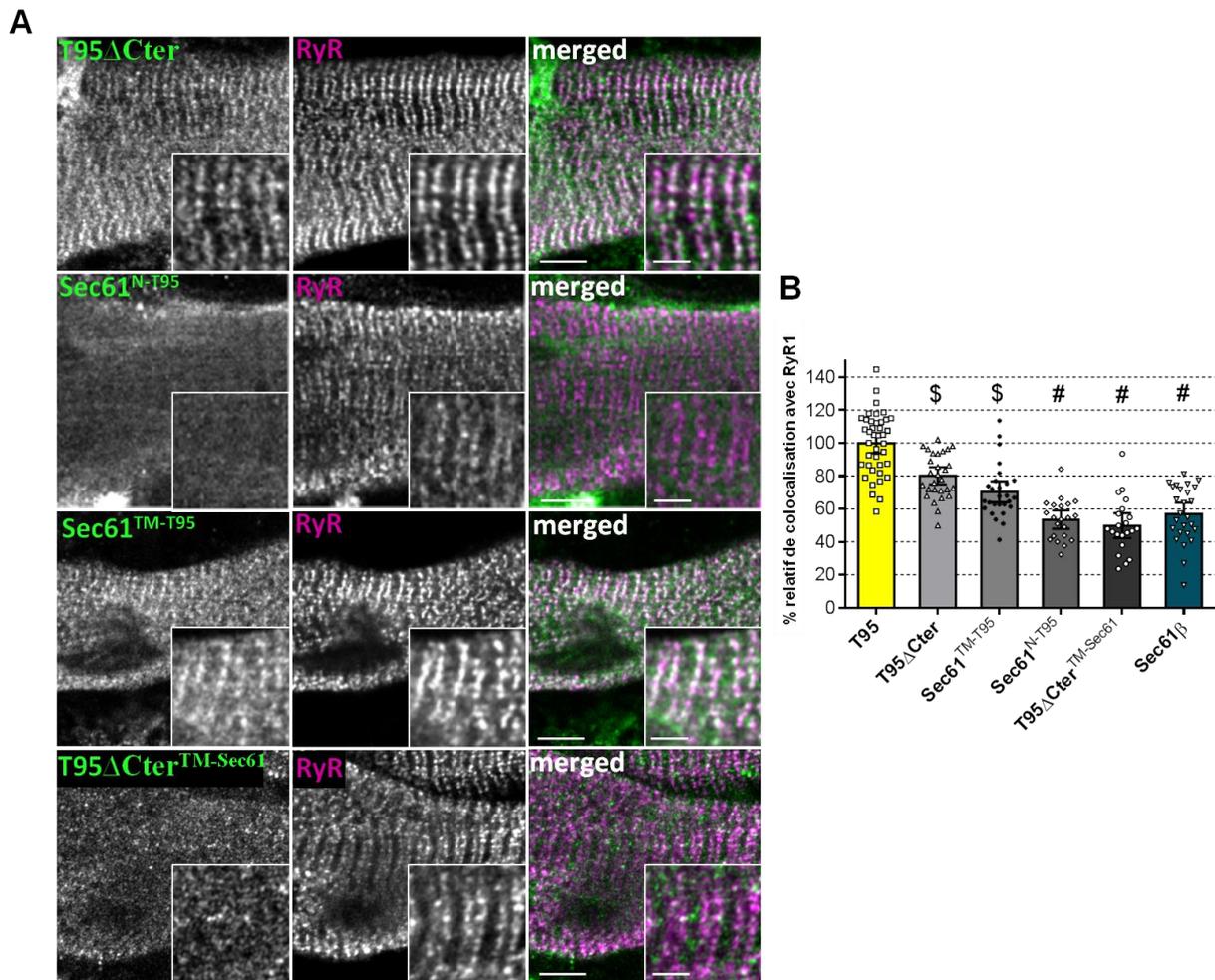


Figure R39 : Le domaine transmembranaire de la triadine est nécessaire pour sa localisation à la triade. (A) Myotubes à DIF9 transduits avec T95 Δ Cter-PAGFP, Sec61^{N-T95}-PAGFP, Sec61^{TM-T95}-PAGFP et T95 Δ Cter^{TM-Sec61}-PAGFP et immunomarkés avec un anti-GFP (vert) et un anti-RyR1 (magenta). Barres d'échelle = 5 μ m et 2 μ m pour les zooms. **(B)** Pourcentage de colocalisation de chaque construction PAGFP avec RyR1 et normalisé au pourcentage de colocalisation de T95 avec RyR1 à DIF9. Les valeurs représentent les moyennes \pm i.c. n = 21 à 40 cellules analysées de 2 à 4 expériences indépendantes. One-way ANOVA : \$ = comparaison avec Sec61 β : T95 Δ Cter (p<0,0001) et Sec61^{TM-T95} (p<0,05) ; # comparaison avec T95 Δ Cter (p<0,0001).

Les Western blot ont permis de nous rendre compte que l'hybride Sec61^{N-T95} semble s'exprimer dans les cellules en culture sous la forme d'une GFP seule en plus de l'expression spécifique de l'hybride. De plus, les immunomarquages montrent que l'hybride est présent sous forme diffuse dans toute la cellule. Ce résultat mêlant localisation de la GFP en plus de celle de l'hybride rend la conclusion dure à tirer quant au rôle de la partie N-terminale de la triadine sur son ancrage à la triade. Néanmoins, aucune accumulation particulière à la triade n'est observée avec cet hybride, laissant supposer que la partie N-terminale de la triadine n'aurait pas un rôle primordial sur sa localisation à la triade.

D'autre part, T95 Δ Cter^{TM-Sec61} ne se localise pas à la triade alors que l'hybride Sec61^{TM-T95} présente un marquage triadique spécifique en doubles rangées de points, illustrant le fait que le domaine TM de la triadine est nécessaire à sa localisation à la triade.

IV. Conclusions partie 2

Dans la partie 1 des résultats, nous avons observé qu'au tout début de la différenciation cellulaire, les clusters mobiles de triadine seraient des vésicules de transport empruntant une voie muscle spécifique. Ce résultat suggère qu'une synthèse plus accrue des protéines du CRC comme la triadine aurait lieu dans des stades précoces de différenciation. Grâce à la photoactivation et au suivi de protéines fluorescentes, nous avons ensuite observé, dans cette partie 2, les mécanismes d'adressage et de rétention de la triadine dans des stades plus avancés de la différenciation musculaire.

Nous avons montré que la triadine est toujours dynamique quel que soit le stade de différenciation cellulaire et cela même dans une fibre musculaire adulte. Elle diffuserait dans les membranes du RS avant de s'accumuler et d'être retenue aux triades. Sa diffusion est plus lente que celle de protéines contrôles du reticulum, membranaire ou luminale telles que Sec61 β et KDEL, ce qui signifie qu'un mécanisme de rétention existerait.

Observer le comportement d'un mutant de la triadine délété de la majorité de sa partie C-terminale et donc de ses domaines fonctionnels, nous a permis de montré

que (1) la partie C-terminale de la triadine est importante pour sa dynamique au début de la différenciation, parce que sans elle, la triadine se comporte comme Sec61 β , et (2) un autre mécanisme interviendrait plus tardivement au sein de myotubes matures.

L'utilisation de cellules *RyR1* KO, nous a permis de montrer que RyR1 ne servirait pas d'ancre à la triadine à un stade précoce de la différenciation (DIF3). De plus, la création d'hybrides contenant des échanges des domaines N-terminaux et transmembranaires entre la triadine et Sec61 β , nous a permis de comprendre que c'est le domaine transmembranaire de la triadine qui lui confère sa rétention à la triade dans des cellules matures (Figure R40).

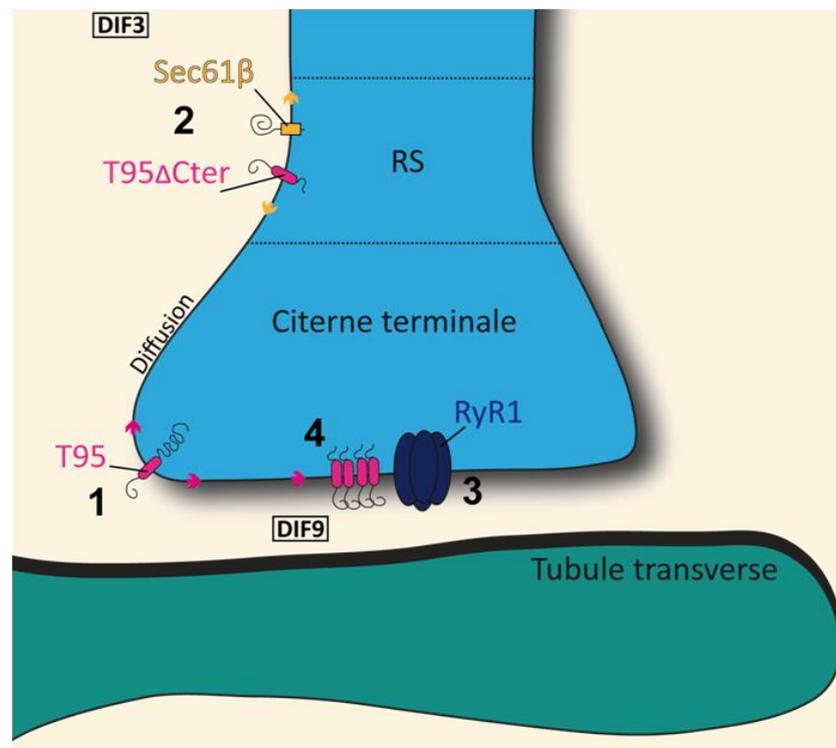


Figure R40 : Adressage et rétention de la triadine au cours de la différenciation. (1) T95 diffuse constamment dans les membranes du RS avant de s'accumuler à la triade. (2) Sans sa partie C-terminale luminale, le mutant T95 Δ Cter se comporte comme Sec61 β , une protéine contrôle transmembranaire du réticulum, à DIF3. (3) RyR1 ne sert pas d'ancre à la triadine à DIF3 mais (4) le domaine transmembranaire de la triadine lui est nécessaire pour être localisée à la triade à DIF9. RS = réticulum sarcoplasmique

Tous ces résultats suggèrent que la triadine aurait un double comportement, transport vésiculaire et diffusion présents simultanément dans une cellule musculaire mais avec un ratio différent en fonction du stade de différenciation de la cellule.

Partie 3 : Le rôle de la protéine MAP6 dans la fonction musculaire

Au cours de ma thèse j'ai participé à une étude portant sur l'implication d'une protéine associée aux microtubules (MAP6) sur la fonction musculaire. Cette étude a donné lieu à un article publié en 2018 « *Deletion of the microtubule-associated protein 6 (MAP6) results in skeletal muscle dysfunction* ; Sebastien et al., *Skeletal muscle* 8:30 » et inséré en fin de manuscrit.

Les fibres musculaires sont des cellules hautement différenciées à la base d'une contraction musculaire efficace. La triade et les protéines du complexe du relâchement du calcium (CRC) s'y localisant, permettent de traduire le message nerveux en une libération massive de calcium entraînant la contraction. Le cytosquelette de microtubules ainsi que certaines MAPs associées permettent aux fibres musculaires de pleinement remplir leurs fonctions et sont notamment impliqués dans la différenciation des myoblastes ainsi que dans le positionnement nucléaire (Cadot et al., 2012; Metzger et al., 2012; Mogessie et al., 2015; Straube and Merdes, 2007; Zhang et al., 2009). De plus, la triade a été montrée comme reliée aux microtubules grâce à l'interaction entre la triadine et Climp63 (Osseni et al., 2016). Ces données suggèrent que les microtubules pourraient jouer un rôle dans les libérations de calcium nécessaire à la contraction musculaire.

Concernant les MAPs, MAP6 a été montré comme majoritairement exprimée dans le cerveau mais est également retrouvée dans d'autres tissus comme les muscles squelettiques et cardiaques (Aguezoul et al., 2003; Denarier et al., 1998b; Guerrero et al., 2010) (cf. Introduction Chapitre 3 I.4.b). Cependant les fonctions de MAP6 autre que neuronale n'ont jamais été étudiées.

Durant cette étude, nous avons montré que MAP6 n'est pas présente seulement dans le cerveau mais également dans le muscle squelettique. Sa délétion dans des souris MAP6 KO résulte en une faiblesse musculaire se traduisant au niveau moléculaire par une réduction des libérations calciques, une désorganisation du RS ainsi qu'une altération du cytosquelette de microtubules. Au sein de ce travail j'ai réalisé les analyses de RT-PCR et de 5' RACE permettant de montrer la présence des transcrits de MAP6 dans les muscles squelettiques et j'ai également pris part à la réalisation des immunomarquages sur les fibres adultes de FDB de souris MAP6 KO et WT.

Discussions et perspectives

Mon projet de thèse a visé à comprendre les mécanismes d'adressage et de rétention de la triadine aux triades au sein des muscles squelettiques. En effet les protéines du complexe de relâchement du calcium (CRC), dont fait partie la triadine, sont uniquement localisées à la triade et spécifiquement organisées dans deux membranes différentes, les membranes du reticulum sarcoplasmique (RS) et du tubule-t. Même s'il est maintenant admis que les protéines du CRC sont mobiles au sein du muscle squelettique, leurs mécanismes de transport (diffusion dans le continuum de membranes réticulaires ou trafic vésiculaire) et de rétention (propriétés intrinsèques, interactions diverses, composition lipidique etc) sont encore controversés. La problématique majeure de mon travail a été de comprendre comment la triadine va de son lieu de son synthèse vers la triade et par quels mécanismes y est-elle retenue ?

I. Au début de la différenciation musculaire, les clusters de triadine emprunteraient une voie muscle spécifique

1) Que représente les clusters de triadine : pré-triade et/ou vésicules ?

Pour comprendre le trafic de la triadine au cours de la différenciation musculaire, nous avons exprimé des chimères fluorescentes de triadine (T95) dans des cellules *TRDN* KO. Les expériences de vidéomicroscopie ont permis d'observer que la triadine, présente sous forme de clusters dès le début de la différenciation, était mobile. Cette fraction mobile est plus importante au début de la différenciation avec environ 15% de clusters mobiles, puis elle chute à 5% à 3 jours de différenciation avant d'atteindre une valeur nulle dans des myotubes matures dans lesquels les clusters de triadine ont acquis leur organisation précise et finale en doubles rangées de points, organisation typique de protéines de la triade (Cusimano et al., 2009; Flucher et al., 1993; Takekura et al., 2001).

A partir de ces observations la question principale que nous nous sommes posée était de comprendre ce qu'étaient ces clusters et comment ils se déplaçaient dans les cellules pour atteindre leur localisation finale. Nous avons supposé que ces clusters pouvaient représenter des vésicules contenant de la triadine agrégée et/ou le compartiment triadique entier (citernes terminales du RS accolées à un tubule-t) ou seulement du RS non encore associé à un tubule-t.

Afin de caractériser les clusters de triadine, nous avons pu observer, par combinaison de techniques d'immunomarquages et de suivi direct du trafic des protéines sur cellules vivantes, que dès le début de la différenciation (1) les clusters de triadine colocalisent déjà en partie avec d'autres protéines du CRC ou partenaires de la triade comme RyR1, DHPR, calséquestrine et Climp63, (2) les clusters mobiles de triadine contiennent à la fois T95 et DHPR α 1s.

Néanmoins nous ne savons pas dans quelle mesure les clusters mobiles de triadine sont également ceux qui colocalisent avec les autres protéines du CRC. C'est pourquoi nous avons voulu exprimer RyR1 et DHPR, deux canaux calciques majeurs du CRC, en parallèle de T95 dans nos cultures cellulaires. Nous voulions savoir si RyR1, c'est à dire une protéine localisée dans les membranes du RS jonctionnel comme la triadine, se comportait comme cette dernière. Néanmoins, RyR1, tout comme DHPR, est trop massif pour pouvoir être exprimé en entier dans des lentivirus. C'est pourquoi l'utilisation des 6 domaines transmembranaires (TM) de RyR1 nous a paru être un bon compromis. De plus, il a été montré que les domaines TM de RyR1 notamment le 1 et le 6 sont nécessaires pour sa rétention au sein du reticulum (Meur et al., 2007). RyR1 délété de ces domaines TM ne se localise à la triade que si la sous-unité α 1s du DHPR est présente (Polster et al., 2018). Ainsi, les domaines TM semblent importants pour la rétention dans le RS mais l'interaction RyR1-DHPR par la partie cytosolique de RyR1 est également primordiale pour sa localisation. Dans les cellules en culture, l'expression des 6 domaines TM de RyR1 ne nous a pas permis de retrouver le marquage attendu sous forme de clusters, mais seulement un marquage diffus réticulaire. Dans les cultures le DHPR endogène est présent, notre résultat peut donc s'expliquer par le fait que soit RyR1 endogène des cellules *TRDN* KO empêche la bonne localisation de RyR-6TM soit que les 6 domaines TM de RyR1 ne sont pas suffisants pour lui permettre d'être retenu à la triade. La partie N-terminale cytosolique de RyR1 composant la majorité de la

protéine lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines comme le DHPR, FKBP12 ou la calmoduline (Brillantes et al., 1994; Nakai et al., 1996; Tripathy et al., 1995), suggérant qu'elle peut avoir un rôle clé à jouer dans la localisation de RyR1 à la triade.

Nous nous sommes ensuite focalisés sur la sous-unité α_1s du DHPR, protéine localisée dans le tubule-t, que nous avons exprimée dans les cellules en parallèle de T95. Autant sur cellules fixées que vivantes nous avons remarqué que les clusters de T95 colocalisaient avec ceux de DHPR au cours de la différenciation et se déplaçaient également ensemble. Ce résultat suggère que ces deux protéines seraient déjà associées dès un stade précoce de différenciation, signifiant que les clusters mobiles de T95 représenteraient bien une association de protéines du CRC se déplaçant ensemble. Or, nous ne savons toujours pas si ces clusters sont un transport vésiculaire ou une triade en formation. La triadine et le DHPR sont deux protéines localisées à la triade mais dans deux membranes différentes (Brandt et al., 1990; Curtis and Catterall, 1984; Kim et al., 1990), ce qui suggère que soit les clusters représentent déjà une association d'un tubule-t contenant du DHPR et d'une citerne terminale contenant la triadine soit les clusters de triadine représentent une vésicule, ou un morceau de RS seul, contenant la triadine et le DHPR, puis ce n'est qu'après fusion de la vésicule avec le RS et/ou contact du tubule-t que le DHPR atteindrait sa membrane cible (Figure D1).

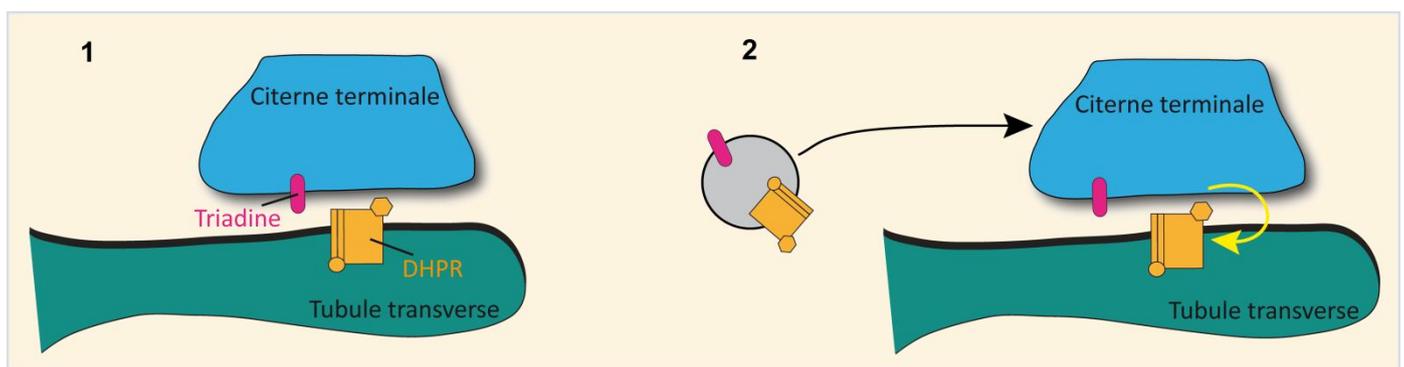


Figure D1 : Hypothèses sur le trafic des clusters de Triadine et DHPR. (1) Les clusters de triadine représentent une triade en formation dans laquelle la citerne terminale du RS contenant la triadine et le tubule-t contenant le DHPR sont associés et se déplacent pour atteindre leur destination finale à l'interface des bandes A-I. (2) Les clusters de triadine sont des vésicules en mouvement ou un morceau de RS, contenant la triadine et le DHPR puis une fois le tubule-t contacté, le DHPR irait dans son compartiment cible : la membrane du tubule-t.

Il a récemment été montré dans des fibres musculaires de poisson-zèbre que la sous-unité $\alpha 1s$ du DHPR est localisée dans les membranes du RS longitudinal et ce n'est qu'une fois la membrane du RS jonctionnel atteinte que le DHPR irait dans le tubule-t (Linsley et al., 2017). Par quel mécanisme le DHPR pourrait-il être transféré du RS jonctionnel au tubule-t ? Il existe deux formes de la sous-unité $\alpha 1s$ du DHPR, une forme entière de 212 kDa et une forme tronquée de 175 kDa, clivée entre les acides aminés 1664-1665 (Hulme et al., 2005). C'est cette dernière qui est majoritaire dans le muscle squelettique et qui joue le rôle de senseur du voltage et de canal calcique (Beam et al., 1992; Morrill and Cannon, 2000) tandis que la forme entière a été montrée comme ayant plutôt un rôle auto-inhibiteur sur le canal (Morrill and Cannon, 2000). L'hypothèse que nous pouvons envisager est donc que le clivage du DHPR lui permettrait d'être transféré du RS au tubule-t. Il serait donc intéressant de créer différents mutants du DHPR $\alpha 1s$ (forme tronquée, mutation du site de clivage) afin d'essayer de confirmer cette hypothèse d'adressage du DHPR à la membrane du tubule-t.

Ces premières étapes de caractérisation suggèrent que les clusters de triadine contiendraient des protéines du CRC déjà associées et qui se déplaceraient ensemble pour atteindre leur localisation finale. La question qui visait à comprendre si les clusters de triadine représentaient des vésicules et/ou le compartiment triadique entier a ensuite été abordée.

Nous avons tenté de marquer les tubules-t dans des myotubes en culture à un stade précoce de différenciation et d'observer comment les clusters de T95 se comportait vis-à-vis des tubules-t. A trois jours de différenciation grâce au Di-8-ANEPPS nous avons vu que les tubules-t étaient présents et majoritairement longitudinaux dans les cellules en culture. Cependant à un stade plus précoce de différenciation (16h de différenciation) nous n'avons pas trouvé de marqueurs pour observer les tubules-t. Il se pourrait qu'à ce stade les tubules-t ne soient pas encore assez développés pour être visibles. Effectivement au début du développement musculaire les tubules-t ne sont pas encore présents mais les jonctions membrane plasmique-RS sont visibles, permettant la formation de couplages périphériques entre le DHPR localisé à la

membrane plasmique et le RyR dans la membrane du RS (Franzini-Armstrong, 1991; Takekura et al., 1994b). Il est probable qu'à ce stade, nous soyons donc plutôt en présence d'une majorité de contacts membrane plasmique-RS et que les tubules-t ne seraient que peu ou pas développés. Différents éléments pourraient être testés afin de comprendre si à ce stade les tubules-t sont déjà présents, et ensuite d'observer si les clusters de triadine pourraient être associés aux tubules-t dès le début de la différenciation. Tout d'abord, il faudrait observer les myotubes à un stade précoce de différenciation avec un marquage Di-8-ANEPPS, en changeant de technique de microscopie pour pouvoir observer en même temps T95. Ensuite nous pourrions également essayer de trouver un autre marqueur potentiel des tubules-t qui pourrait être utilisé. La sonde lipophile FM4-64FX (thermofisher) pourrait être un bon outil à tester puisque qu'elle marque la membrane plasmique et est maintenue lors de la fixation.

Pour conclure sur cette partie, les observations et analyses que nous avons faites ne sont pas complètes et demandent à être étudiées plus en détails afin de comprendre ce que représentent les clusters mobiles de triadine. Que ce soit des vésicules en trafic ou des pré-triades en formation, la question reste ouverte. Les premiers résultats que nous avons obtenus ne permettent pas de nous positionner vis-à-vis des études s'opposant entre un trafic vésiculaire des protéines du CRC (Milstein et al., 2009; Nori et al., 2004) ou une diffusion dans les membranes du continuum membranaire RE/RS (Cusimano et al., 2009; McFarland et al., 2010; Rossi et al., 2008). Nous avons donc poursuivi nos analyses afin de comprendre ce que représentent les clusters mobiles de triadine et de mieux caractériser leur trafic.

2) Les clusters de triadine représenteraient un trafic vésiculaire utilisant le cytosquelette de microtubules

Dans l'optique de caractériser plus en détails les clusters de triadine, nous avons voulu comprendre comment ils se déplaçaient au cours de la différenciation pour atteindre leur destination finale. Le cytosquelette d'actine et de microtubules sont

notamment impliqués dans la différenciation des myoblastes ainsi que dans le positionnement nucléaire (Cadot et al., 2012; Falcone et al., 2014; Metzger et al., 2012). Nous avons donc voulu tester leur implication dans les mouvements des clusters mobiles de triadine. Pour cela différentes drogues ont été utilisées dans le but d'altérer le cytosquelette des cellules et d'observer les mouvements des clusters de triadine.

Dans un premier temps nous avons observé que l'altération des filaments d'actine par l'utilisation de la Latrunculine A impactait la survie cellulaire au début de la différenciation musculaire. En effet, les pré-myofibrilles ont été montrées comme sensibles à cette drogue au contraire des myofibrilles matures (Wang et al., 2005). Or, à 16h de différenciation, les myotubes qui commencent juste à se former sont encore trop immatures pour résister à une telle altération de leurs structures, ce qui expliquerait la mort cellulaire observée.

Dans un second temps, nous nous sommes concentrés sur le cytosquelette de microtubules. Du nocodazole à 10 μ M a permis de montrer que les clusters de triadine utilisent bien en majorité les microtubules pour se déplacer à 16h de différenciation. Cependant un second mécanisme pourrait également exister pour un faible nombre de clusters, étant donné que quelques mouvements sont encore observables avec la drogue. La myosine VI a, par exemple, été montré comme ayant un rôle dans la différenciation des myoblastes (Karolczak et al., 2015), il serait donc intéressant de combiner plusieurs drogues comme le nocodazole avec une drogue inhibant les mouvements dépendants de la myosine par exemple.

Le nocodazole à des concentrations nanomolaires a permis de montrer que les clusters de triadine n'utilisent pas la dynamique des microtubules par liaison des bouts (+) des microtubules pour leurs déplacements. Nous nous sommes donc concentrés sur le rôle de moteurs moléculaires, dynéines et des kinésines. Tout d'abord nous avons testé l'implication de la dynéine dans les mouvements des clusters de triadine, pour cela nous l'avons inhibée soit par l'utilisation de la ciliobrevine D soit par surexpression du domaine coiled-coil 1 de p150glued, une sous-unité de la dynactine. La surexpression de ce mutant dans des cellules en culture a été montrée comme altérant les mécanismes dépendant du complexe dynéine/dynactine et donc d'également inhiber la dynéine (Quintyne et al., 1999;

Reck-Peterson et al., 2018). Ces expériences ont montré que quel que soit la méthode utilisée pour inhiber la dynéine, la fraction mobile des clusters de triadine était impactée, suggérant que les clusters de triadine utiliseraient bien ce moteur moléculaire pour leurs mouvements. Cependant, une partie des clusters de triadine étant toujours mobiles malgré l'inhibition de la dynéine, il est donc probable que les kinésines soient également impliquées dans ces mouvements. Dans une cellule musculaire les microtubules n'ont pas d'orientation précise et définie (Oddoux et al., 2013), donc nous ne pouvons pas savoir si les moteurs moléculaires sont autant utilisés l'un que l'autre. C'est pourquoi nous avons voulu tester l'implication des kinésines, or plus de 50 kinésines existent (Endow et al., 2010) et aucune drogue permettant de toutes les inhiber n'a été trouvée. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur la kinésine Kif5b ayant notamment un rôle dans la différenciation musculaire notamment dans le mouvement des noyaux lors de la différenciation (Gache et al., 2017; Metzger et al., 2012; Wilson and Holzbaur, 2015) ainsi qu'une fonction dans la mobilité du reticulum au sein de cardiomyocytes (Vega et al., 2011). Etant donné son implication dans la différenciation musculaire il serait tout à fait possible qu'elle agisse sur les mouvements des clusters de triadine. Cependant lors de l'altération de son expression par l'utilisation de siRNA, seul le phénotype typique (accumulation des noyaux au centre de la cellule) d'une telle délétion a été observé à DIF3 mais sans altérer la dynamique des clusters de triadine. Il serait intéressant d'observer si Kif5b n'a pas d'effet sur les mouvements des clusters de triadine à un stade de différenciation plus précoce. Or, à 16h de différenciation, le siRNA n'a probablement pas eu le temps d'agir, expliquant pourquoi aucun phénotype ni aucune altération de la dynamique des clusters de triadine n'ont été observés. Il faudrait donc tenter de mettre les cellules en contact du siRNA de Kif5b plus en amont de la différenciation, pour lui permettre d'avoir plus de temps pour s'exprimer. L'utilisation d'un lentivirus contenant un siRNA contre Kif5b devrait également permettre d'avoir une expression plus précoce du siRNA.

Il pourrait également être intéressant de regarder l'implication d'autres kinésines comme Kif3b, dans les mouvements de la triadine. Effectivement il a été montré que Kif3b colocalise avec des marqueurs de la triade (RyR, DHPR et triadine) au sein de fibres musculaires adultes (Ginkel and Wordeman, 2000), témoignant d'une possible fonction dans la différenciation et la maintenance des triades.

Les clusters mobiles de T95 utiliseraient donc les moteurs moléculaires pour se déplacer sur le réseau de microtubules. Or, la dynéine et les kinésines sont connus pour être impliqués respectivement dans les mouvements antérogrades et rétrogrades de la voie précoce de biosynthèse (reticulum-Golgi) (Lippincott-Schwartz et al., 1995; Presley et al., 1997; Roghi and Allan, 1999; Tomás et al., 2010; Watson et al., 2005). Les clusters de triadine pourraient-ils représenter des vésicules empruntant cette voie de biosynthèse ?

Afin de répondre à cette question, nous avons comparé le trafic des clusters de triadine par rapport à celui de VSVG, protéine G du virus de la stomatite vésiculaire connue pour emprunter la voie classique de biosynthèse allant du reticulum à la membrane plasmique. Ces expériences nous ont permis d'observer que certains clusters de T95 se déplaçaient avec ceux de VSVG à 16h de différenciation, supposant que les deux protéines emprunteraient en partie la même voie de trafic, que nous avons caractérisé. Les immunomarquages réalisés ont montré que les clusters de T95 colocalisaient partiellement avec les marqueurs des vésicules COPII et du compartiment intermédiaire ERGIC et mais pas avec l'appareil de Golgi. Ces résultats suggèrent que les clusters de triadine sortiraient du reticulum, iraient jusqu'à l'ERGIC mais ne traverseraient pas l'appareil de Golgi.

Pour confirmer cette hypothèse nous avons essayé d'altérer la voie de biosynthèse afin de voir si le trafic des clusters de T95 en était impacté. La Brefeldine A (BFA) qui inhibe indirectement le transport des protéines du RE au Golgi, a eu l'effet escompté sur nos myotubes en culture étant donné que la structure de l'appareil de Golgi est apparue altérée. Cependant ni les clusters de T95 ni ceux de VSVG n'ont vu leurs dynamiques modifiées. Ce résultat a été inattendu principalement concernant VSVG étant donné que sa voie de biosynthèse est connue et que son trafic a déjà été montré comme impacté en présence de BFA (Doms et al., 1989). Une tentative d'explication est qu'au contraire des cellules mononuclées, dans des cellules différenciées comme les myotubes, VSVG ne serait que peu secrétée et irait dans l'ERGIC avant d'atteindre le RS. Effectivement, il a tout d'abord été montré que l'ERGIC est un compartiment résistant à la BFA, ce qui signifie qu'il est toujours présent en présence de la drogue (Lippincott-Schwartz et al., 1990) ainsi les protéines pourraient encore trafiquer par ce compartiment. Des protéines comme l'ERGIC53 ou le récepteur du KDEL, connus pour cycler entre le reticulum et

l'ERGIC, ont été observées accumulées dans des clusters d'ERGIC avec la BFA (Füllekrug et al., 1997; Lippincott-Schwartz et al., 1990; Tang et al., 1993), appuyant cette notion de compartiment résistant à la BFA. De plus, dans les myotubes une fraction de VSVG a été montrée comme n'acquérant pas de résistance à la digestion par l'endoglycosidase H, ce qui signifie qu'elle ne traverserait pas l'appareil de Golgi. Cette fraction de VSVG montrée comme colocalisant partiellement avec la calséquestrine, serait transportée du reticulum endoplasmique (RE), à l'ERGIC avant d'atteindre un compartiment n'ayant pas de fonction d'export et qui correspondrait au RS (Kaisto et al., 2002; Rahkila et al., 1998). Il se pourrait donc que les clusters de triadine suivent le même cheminement que ceux de VSVG à savoir une sortie du reticulum, un passage par l'ERGIC avant un retour au niveau du RS ce qui expliquerait nos résultats.

Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons voulu altérer la voie de biosynthèse d'une autre manière. Pour cela nous nous sommes concentrés sur les dominants négatifs d'Arf1 et Sar1, deux GTPases connues pour être impliquées respectivement dans la formation des vésicules COPI au niveau de l'ERGIC et du cis-Golgi et des vésicules COPII au niveau des sites de sortie du reticulum (ERES) (Beck et al., 2009; Nakaño and Muramatsu, 1989). Les dominants négatifs permettent donc d'altérer le transport rétrograde Golgi-RE ou l'export du RE et donc le transport antérograde. L'utilisation de ces dominants négatifs a montré que le trafic des clusters de la triadine était impacté : avec le dominant négatif de Sar1, moins de clusters de triadine étaient mobiles alors qu'avec le dominant négatif d'Arf1, la vitesse des clusters de T95 a augmenté. Ces résultats suggèrent que lorsque la dynamique des ERES est altérée par Sar1 DN, un nombre plus faible de clusters mobiles de T95 est détecté ce qui confirme l'idée selon laquelle les clusters de triadine représenteraient, au moins en partie, des vésicules de la voie de biosynthèse qui sortiraient du reticulum. Cependant le dominant négatif d'Arf1 aurait dû avoir le même effet que la BFA puisqu'ils bloquent tous deux la formation des vésicules COPI. Néanmoins l'ERGIC est résistant à la BFA donc si les transporteurs issus de ce compartiment sont bien recouverts du manteau COPI, comme certaines études le suggèrent (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006; Ben-Tekaya et al., 2005; Watson and Stephens, 2005), cela pourrait expliquer pourquoi le trafic de la triadine est impacté avec le dominant négatif d'Arf1 et pas avec la BFA. Malgré cela nous

n'avons pas d'explications pour expliquer l'augmentation de la vitesse des clusters de triadine en présence du dominant négatif.

Plusieurs éléments pourraient être intéressants à tester pour valider et étoffer nos résultats concernant la voie de biosynthèse empruntée par la triadine. Tout d'abord il se pourrait qu'au début de la différenciation musculaire quand toutes les structures ne sont pas encore pleinement organisées, VSVG suive majoritairement le même trafic que la triadine puis qu'au cours de la différenciation, une fraction de VSVG irait dans le RS comme la triadine et une fraction atteindrait le tubule-t, comme l'ont suggéré Rhakila et al., (Rahkila et al., 1998). L'observation du trafic de VSVG en présence des différentes constructions de Sar1 et Arf1 permettrait de le comparer à celui de T95. Ensuite il serait intéressant de pouvoir purifier les membranes de l'ERGIC à partir des myotubes en culture afin d'observer si la triadine est une protéine cyclant entre le reticulum et le compartiment intermédiaire. En effet, c'est ce que Breuza et al. ont fait en 2004, à partir de lignées cellulaires traitées avec de la BFA (Breuza et al., 2004), permettant aux protéines cyclant, comme l'ERGIC53, de s'accumuler dans l'ERGIC et donc de pouvoir être identifiées. De plus, l'utilisation de la protéine ERGIC53 sur cellules vivantes comme marqueur du compartiment intermédiaire, permettrait de comparer son trafic à celui des clusters de T95 et d'observer si les deux protéines ont un comportement similaire. Le système de RUSH (Retention Using Selective Hook) pourrait également être un outil intéressant à développer sur notre système de culture. Le RUSH est une technique permettant d'analyser et de visualiser le trafic intracellulaire de protéines sécrétées. En effet la protéine d'intérêt couplée à un tag fluorescent est retenue dans son compartiment donneur, le reticulum par exemple, grâce à son interaction avec une protéine résidente de ce compartiment. C'est l'ajout de biotine qui permet la libération de la protéine d'intérêt et ainsi son trafic jusqu'à son compartiment final pourra être suivi (Boncompain and Perez, 2012). Appliquée à la triadine sur les myotubes en culture, ce système permettrait de retenir la triadine dans le reticulum puis de suivre son devenir au sein de la voie de biosynthèse.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les clusters de triadine seraient des vésicules empruntant une voie de biosynthèse muscle spécifique et permettant à la triadine d'atteindre la triade au cours de la différenciation.

3) Mise en évidence d'une voie de biosynthèse spécifique du muscle

Nos premiers résultats sur le trafic des clusters de la triadine suggèrent qu'une voie de biosynthèse muscle spécifique existerait bien au sein des fibres musculaires. Néanmoins cette voie particulière demande encore à être caractérisée afin de mieux comprendre les différents compartiments impliqués dedans et le trajet que les protéines du CRC emprunteraient.

Différentes études ont montré que des protéines de surface étaient retrouvées à la membrane plasmique dans des cellules traitées avec de la BFA suggérant ainsi qu'une voie contournant l'appareil de Golgi existerait. Plus spécifiquement, une voie reliant directement le compartiment intermédiaire aux endosomes de recyclage et donc à la membrane plasmique serait présente dans les cellules (Saraste and Marie, 2018) et pourrait donc exister dans les fibres musculaires (Figure D2).

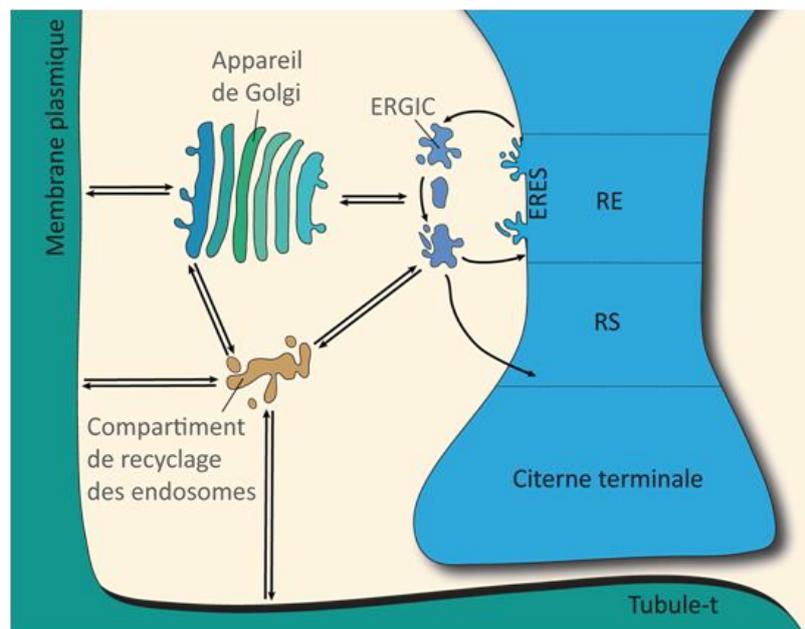


Figure D2 : La voie de biosynthèse d'une cellule musculaire. Schéma illustrant différentes hypothèses possibles sur la voie de biosynthèse d'une fibre musculaire. La voie classique de biosynthèse : RE-ERGIC-Golgi-Membrane plasmique est présente mais une autre voie contournant le Golgi pourrait également exister et faire intervenir un passage par le compartiment de recyclage des endosomes. RE = reticulum endoplasmique ; RS = reticulum sarcoplasmique ; ERES = sites de sortie du reticulum ; ERGIC = compartiment intermédiaire

Il serait donc intéressant de mieux étudier cette voie dans des fibres musculaires afin d'observer si la triadine l'emprunte. Puisque les GTPases Rab1 et Rab11 définissent

respectivement le compartiment intermédiaire et le réseau endosomale de recyclage (Saraste and Marie, 2018), nous pourrions commencer par des immunomarquages de ces Rab et comparer leur localisation avec celle de la triadine.

En plus de la triadine, l'étude du trafic d'autres protéines du CRC ou partenaires de la triade permettrait de (1) comprendre quelle voie empruntent ces différentes protéines : quittent-elles toutes le reticulum avant d'atteindre leur compartiment cible (citerne terminale, lumière du reticulum, tubule-t) ? (2) caractériser plus en détails la voie de biosynthèse des cellules musculaires et comment elle évolue au cours de la différenciation musculaire.

Comme nous l'avons vu précédemment, les clusters de triadine contiennent également la sous-unité alpha DHPR. Une voie alternative pouvant être empruntée par le DHPR est un trafic à partir des membranes du reticulum, jusqu'à l'ERGIC puis il atteindrait le tubule-t via la voie compartiment intermédiaire/réseau endosomal de recyclage, ou alors il pourrait atteindre directement la membrane plasmique et ce n'est qu'une fois la différenciation musculaire plus avancée, et donc les tubules-t plus développés, que le DHPR serait transféré dans les membranes du tubule-t. Si une protéine du tubule-t comme le DHPR emprunte cette voie, son trafic ne devrait pas être impacté par un traitement avec de la BFA, le DHPR devrait également rester sensible à la digestion par l'endoglycosidase H, illustrant qu'il ne traverse pas l'appareil de Golgi pour atteindre le tubule-t, et les clusters contenant du DHPR devraient colocaliser en partie avec des marqueurs comme l'ERGIC53 ou Rab1/Rab11.

Toujours dans le but de mieux caractériser cette voie de biosynthèse muscle spécifique, nous pourrions également suivre le trafic d'autres protéines du CRC comme la calséquestrine. Son trafic permettrait de visualiser la voie de biosynthèse de protéines localisées dans la lumière du RS des citernes terminales. Même si le trafic de la calséquestrine reste encore controversé, plusieurs études ont révélé qu'elle sort du reticulum et qu'elle atteint le RS sans traverser l'appareil de Golgi (Gatti et al., 1997; Milstein et al., 2009; Nori et al., 2004; Thomas et al., 1989), ce qui soutient nos résultats sur la triadine et de l'implication d'une voie muscle spécifique contournant le Golgi. Ainsi étudier plus en détails les comportements de différentes protéines localisées à la triade permettrait de mieux appréhender les mécanismes

sous-jacents au trafic des protéines et de préciser la voie de biosynthèse des cellules musculaires.

Une étude récente suggère que la voie de biosynthèse est nécessaire pour la mise en place de la triade et pour le bon adressage des protéines du CRC à la triade (Giudice et al., 2016). En effet, par la réexpression dans des muscles adultes d'isoformes courtes de protéines naturellement présentes au cours du développement post-natal, les auteurs ont montré une altération de l'organisation du tubule-t ainsi qu'une mauvaise localisation de RyR1 et du DHP. Les protéines réexprimées sont connues pour être impliquées dans la voie de biosynthèse : la chaîne lourde de la clathrine, Snap23, Trip10/Cip4 et Tmed2. La clathrine est le principal manteau vésiculaire impliqué dans la voie d'endocytose, Snap23 est un membre des complexes de fusion SNARE, Trip10 est un membre de la famille des protéines à domaine BAR ayant un rôle dans la déformation des membranes et le trafic vésiculaire et Tmed2 est localisée au niveau du reticulum/ERGIC/cis-Golgi où elle aurait un rôle dans la formation des vésicules COPI et COPII. Les auteurs montrent que l'expression des isoformes courtes de ces quatre protéines dans des muscles adultes altère l'adressage des protéines du CRC à la triade. Ainsi nous pouvons extrapoler que sans ces protéines la voie de biosynthèse serait altérée, entraînant des défauts dans le trafic des protéines de la triade et aboutissant ainsi à leur mauvaise localisation. Le passage par la voie de biosynthèse dont la sortie du reticulum, serait donc un élément important pour le bon adressage des protéines de la triade.

Dans ce contexte, on peut se demander pourquoi des protéines résidentes du RS sortiraient du reticulum après leur synthèse pour y revenir, en particulier si on admet que le reticulum est un continuum de membranes reliant le RE au RS et donc la citerne terminale. Les fonctions de l'ERGIC sont encore mal connues même si la majorité des études s'accorde pour le décrire comme un compartiment qui confirme le contrôle qualité effectué dans le reticulum. Il vérifierait le repliement correcte des protéines, puis les trierait suivant leur signal de rétention afin de les envoyer dans leur compartiment cible (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006; Saraste and Marie, 2018). Il pourrait être envisagé qu'après leur synthèse au sein du RE, les protéines

de la triade seraient exportées jusqu'à l'ERGIC avant d'être retournées dans le RS et/ou de poursuivre leur route jusqu'au tubule-t en ayant subi ces contrôles de qualité. Le mécanisme expliquant le retour dans le reticulum des protéines résidentes du reticulum, une fois ces dernières passées par l'ERGIC, pourrait impliquer la protéine RER1p localisée au niveau de l'ERGIC/cis-Golgi. En effet, RER1p reconnaît au niveau des domaines transmembranaires des protéines des informations d'adressage au réticulum, leur permettant d'y retourner (Sato et al., 2003, 2001, 1995). Il a également été montré qu'en l'absence de signal d'export, l'oligomérisation facilite l'assemblage des protéines membranaires dans les vésicules COPII (Borgese, 2016). Or, la triadine est une protéine pouvant se multimériser (Froemming et al., 1999) laissant penser que cette capacité lui permettrait de quitter le RE. Des expériences supplémentaires pourraient être envisagées afin de confirmer le rôle de la multimérisation de la triadine dans son trafic.

L'ensemble de ces résultats suggère que les clusters contenant la triadine seraient des vésicules empruntant une voie de biosynthèse muscle spécifique allant du reticulum à l'ERGIC, avant d'atteindre le RS et la citerne terminale. Leurs mouvements dépendant des moteurs moléculaires et donc du réseau de microtubules sont en accord avec un passage par la voie de biosynthèse. Par extrapolation, les autres protéines du CRC pourraient suivre la même voie avant que chacune atteignent son compartiment de fonction. Ces résultats ne sont pas incompatibles avec une hypothèse évoquée précédemment, à savoir le fait que certains clusters mobiles marqués par la triadine représentent des accolements de tubule-t et de citerne terminale en mouvement. En effet au cours de cette étude, nous avons remarqué deux types principaux de clusters, des gros clusters se déplaçant sur de petites distances et de petits clusters pouvant faire des mouvements sur de longues distances. Au cours des analyses nous n'avons pas séparé ces deux populations et il pourrait être intéressant par exemple de mieux caractériser la relation taille de cluster/distance parcourue. En effet, nous pouvons supposer que les petits clusters représentent les vésicules en trafic comme nous l'avons suggéré, alors que les gros clusters seraient des citernes terminales du RS (accolées ou non à un tubule-t), de plus en plus nombreuses au cours de la

différenciation musculaire et s'organisant en doubles rangées de points à l'interface des bandes A-I.

II. Diffusion et rétention de la triadine à la triade

Nous venons de voir qu'au tout début de la différenciation, les clusters de triadine seraient des vésicules qui transporteraient la triadine le long des microtubules, de son lieu de synthèse jusqu'au RS. Néanmoins dans des stades de différenciation plus avancés, lorsque les triades sont parfaitement organisées en doubles rangées de points à l'interface des bandes A-I, plus aucun mouvement de clusters de triadine n'est observable cependant les expériences de FRAP réalisées ont tout de même montré qu'une faible fraction de triadine était toujours mobile dans ces cellules matures. Notre problématique a donc été de mettre en évidence la dynamique de la triadine afin de mieux la caractériser et de comprendre comment la triadine est-elle localisée à la triade alors qu'une fraction semble toujours mobile.

1) La triadine est dynamique dans les membranes du RS

Afin de mieux comprendre la dynamique de la triadine (T95) au cours de la différenciation musculaire, nous avons comparé son comportement à celui de protéines modèles du reticulum : KDEL, un marqueur de la lumière du reticulum et Sec61 β , une protéine transmembranaire du reticulum mais non localisée à la triade puis nous avons suivi et comparé leurs dynamiques grâce à l'utilisation de la photoactivation.

Le premier protocole utilisé, la simple activation, nous a permis de révéler la dynamique des protéines photoactivables (PAGFP) par observation direct des mouvements des protéines en dehors de la région d'activation (ROI) et par la décroissance de fluorescence dans le ROI. Ces expériences ont montré que (1) T95 présentait le marquage attendu, à savoir clusters éparpillés au un stade précoce de différenciation (DIF3) ou en doubles rangées de points dans des cellules matures (DIF9). (2) Aucun mouvement de fluorescence en dehors du ROI activé, n'était

observé pour T95 au contraire de Sec61 β ou KDEL et (3) un $t_{1/2}$ a pu être extrait pour chacune des protéines. Ces $t_{1/2}$ témoignent du fait que les trois protéines sont dynamiques quel que soit le stade de différenciation, mais que le $t_{1/2}$ plus élevé de T95 illustre une certaine restriction dans sa dynamique de T95 par comparaison à Sec61 β ou KDEL.

2) La triadine diffuse dans les membranes du RS avant de s'ancrer dans les triades

Etant donné que la fraction de triadine mobile est faible, cela pourrait expliquer pourquoi aucun halo de fluorescence en dehors du ROI n'a été observé pour T95. C'est pourquoi le deuxième protocole de photoactivation utilisé, les itérations, nous a permis de révéler plus de fluorescence pour chaque protéine. Les résultats obtenus montrent que (1) la triadine diffuse de façon similaire à Sec61 β dans les membranes du RS mais (2) au contraire de ce dernier, la triadine s'accumule dans des clusters plus ou moins éloignés du ROI activé, clusters qui semblent être des triades. (3) De plus, dans une fibre musculaire adulte, la triadine conserve ce même comportement.

Au vu de la vitesse similaire de l'onde de fluorescence détectée pour T95 et Sec61 β mais du taux de décroissance de fluorescence plus élevé pour T95, on peut supposer que T95 a subi une restriction dans son mouvement qui n'est pas appliquée à Sec61 β . Cette restriction s'illustre par l'accumulation de la fluorescence de T95 dans des clusters plus ou moins éloignés du ROI et ayant une localisation typique pour des triades (éparpillés dans la cellule à DIF3 et en doubles rangées de part et d'autre de la ligne Z à DIF9). Le fait que ce même phénomène soit observé dans des fibres adultes montre que la dynamique de la triadine n'est par ailleurs pas restreinte aux cellules en développement.

3) Implication des domaines de la triadine dans sa localisation à la triade

Un flux constant de triadine a ainsi été mis en évidence ce qui implique un mécanisme lui permettant d'être retenu au sein des triades.

Pour savoir quel mécanisme permettrait la rétention de la triadine, nous avons testé le rôle des différents domaines de la triadine ainsi que son interaction avec le massif canal calcique, RyR1. Dans un premier temps, la question qui s'est posée était de savoir si la partie luminale de la triadine pouvait être responsable de sa localisation et de sa dynamique plus lente que celle de Sec61 β . Pour cela, nous avons utilisé le mutant T95 Δ Cter délété de la majeure partie de son domaine luminal qui contient les différents domaines fonctionnels de la triadine (KEKE, Coiled-Coil et deux cystéines). Dans des myotubes immatures (DIF3) T95 Δ Cter se comporte comme Sec61 β . Cependant dans des myotubes matures (DIF9), T95 Δ Cter à la même localisation (doubles rangées de points) et la même dynamique que celles de T95. Un mécanisme propre à l'état différencié des cellules musculaires serait donc responsable du comportement de T95 Δ Cter. Plusieurs études précédentes ont mis en avant les rôles des différents domaines de la triadine dans son ancrage aux triades. Il a par exemple été suggéré que sa capacité à multimériser grâce à ces cystéines contribuerait à la formation des triades (Froemming et al., 1999; Marty, 2015) et pourrait donc permettre à la triadine de s'accumuler dans les triades une fois les membranes des citernes terminales atteintes. Néanmoins, si la multimérisation rentre en jeu dans la rétention de la triadine ça ne serait que dans des myotubes immatures car dans des myotubes matures, T95 Δ Cter, qui ne peut pas multimériser, s'accumule aux triades.

La partie luminale de la triadine contient également un domaine d'interaction avec d'autres protéines du CRC comme RyR1, la calséquestrine (Knudson et al., 1993; Kobayashi et al., 2000; J. M. Lee et al., 2004; Marty et al., 2009, 1994) ou Climp63 (Osseni et al., 2016). Dans un deuxième temps nous avons donc voulu comprendre si l'interaction de la triadine avec RyR1 par sa partie luminale, pouvait expliquer sa rétention. L'utilisation de cellules *RYR1* KO, nous a permis d'observer que ni la localisation ni la dynamique de T95 ou de T95 Δ Cter n'étaient impactées en l'absence

de RyR1 dans des myotubes immatures (DIF3). Cependant il a été montré que la triadine et RyR1 interagissent également via la partie cytosolique de la triadine (Rossi et al., 2014), il serait donc intéressant de pouvoir réaliser ces mêmes expériences dans des myotubes matures afin de voir si cette interaction est impliquée dans la rétention de la triadine. Néanmoins nous n'avons pas pu maintenir les myotubes *RYR1* KO jusqu'à un stade si avancé de différenciation.

Dans un dernier temps et étant donné la capacité du mutant T95 Δ Cter de se comporter comme T95 dans des myotubes matures, nous avons voulu comprendre si les domaines cytosolique et/ou transmembranaire de la triadine étaient impliqués dans sa localisation à la triade. La création de différents hybrides a permis d'observer que (1) remplacer le domaine cytosolique de Sec61 β par celui de la triadine ne permettait pas à l'hybride de s'accumuler à la triade, (2) remplacer le domaine transmembranaire de T95 Δ Cter par celui de Sec61 β , diminuait la localisation à la triade de l'hybride par contre (3) remplacer le domaine transmembranaire de Sec61 β par celui de T95 Δ Cter permettait à l'hybride de former des doubles rangées de points, caractéristiques d'une localisation à la triade.

Ainsi c'est le domaine transmembranaire de la triadine qui serait nécessaire pour sa localisation à la triade. Les mécanismes permettant la rétention à la triade d'une protéine par son domaine transmembranaire pourraient impliquer des interactions avec des lipides membranaires et/ou des interactions moléculaires directes avec d'autres protéines comme ce qui a récemment été décrit pour SERCA et la phospholamban (Martin et al., 2018). Cependant ces mécanismes demandent encore à être déchiffrés.

Ces différents résultats montrent que la triadine diffuse constamment dans les membranes du RS quel que soit l'état de différenciation musculaire, puis qu'elle s'accumule dans les triades dans lesquelles elle est retenue notamment grâce à son domaine transmembranaire.

III. Bilan des mécanismes de trafic de la triadine tout au long de la différenciation musculaire

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse concernant les mécanismes d'adressage et de rétention de la triadine à la triade, il peut être suggéré des mécanismes de trafic différents suivant la différenciation musculaire.

Il a récemment été suggéré que lors de la différenciation, les cellules musculaires pourraient avoir besoin d'augmenter leur efficacité de transport des différents composants, protéines... nécessaires au bon fonctionnement musculaire et/ou de mettre en place des itinéraires de transport spécifiques à activer au cours de la différenciation (Giacomello et al., 2019). Ainsi nous pourrions supposer qu'au début de la différenciation, les cellules musculaires synthétiseraient plus de protéines pour permettre aux muscles de se développer et de s'organiser convenablement, ce qui s'illustrerait entre autre par une quantité de clusters de triadine mobiles plus importantes. Ces clusters seraient les vésicules transportant la triadine dans la voie de biosynthèse. Puis au fur et à mesure de la différenciation, la synthèse protéique serait moindre, donc les clusters de triadine seraient moins abondants. La triadine de retour dans le RS atteindrait la citerne terminale par diffusion dans les membranes du RS, puis elle s'accumulerait dans des clusters de plus grosses tailles peu mobiles. Ces clusters représenteraient des pré-triades en cours d'organisation c'est-à-dire un accollement entre une citerne terminale et un tubule-t. Enfin dans un muscle mature, ces pré-triades auraient atteint leur organisation finale en doubles rangées de points à l'interface des bandes A-I des sarcomères. Une fraction de triadine serait toujours présente sous forme non agrégée et diffuserait dans les membranes du RS. Cette fraction représenterait un renouvellement constant de la triadine entre les triades. Cependant des vésicules en trafic seraient également toujours présentes dans un muscle mature mais en des quantités plus faibles ne permettant pas leur observation directe une fois que la fibre musculaire est organisée en doubles rangées de points. Ce transport vésiculaire permettrait aux muscles d'avoir un apport constant de protéines néosynthétisées. Les deux mécanismes trafic vésiculaire et diffusion pourraient donc intervenir l'un après l'autre suivant la différenciation ou alors ils pourraient co-exister dans une fibre musculaire mais dans des ratios différents suivant le stade de différenciation (Figure D3).

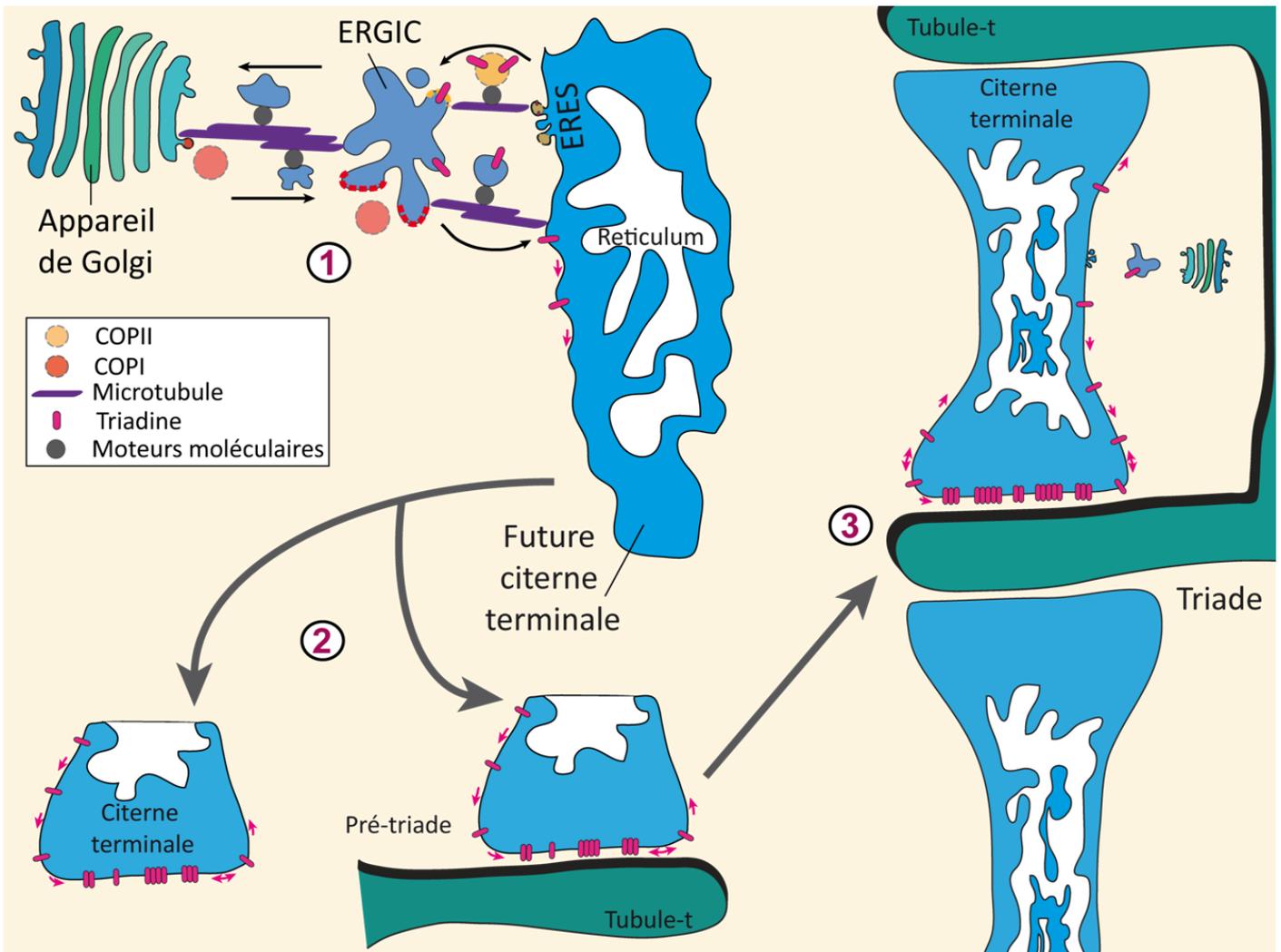


Figure D3: Le trafic de la triadine au cours de la différenciation musculaire. Schéma représentant différentes étapes dans le trafic de la triadine de sa synthèse à sa rétention à la triade dans une fibre musculaire adulte. **(1)** La triadine synthétisée dans le réticulum sortirait de ce dernier probablement dans des vésicules COPII et irait jusqu'à l'ERGIC. Puis elle serait renvoyée dans le réticulum au sein duquel elle diffuserait dans les membranes. Son transport serait possible grâce aux moteurs moléculaires se déplaçant sur le réseau de microtubules. Cette première étape serait majoritaire au tout début de la différenciation musculaire. En effet, la cellule musculaire en cours de formation aurait besoin d'une synthèse accrue de protéines afin d'aboutir à la formation et l'organisation précises de ces structures comme le réticulum. **(2)** A mesure que la cellule musculaire se développe, les sous-compartiments du réticulum comme la citerne terminale et les tubules-t sont de plus en plus développés. La cellule musculaire commence à avoir moins besoin de synthétiser des protéines. La triadine diffuse de plus en plus dans les membranes du réticulum et s'accumule dans les citernes terminales. Les pré-triades correspondent alors à des citernes terminales déjà accolées, ou non, à un tubule-t. Ces pré-triades vont continuer à s'organiser pour atteindre leur localisation finale. **(3)** La cellule musculaire mature est dorénavant composée de triades parfaitement organisées et localisées à l'interface des bandes A-I des sarcomères. La cellule musculaire a de moins en moins besoin de synthétiser des protéines du CRC étant donné qu'une partie importante de ces protéines sont déjà en place dans les triades. Ainsi à ce stade, le trafic vésiculaire est toujours présent mais en des quantités moindres. La triadine est retenue dans les triades grâce à son domaine transmembranaire. Cependant, une fraction non agrégée de la triadine est toujours présente dans un muscle adulte, cette fraction qui diffuse permettrait de constamment renouveler la triadine entre les triades. Pour plus de clarté, ce schéma ne présente que la triadine mais pourrait s'adapter aux autres protéines du CRC. ERES = sites de sortie du réticulum ; ERGIC = compartiment intermédiaire. COPI et COPII = vésicules COPI ou COPII.

Publications

PUBLICATION 1

Deletion of the microtubule-associated protein 6 (MAP6) results in skeletal muscle dysfunction

Muriel Sébastien, Benoit Giannesini, **Perrine Aubin**, Julie Brocard, Mathilde Chivet, Laura Pietrangelo, Simona Boncompagni, Christophe Bosc, Jacques Brocard, John Rendu, Sylvie Gory-Fauré, Annie Andrieux, Anne Fourest-Lieuvin, Julien Fauré, Isabelle Marty

Skeletal Muscle, 2018, 10.1186/s13395-018-0176-8

RESEARCH

Open Access



Deletion of the microtubule-associated protein 6 (MAP6) results in skeletal muscle dysfunction

Muriel Sébastien^{1,2}, Benoit Giannesini³, Perrine Aubin^{1,2}, Julie Brocard^{1,2}, Mathilde Chivet^{1,2}, Laura Pietrangelo⁴, Simona Boncompagni⁴, Christophe Bosc^{1,2}, Jacques Brocard^{1,2}, John Rendu^{1,2,5}, Sylvie Gory-Fauré^{1,2}, Annie Andrieux^{1,2,6}, Anne Fourest-Lieuvin^{1,2,6}, Julien Fauré^{1,2,5} and Isabelle Marty^{1,2,7*} 

Abstract

Background: The skeletal muscle fiber has a specific and precise intracellular organization which is at the basis of an efficient muscle contraction. Microtubules are long known to play a major role in the function and organization of many cells, but in skeletal muscle, the contribution of the microtubule cytoskeleton to the efficiency of contraction has only recently been studied. The microtubule network is dynamic and is regulated by many microtubule-associated proteins (MAPs). In the present study, the role of the MAP6 protein in skeletal muscle organization and function has been studied using the MAP6 knockout mouse line.

Methods: The presence of MAP6 transcripts and proteins was shown in mouse muscle homogenates and primary culture using RT-PCR and western blot. The *in vivo* evaluation of muscle force of MAP6 knockout (KO) mice was performed on anesthetized animals using electrostimulation coupled to mechanical measurement and multimodal magnetic resonance. The impact of MAP6 deletion on microtubule organization and intracellular structures was studied using immunofluorescent labeling and electron microscopy, and on calcium release for muscle contraction using Fluo-4 calcium imaging on cultured myotubes. Statistical analysis was performed using Student's *t* test or the Mann-Whitney test.

Results: We demonstrate the presence of MAP6 transcripts and proteins in skeletal muscle. Deletion of MAP6 results in a large number of muscle modifications: muscle weakness associated with slight muscle atrophy, alterations of microtubule network and sarcoplasmic reticulum organization, and reduction in calcium release.

Conclusion: Altogether, our results demonstrate that MAP6 is involved in skeletal muscle function. Its deletion results in alterations in skeletal muscle contraction which contribute to the global deleterious phenotype of the MAP6 KO mice. As MAP6 KO mouse line is a model for schizophrenia, our work points to a possible muscle weakness associated to some forms of schizophrenia.

Keywords: Microtubule-associated protein, Muscle contraction, Calcium release, Microtubules, Sarcoplasmic reticulum, Triad

Background

Large and highly structured cells such as muscle fibers and neurons have to face considerable challenges to maintain their shape and their different functions after maturation [1, 2]. Many of these functions are sustained by two major elements of the cytoskeleton, the actin filaments, and the microtubules. Muscle's main function is

contraction, which is the outcome of a cascade of events including nerve stimulation and intracellular calcium release, and muscle fiber structure is entirely dedicated to the optimization of contraction. Its cytoplasm is almost fully occupied by the actomyosin filaments of the sarcomeres, and the calcium release required to trigger muscle contraction is performed in specific structures of the muscle, the triads. The actin cytoskeleton was thought to be the major muscle cytoskeletal element, because actin is the main component of the sarcomeres. However, the microtubule cytoskeleton recently gained

* Correspondence: isabelle.marty@univ-grenoble-alpes.fr

¹INSERM 1216, Grenoble Institute of Neurosciences, F-38000 Grenoble, France

²University Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France

Full list of author information is available at the end of the article



much attention, as its alteration was shown to contribute to defective muscle function in the Duchenne Muscular Dystrophy [3, 4]. In muscle fibers, the microtubule network forms a dynamic orthogonal grid with longitudinal and transversal microtubule bundles, and is organized as cradles around the multiple peripheral nuclei [5, 6]. Muscle microtubules are required in myoblast fusion and differentiation [7–10], in organelle trafficking [11], and in nuclei positioning [12, 13]. Furthermore, we have recently shown that microtubules are linked to the sarcoplasmic reticulum (SR) and the calcium release complex (CRC) at the triads [14], pointing to their possible involvement in calcium release for muscle contraction.

Until now, only a few microtubule-associated proteins (MAPs) such as MAP7 or oMAP4 have been characterized as being involved in muscle differentiation and functions [8, 13]. MAP6, previously called STOP protein, has been isolated from brain preparations [15, 16] but is also present in other tissues such as the skeletal muscles and heart [17]. Several isoforms are produced from the alternative splicing of the *MAP6* gene, the major ones being MAP6-N, MAP6-F, and MAP6-E corresponding respectively to the neuronal, fibroblastic, and embryonic isoforms, with additional poorly characterized minor isoforms [18, 19]. MAP6 isoforms are known to stabilize microtubules in vitro against cold temperature, depolymerizing drugs like nocodazole, and high calcium concentrations [18, 20]. MAP6-N and MAP6-E are associated in neurons with cold-stable, drug-resistant, and long-lived microtubules [21]. MAP6-F exhibits different locations in fibroblasts depending on the temperature: at 37 °C, it has a diffuse pattern in the cytoplasm, whereas at 4 °C MAP6-F associates with and stabilizes microtubule arrays [19, 22]. In neurons, MAP6 proteins exhibit other functions than those related to microtubules. First, they are able to interact with the actin cytoskeleton [23]. Second, thanks to reversible palmitoylation at the N-terminal end, the neuronal isoforms can be targeted to different locations (plasma membrane, Golgi apparatus, and mitochondria) [24, 25], and this dynamic palmitoylation may favor neuronal polarization [26]. Finally, MAP6 exhibits a signaling function independent of microtubule binding, promoting axonal attractive guidance downstream of semaphorin 3E [27]. Hence, MAP6 proteins are now considered as scaffold proteins which can integrate multiple cellular roles ranging from cell signaling to cytoskeleton stabilization. Reflecting the multiple functions of MAP6 proteins at the cellular level, MAP6 null mice (MAP6 KO), which are devoid of all MAP6 isoforms, are viable but display severe behavioral disorders resembling schizophrenia-related symptoms [28–31]. Indeed, treatment with anti-psychotic drugs alleviates several of the behavioral and biological defects [32–34].

The diverse functions of MAP6 have until now been extensively studied in the brain but never in other differentiated tissues such as skeletal muscle. In this work, we show the presence of MAP6 isoforms in skeletal muscle, and we show that MAP6 KO mice exhibit muscle weakness together with muscle atrophy. The structure and function of the muscle fibers of MAP6 KO mice show several alterations in intracellular organization as well as in the calcium release mechanism. Altogether, our study points to the importance of MAP6 proteins in muscle function.

Methods

Antibodies

A primary antibody directed against a central repeat motif of MAP6 proteins (antibody 23N), described previously [19], was used to label all the MAP6 isoforms. The antibody against the alpha-1 subunit of dihydropyridine receptor (DHPR) was from Abcam (#Ab2862), the antibodies against β -tubulin (TUB2.1, #T5201) and alpha-actinin (A-7811) were from Sigma, and the antibody against Golgi apparatus was from Santa Cruz (FL-145). Antibodies against RyR1, triadin T95, tyrosinated tubulin (YL1/2), and detyrosinated tubulin were previously described [35–37]. The antibody against SERCA was kindly provided by Dr. M.-J. Moutin [38].

Animals

MAP6 KO mice were developed by insertion of LacZ gene instead of the exon 1 of *MAP6* gene leading to the extinction of all MAP6 protein isoforms as described before [28]. The MAP6 KO and wildtype (WT) littermate mice on homogeneous background C57BL6/129svPas-F1 were obtained by crossing heterozygote animals (MAP6 pure heterozygote 129svPas male or female with MAP6 pure heterozygote C57BL6 male or female mice). Mice from 3 to 10 months old were considered as adults. Mice breeding was performed in compliance with the French legislation and European Union Directive of 22 September 2010 (2010/63/UE). All procedures using animals were approved by the Institutional ethics committee (C2EA-04) and followed the guidelines of the National Research Council Guide for the care and use of laboratory animals.

Western blot analysis

Muscle (quadriceps) or brain homogenates were prepared as described previously from frozen tissues [14]. The presence and the amount of different proteins in tissue homogenates was assayed by Western blot analysis, using a chemiluminescent reagent after electrophoretic separation of the protein on a 5–15% acrylamide gel, and electrotransfer on Immobilon P (Millipore) [39]. The quantification was performed using a ChemiDoc Touch apparatus (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and the ImageLab

Software (Biorad). The signal was normalized to the amount of a muscle-specific protein of low abundance (triadin T95) or GAPDH.

Histological staining

Tibialis anterior was collected immediately after euthanasia, flash-frozen in liquid nitrogen, and embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue Tek, Sakura). Transversal cryosections (10 μ m) were processed for hematoxylin and eosin (H/E) and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) staining. Images were acquired using Axioscan Z.1 (Zeiss) and cross-sectional area (CSA) and analysis was performed using ImageJ software. CSA fibers from three different animals were analyzed for each genotype (WT CTR: 412 fibers, KO MAP6: 459 fibers), and the values are presented as mean \pm SEM.

Cell culture

Primary muscle cultures were prepared from hind limbs of newborn WT and MAP6 KO mice, as described previously [40], and expanded in proliferation medium Ham's F-10 (Life technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 20% FBS (Life technologies, Saint Aubin, France), 2% Ultrosor G (Pall Biosepra, St Germain en Laye, France), and 2% Penicillin-Streptomycin (Life technologies, Saint Aubin, France). C2C12 (ATCC ref. CRL-1772) were amplified in DMEM (Life technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life technologies) and 1% penicillin-streptomycin (Life technologies). Differentiation into myotubes was induced by a shift to differentiation medium: DMEM 1 g/L (Life technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 2% Heat Inactivated Horse Serum (Life technologies) and 1% Penicillin-Streptomycin.

Calcium imaging

Primary muscle cells from WT and MAP6 KO were seeded on laminin-coated culture dishes. After 3 days of differentiation, changes in intracellular calcium were measured on WT or KO myotubes, using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo4 direct (Thermo Fisher Scientific). Stimulations were performed in Krebs buffer (136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH = 7.4) with 500 μ M 4-Chloro-m-cresol (4CmC) or 140 mM KCl, and fluorescent variations were recorded on a Leica SPE confocal microscope and analyzed as described previously [39].

RNA extraction and RT-PCR

Brains and muscles from WT mice were collected and frozen in liquid nitrogen. Tissues or C2C12 myotubes were homogenized in Trizol (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer procedure, and mRNA was

purified on Purelink RNA columns (Life technologies). After reverse transcription using oligo-dT primer, PCR amplification was performed with Phusion master Mix (Thermo Scientific) using the following procedure: after an initial denaturation of 1 min at 98 °C, 30 cycles of PCR amplification (10 s at 98 °C, 30 s at 69 °C, 15 s at 72 °C) were performed, using the following primers for the amplification of the different MAP6 exons, designed in non-repeated sequences of the four exons of MAP6: exon 1 forward (5'-GAGGAGGTGGCGAGTACAGT-3'), exon 2 forward (5'-CCCCAGATGACAAGATGGTT-3'), exon 3 reverse (5'-TTCGCCTCAGCCAGTTTATT-3'), exon 4 reverse (5'-GATGCATCACTGGTGGGTTT-3').

RT-q-PCR

RNA extracted was reverse transcribed using the iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Gene expression was measured by RT-qPCR using the SsoAdvanced Universal Sybr green supermix (Bio-Rad) and the C1000 Touch Thermal Cycler-CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). The list of specific primers (Eurofins) is provided in Table 1.

cDNA ends amplification

>cDNA 5' ends amplifications were performed using the SMARTer RACE kit (Clontech), according to manufacturer protocol, with the following primer in MAP6 exon 2: 5'-GATTACGCCAAGCTTCTTCGGGCATTCTTGAAAGGCTCACT G-3'. The major PCR products were purified with a PCR clean up kit (Macherey-Nagel) and sequenced.

Muscle fiber isolation and immunolabeling

Isolated muscle fibers were prepared by enzymatic and manual dissociation of *flexor digitorum brevis* (FDB) muscles, and the immunofluorescent labeling after fixation was performed as described previously [14]. Images were acquired with a 63 \times objective on an LSM710 confocal microscope (Zeiss), equipped with an Airy-scan

Table 1 Primers for RT-q-PCR amplifications

Mouse gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
β -actin	GACAGGATGC AGAAGGAGATTACTG	CTCAGGAGGAG CAATGATCTTGAT
Chrng	AGCCTCCCCAG CCATCCAGG	GGCCCCACCAGC AACCACTCC
Map6_ex1-2	CCCTCAACAG GCAAATCC	TCTCATGAACC ATCTTGTCATC
Musk	ATCACCCAGCC TCTTGAAC	TGTCTTCCACG CTCAGAATG
Myogenin	CTTGCTCAGCT CCCTCAAC	TGGGAGTTGC ATTCACTGG
Runx1	GAAGAACCA GGTAGCGAGATT	GTAAGACGC GTGATGGTCAGAG

module. To quantify the global microtubule density, binary masks corresponding to longitudinal or transversal microtubule areas were generated with a homemade ImageJ macro. The obtained densities were corrected with XLSTAT software for day-dependent parameters, and mean values were calculated and represented with Graphpad Prism 6.0 software. For a more detailed analysis of microtubule network organization along the fiber, the number of microtubule crossing a longitudinal line and the intensity profile along this line were recorded and normalized to the highest peak. Forty different fibers from three different animals were analyzed for each genotype, and the values are presented as mean \pm SEM.

In vivo force measurements

Mechanical performance measurements coupled to multimodal MR data acquisition were done as previously described on the left *gastrocnemius* muscle of anesthetized mice (6 WT and 7 MAP6 KO male mice, 7 to 8 months old) using a totally non-invasive procedure [39, 41]. Throughout each experiment, general anesthesia was ensured by isoflurane inhalation, and animal body temperature was controlled and maintained at physiological value. Muscle contractions were induced by transcutaneous electrostimulation, and mechanical performance (i.e., force-generating capacity) was evaluated during a fatiguing bout of exercise consisting in 6 min of repeated maximal isometric contractions induced at a frequency of 1.7 Hz. Specific twitch tension was determined by normalizing absolute twitch tension to muscle volume calculated from hindlimb MR imaging.

Electron microscopy

Extensor digitorum longus (EDL) muscles were dissected from 4 months old animals (3 WT and 3 MAP6 KO mice) at resting length and prepared for standard and transverse-tubules staining electron microscopy as described in [42]. Specimens were cut in ultrathin sections using a Leica Ultracut R microtome (Leica Microsystems) with a Diatome diamond knife (Diatome Ltd.). Ultrathin sections (~50 nm) were examined after staining in 4% uranyl acetate and lead citrate, with a Morgagni Series 268D electron microscope (FEI Company), equipped with Megaview III digital camera.

Quantitative analysis by electron microscopy

For all quantitative analyses, micrographs of non-overlapping regions were randomly collected from transversal and longitudinal sections of internal fiber areas. The percentage of fibers exhibiting stacks of flat SR membranes and their number per 100 μm^2 area/section were evaluated at 28,000 magnification in 5 micrographs from 10 fibers of each specimen.

The relative fiber volumes occupied by free SR and free SR surface area to fiber volume ratio were measured in transversal sections by using the well-established stereology point and intersection counting method [43, 44]. In each specimen, 10 fibers were analyzed and in each fiber 1–2 micrographs were taken at 22,000 magnification. Number of triads per area was evaluated in micrographs from longitudinal sections and was reported as average number over 100 μm^2 (see [42] for more detail). In each electron microscopy (EM) micrograph, the orientation (oblique or longitudinal) of triads has been determined. In each specimen, 10 fibers were analyzed and in each fiber 6 micrographs were taken at 14,000 magnification.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using Student's *t* test or the Mann-Whitney test according to samples amount and distribution.

Results

MAP6 is present in skeletal muscle

MAP6 transcripts and proteins have been detected in skeletal muscle, but without detailed characterization of the expressed isoforms [17]. We used RT-PCR amplification to identify the transcripts expressed in skeletal muscle. The major neuronal isoform MAP6-N contains exons 1 to 4, while the so-called embryonic isoform MAP6-E contains exons 1, 2, 3, 3' and the fibroblastic isoform MAP6-F contains exons 1, 2, and 4 with the use of an alternative promoter in exon 1 (Fig. 1a). Using different combinations of primers, RT-PCR was performed on wildtype (WT) skeletal muscle and brain homogenates, and on extracts produced from differentiated C2C12 myotubes, a mouse muscle cell line used as a control (Fig. 1b). Amplification of exons 1 to 3 showed a single band for muscle (M), brain (B), and C2C12 (C) that could correspond to MAP6-N and MAP6-E transcripts. Amplification of exons 2 to 4 revealed two bands: one that could correspond to MAP6-N transcript and one that could correspond to MAP6-F transcript (Fig. 1b). This demonstrates that MAP6 transcripts are present in mouse skeletal muscle, although at different expression levels than in the brain (Fig. 1b). The similar pattern observed in whole muscle and in a pure myotube population from C2C12 culture confirmed the presence of MAP6 transcripts in muscle cells, excluding any possible contamination by another cell type (peripheral neurons or fibroblasts for instance). The relative MAP6 transcripts levels in brain and muscle tissues were further determined by RT-q-PCR (Fig. 1c), and a sevenfold reduction was observed in muscle compared to the brain. Amplification of the 5'-cDNA end from a

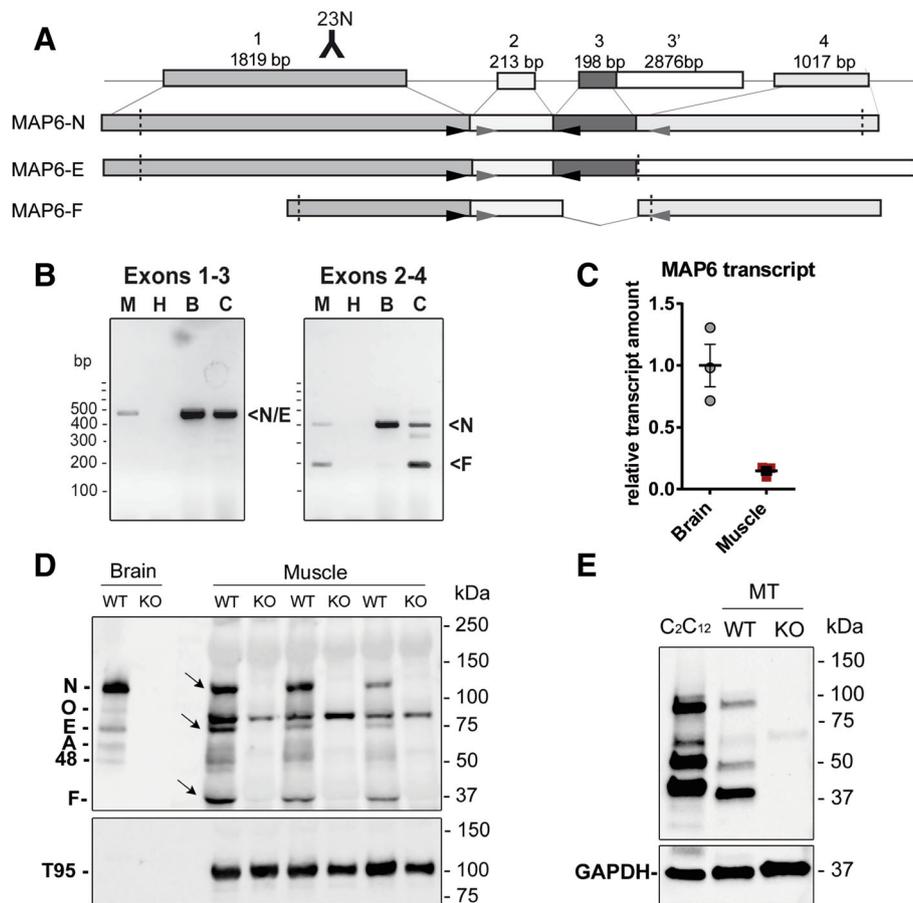


Fig. 1 MAP6 isoforms are present in mice skeletal muscle. **a** Structure of the *MAP6* gene and of the major mRNA isoforms obtained by the alternative splicing of the four exons or the use of an alternative promoter in the case of MAP6-F. The dashed lines represented for each isoform, the localization of the start, and the stop codons. The localization of the antigen for the 23N antibody is represented. The localization of the primers used to amplify the four exons is represented by the arrowheads. **b** RT-PCR amplifications from muscle (M), brain (B), or C2C12 myotube (C) extracts, with H₂O (H) instead of cDNA as a negative control. PCR fragments at sizes corresponding to MAP6-N, E and F transcripts were amplified from brain homogenates: 443 bp for exons 1–3 (N/E), and 373 bp (major-N) and 176 bp (minor-F) for exons 2–4. In muscle homogenates and in C2C12, PCR fragments of the same size as in brain homogenates were amplified. **c** RT-q-PCR amplification of MAP6 transcripts in brain or muscle extracts, from three different mice, compared to β -actin. **d** Western blot analysis has been performed with antibody 23N on 60 ng whole brain homogenates prepared from WT or MAP6-KO animals, and 50 μ g of muscle homogenate prepared from WT or MAP6-KO skeletal muscle (three mice of each genotype). In brain, five proteins are detected, the N, O, E, A, and an un-characterized 48-kDa isoform (48). The three bands specifically detected in WT skeletal muscle at 130 kDa (N-isoform), 75 kDa (E-isoform), and 42 kDa (F-isoform) are marked with arrows. The muscle-specific triadin isoform Trisk 95 (T95) has been used as a loading control (lower panel). **e** Western blot analysis has been performed with antibody 23N on C2C12 homogenate or 3 days WT and MAP6-KO myotube (MT) homogenates. GAPDH has been used as a loading control (lower panel)

primer in the common exon 2, followed by partial sequencing of the major bands confirmed that N/E and F transcripts are present in skeletal muscle (Additional file 1: Figure S1). We further studied the presence of the proteins using western blot with an antibody directed against a peptide localized in a common region of exon 1 (Fig. 1d), and triadin, a muscle-specific protein of moderate abundance, as a loading control. Three bands were specifically detected in control muscle compared to MAP6 KO muscle, corresponding to the MAP6-N, MAP6-E, and MAP6-F isoforms, with possibly

additional ones in minor amounts (Fig. 1d) [45]. The presence of MAP6 proteins was confirmed in the pure myoblast cell line (C2C12, Fig. 1e), and in differentiated myotubes (WT compared to MAP6 KO myotubes Fig. 1e). The expression pattern, similar between the two muscle cell types, is different from adult muscle. The non-specific bands recognized by this antibody in skeletal muscle precluded the further characterization of these isoforms and the study of their localization by immunofluorescent labeling, and indeed the same labelling was observed on WT and MAP6 KO muscles.

MAP6 KO muscle does not show signs of denervation

The global muscle structure was analyzed using histological staining. The weight of different muscles was measured and a reduction of about 20% compared to WT was observed in all the MAP6 KO muscles tested (Fig. 2a). At the fiber level, a global reduction of about 20% in the size of all fibers (16% for type I fibers and 19% for type II fibers) has also been measured (Fig. 2b). Using H&E and NADH stainings, no gross modification was observed: no regenerating fibers, central nuclei, nor fibrosis (Fig. 2c). No histological sign of denervation was observed, which was confirmed by following the expression of a set of genes known to be upregulated in the case of denervation (AChR- γ ; Musk; Myogenin; Runx1) [46]. RT-q-PCR amplification of these genes showed that their expression was not significantly increased in MAP6 KO muscle compared to WT (Fig. 2d). Therefore, the defects observed in MAP6 KO muscles and the muscle atrophy are most probably mainly related to intrinsic muscle defects and not subsequent to muscle denervation.

MAP6 KO mice show muscle function defects in vivo

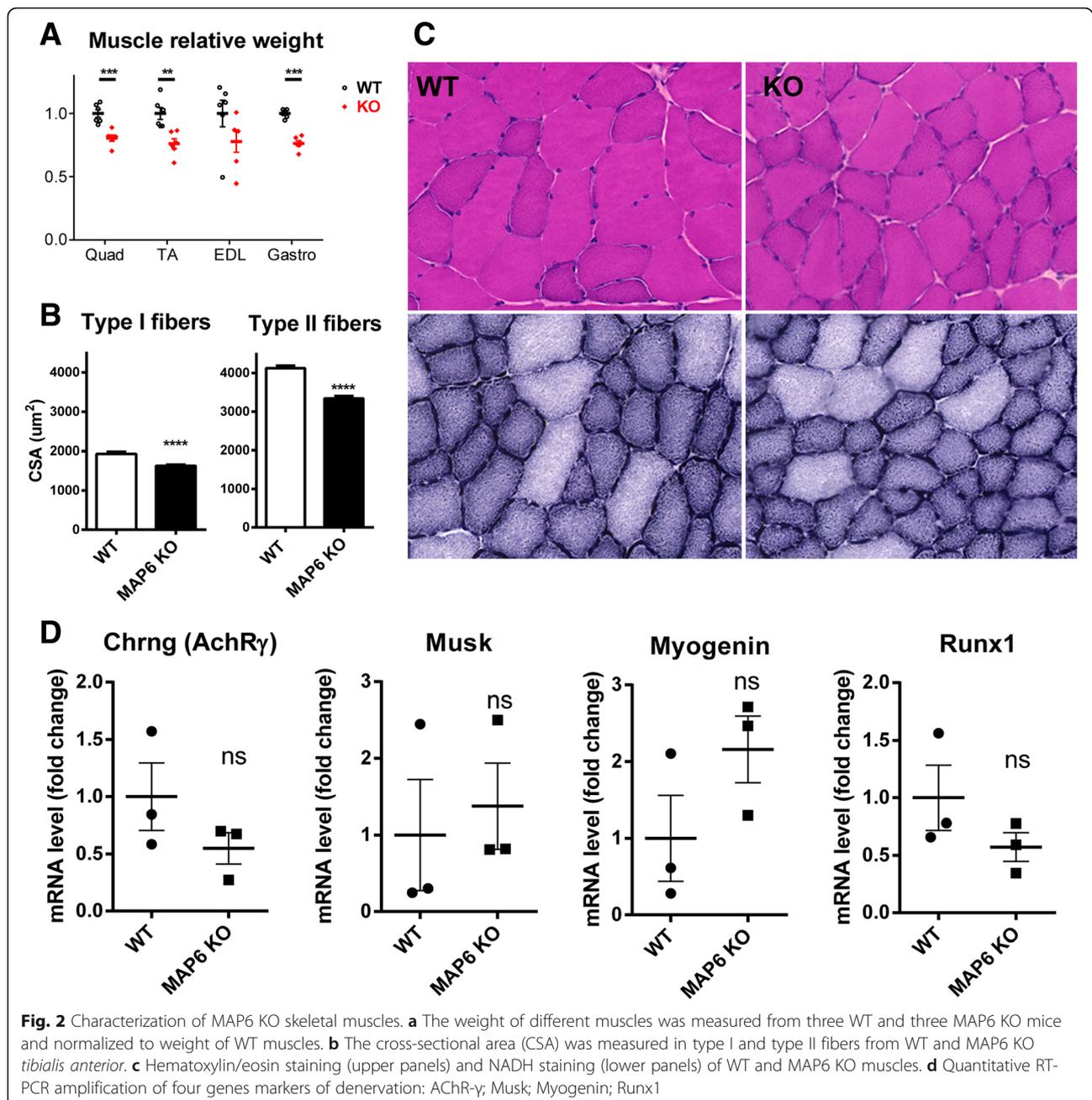
Muscle function was further studied in the MAP6 KO mouse line. Due to the multiple behavioral defects of these mice, like an acute response to stress [28–30], the use of classical force measurement tests (treadmill run or grip tests) was not possible. Therefore, we used a non-invasive protocol involving transcutaneous electrostimulation coupled to mechanical measurement and multimodal magnetic resonance (MR) acquisition to evaluate *gastrocnemius* muscle function in anesthetized animals [41]. Because the absence of MAP6 results in synaptic function alteration [32, 47], muscle electrostimulation was performed by a direct depolarization of the plasma membrane, bypassing nerve stimulation. The muscle volume and the twitch tension developed during a 6-min fatiguing bout of exercise were measured in 8 months old male mice (Fig. 3a, b and Table 2).

The animals presented similar average body weights, but the MAP6 KO *gastrocnemius* volume calculated from hindlimb MR imaging was reduced compared to WT (from $142 \pm 3 \text{ mm}^3$ in WT to $128 \pm 2 \text{ mm}^3$ in KO) (Table 2), pointing to a small yet significant muscle atrophy (~10% muscle volume reduction), confirming the muscle atrophy previously observed at the muscle and fiber levels (Fig. 2). The muscle capacity for generating specific twitch tension (i.e., absolute twitch tension normalized to muscle volume) was dramatically reduced in MAP6 KO animals whereas the extent of twitch tension reduction at the end of exercise did not differ between both phenotypes (Table 2 and Fig. 3). Interestingly, there were no differences between WT and KO muscles for intracellular pH, adenosine triphosphate (ATP), and PCr

(phosphocreatine) levels, monitored dynamically using ^{31}P -MR throughout rest, exercise, and recovery periods (Additional file 2: Figure S2 and Additional file 3: Table S1), which indicates that basal bioenergetics status and energy demand during exercise were not disturbed in mice lacking MAP6, as already observed on another study on the same model [48]. These data demonstrate that the absence of the microtubule-associated protein MAP6 induces a muscle weakness that was not accompanied by a proportional reduction in energy demand, hence demonstrating an impairment of the contractile energetic efficiency.

MAP6 deletion in mice affects microtubule organization

We next investigated the molecular mechanisms linking MAP6 deletion to muscle weakness. As MAP6 function has been related to microtubule stability, the absence of MAP6 protein could therefore lead to microtubule network destabilization and muscle intracellular disorganization. We thus studied the microtubule cytoskeleton and the general muscle subcellular organization in isolated FDB muscle fibers from WT and MAP6 KO mice, using immuno-fluorescent staining of β -tubulin to label microtubules, with a co-staining of the calcium channel-ryanodine receptor (RyR1) as a triad marker and of alpha-actinin (a Z-line protein) as a sarcomere marker (Fig. 4 and Additional file 4: Figure S3). For both genotypes, triads and sarcomeres had a normal organization, with double rows of triads located on both side of the Z-line of the sarcomeres (Additional file 4: Figure S3). Microtubules exhibited a grid-like network similar to the one described in several studies [5, 14, 49]; however, it seems organized differently between WT and MAP6 KO muscle fibers (Fig. 4A). To assess these differences, quantifications of the longitudinal and transversal microtubule density as well as the average number of transversal microtubules crossing a longitudinal line, were performed (Fig. 4B). Surprisingly, the transversal microtubule density was higher in MAP6 KO fibers than in WT (Fig. 4B, b), and the average number of transversal microtubule crossing a longitudinal line was slightly but significantly increased in MAP6 KO (from $1.23 \pm 0.02/\mu\text{m}$ in WT fibers to $1.36 \pm 0.02/\mu\text{m}$ in MAP6 KO fibers (Fig. 4B, c, d). These results suggest that there are more transversal microtubules in MAP6 KO than in WT fibers or that the transversal microtubules are less bundled in the absence of MAP6. Quantitative western blot analysis of the total amount of tubulin in WT and MAP6 KO muscles showed no difference (Additional file 5: Figure S4). Tubulin post-translational modifications, especially detyrosination, have been involved in contraction efficiency [50, 51]. Therefore, we checked the relative amount of tyrosinated/detyrosinated microtubules in WT and MAP6 KO



muscles (Additional file 6: Figure S5) and did not observe any difference. Overall, our results favor the hypothesis of a change in microtubule organization rather than in microtubule quantity or tubulin post-translational modification.

MAP6 KO muscles present SR structural abnormalities

Whereas the general fiber organization seemed not impaired at the scale of immunofluorescent analysis, a detailed ultrastructural analysis using electron microscopy (EM) was performed to visualize more subtle

modifications in MAP6 KO muscles that could contribute to the resulting muscle weakness [39, 52, 53]. In WT muscle fibers, as classically observed, calcium release units were located at the sarcomere A-I junctions and were mostly in the form of triads: two SR vesicles apposed to a central transverse-tubule (TT), which are oriented transversally with respect to the long axis of myofibrils (Fig. 5a). In most of the MAP6 KO fibers analyzed, the overall fiber ultrastructure was well preserved: myofibrils were aligned with one another and triads and TTs were correctly disposed (Fig. 5b). Quantitative

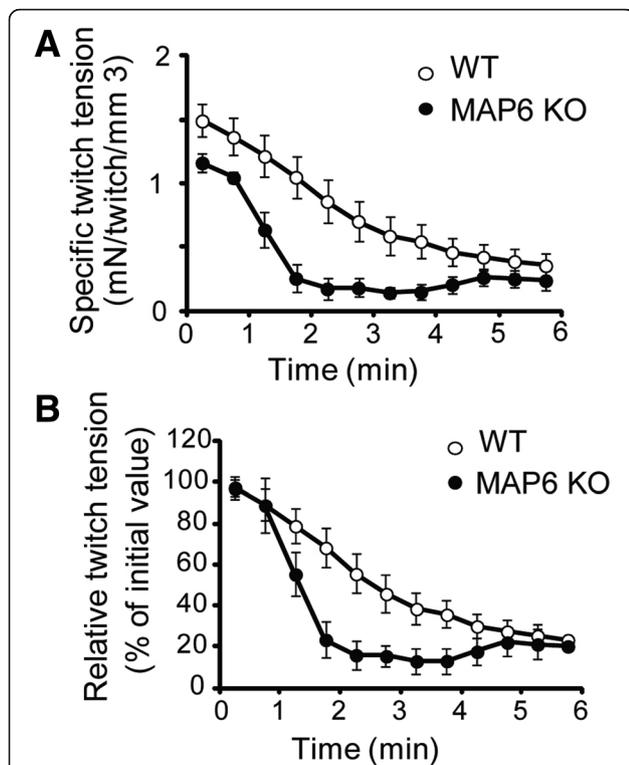


Fig. 3 *Gastrocnemius* muscle mechanical performance is reduced in MAP6 KO mice. Changes in specific (a) and relative (b) twitch tension throughout a 6-min in vivo fatiguing bout of exercise performed simultaneously to bioenergetics MR acquisition. Data are means \pm SEM on six WT and seven KO mice

analysis confirmed indeed that there was no difference in the density of triads (Additional file 7: Table S2, line A) and in the percentage of longitudinally oriented triads, i.e., triads in which TTs were oriented longitudinally with respect to the long axis of myofibrils (Additional file 7: Table S2, line B). Only a significant increase in the percentage of oblique triads (circled in Fig. 5b) was detected (Additional file 7: Table S2, line C), i.e., triads in which TTs were not perfectly transversally oriented ($1.7 \pm 0.4\%$ in WT vs $5.6 \pm 0.8\%$, in MAP6 KO). However, more striking differences between WT and MAP6 KO EDL fibers were detected when analyzing the ultrastructure of the free SR (or longitudinal SR) at the

I-band level between triads (Fig. 5c–f). In WT fibers, the free SR at the I-band on both sides of Z lines was composed of convoluted tubules that, when cross-sectioned, appeared as multiple layers of vesicles (Fig. 5e). In MAP6 KO fibers, the free SR at the I-band appeared remodeled to form straighter tubes and/or flat cisternae (Fig. 5d), which often were stacked in multiple layers (pointed by arrows in Fig. 5f and enlarged in the inset). The number of fibers presenting stacks and the number of stacks per area increased significantly in EDL fibers from MAP6 KO mice (Table 3, lines A and B). After quantitative analysis of free SR membranes (Table 3, lines C and D), a small but significant increase in both SR volume and surface in MAP6 KO fibers compared to WT was confirmed. These results showed that localization and structure of triads were very mildly affected by deletion of MAP6 proteins and suggest that deletion of MAP6 impacted mostly the morphology of the SR at the I-band.

One major function of SR in muscle is calcium storage for contraction; therefore, the amounts of the main proteins involved in calcium homeostasis were evaluated using quantitative western blot in WT and MAP6 KO muscle homogenates (Fig. 5g, h). No significant difference was observed for the tested proteins (RyR1, the $\alpha 1$ -subunit of DHPR and the Ca^{2+} -ATPase SERCA), pointing to a remodeling of SR membranes rather than a modification of their quantity or composition.

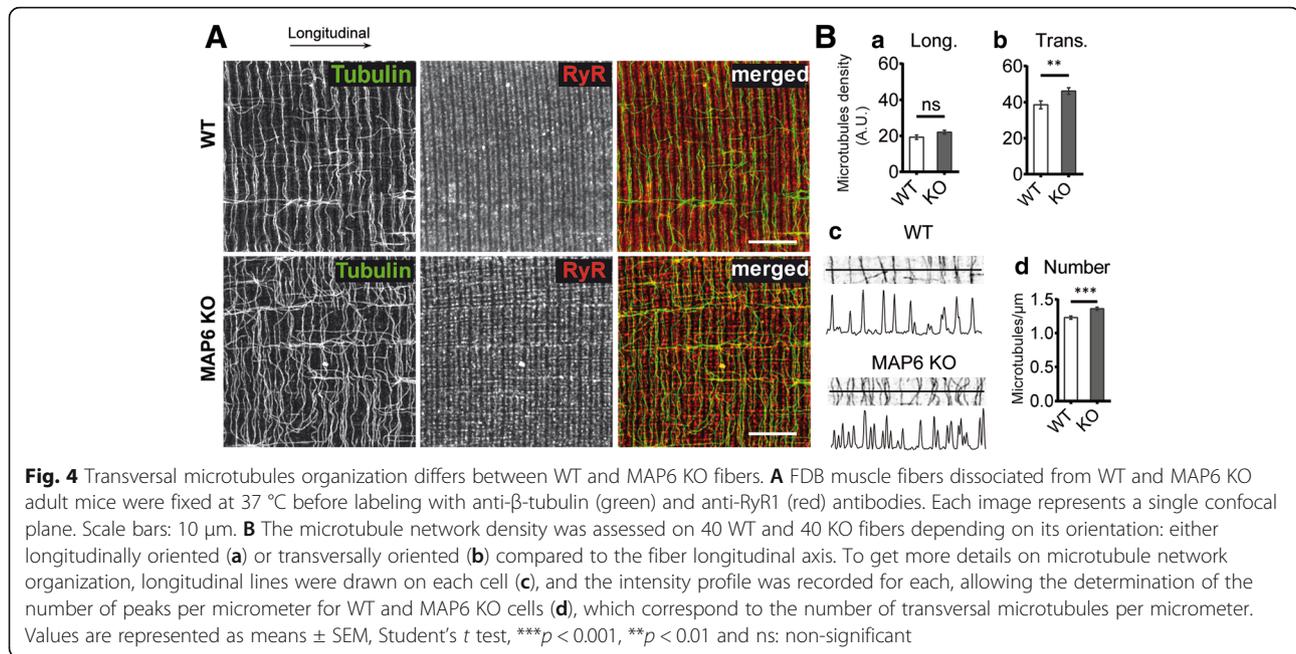
Calcium release is reduced in MAP6 KO cells

Calcium release from the SR upon plasma membrane depolarization is a key step leading to muscle contraction and reduction in calcium release results in muscle weakness. Since alterations in muscle strength, in microtubules, and in SR organization have been observed in MAP6 KO muscles, calcium release was further analyzed in these muscles. Calcium imaging by confocal microscopy was performed on WT and MAP6 KO cultured myotubes. Two stimuli were used: a direct stimulation of the SR calcium channel, the ryanodine receptor (RyR1), by $500 \mu\text{M}$ 4-chloro-m-cresol (4CmC) (Fig. 6a, c) or a membrane depolarization using 140 mM KCl (Fig. 6b, d). This second stimulation protocol allows to

Table 2 Body weight, *gastrocnemius* muscle volume, and in vivo mechanical performance

	WT	MAP6 KO
Body weight (g)	39.3 ± 2.6	35.1 ± 2.0
<i>Gastrocnemius</i> volume (mm^3)	142 ± 3	$128 \pm 2^*$
Maximal specific twitch tension (mN/twitch/mm^3)	1.53 ± 0.12	$1.19 \pm 0.07^*$
End exercise twitch tension (% of start exercise value)	24 ± 6	20 ± 7
Total tension produced during the whole 6-min exercise (mN/mm^3)	440 ± 70	$210 \pm 30^*$

Gastrocnemius volume was calculated in vivo from MR images acquired at rest on anesthetized animals, and mechanical performance was assessed during the 6-min fatiguing exercise for six WT and seven MAP6 KO male mice. Data are presented as mean \pm SEM. The Mann-Whitney tests were performed and significant differences ($*p < 0.05$) are italicized



assess the function of the whole calcium release complex (CRC) and the functional coupling between the voltage-activated calcium channel, the dihydropyridine receptor (DHPR), and RyR1. Only KCl-induced calcium release was significantly reduced in MAP6 KO myotubes compared to WT: both the peak amplitude and the area under the curve were reduced (Fig. 6d). The general organization of triads and microtubules was also studied in those WT and MAP6 KO cultured myotubes, and no gross modification was observed (Additional file 8: Figure S6). These results suggest that the coupling between RyR1 and DHPR, or the DHPR function, may be altered in MAP6 KO myotubes, whereas the RyR1 function and the SR calcium content were unmodified. Altogether, these results show that the muscle weakness of the MAP6 KO mice is related to a reduced calcium release.

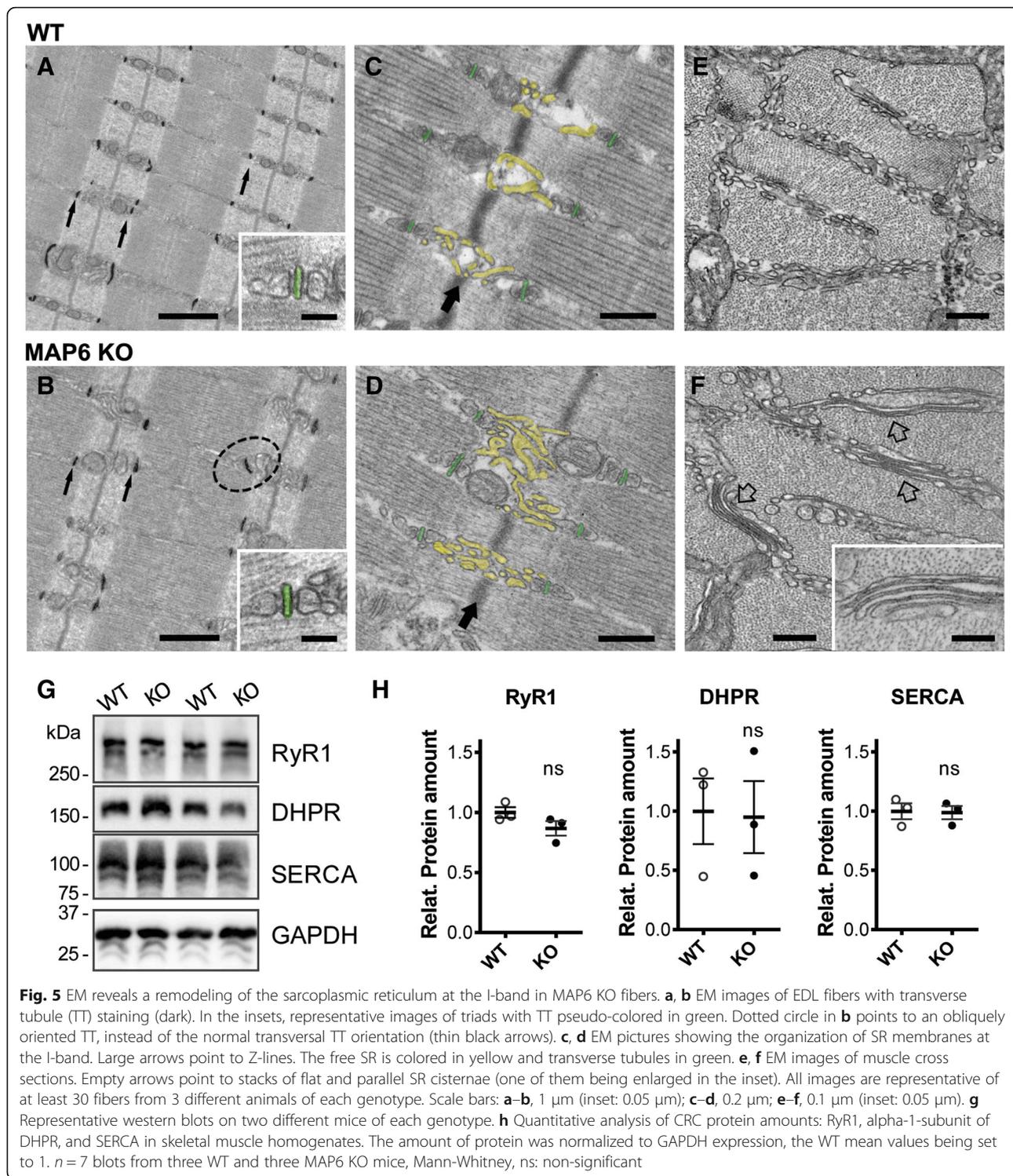
Discussion

Previous studies on the MAP6 KO mouse model were focused on neuronal function and shed light on numerous impairments [27, 28, 31], but no impact on skeletal muscle was demonstrated so far. The higher expression level of MAP6 in brain compared to skeletal muscle probably explains why the MAP6 KO mice have a major neurological phenotype. We have here characterized defects in muscle cell structure and function due to the absence of MAP6 proteins and shown that these animals experience muscle weakness with mild muscle atrophy. As muscle contraction was triggered in this study by a direct stimulation of muscle sarcolemma, it can be concluded that these mice have an intrinsic muscle dysfunction. We cannot exclude a small contribution of motor

neuron dysfunction as the cause of the weakness; nevertheless, there was no sign of denervation. It is noteworthy that the observed reduction of the mechanical performance in MAP6 KO mice is comparable to that reported in other mouse models for congenital myopathies [54–56], arguing that the absence of MAP6 has a direct deleterious impact on muscle function.

The general structure of the MAP6 KO mice muscle fibers was not profoundly affected, but rearrangements in microtubules and SR organization were observed. A higher density of transverse microtubules was observed, suggesting a disorganization of the thick transverse bundles of microtubules. The EM analysis also revealed modifications of the SR which may be the result of the microtubule network disorganization, since both structures are in direct contact [57, 58]. Although subtle, these modifications of the subcellular structure of the muscle fibers may have important consequences. The stabilization of some microtubule bundles by another MAP (oMAP4) was for instance shown to play a role in muscle cell differentiation [8]. Modifications of SR structure have been observed in EDL muscles from calsequestrin-1 KO mice [59] or triadin-junctin double KO mice [52] and have been associated to defects in the contraction properties of the muscle fiber.

The consequences of MAP6 deletion on the skeletal muscle function were further analyzed by calcium imaging. Contraction of skeletal muscles is triggered by series of events leading to massive calcium efflux from SR cisternae via the intracellular RyR1 calcium channel. In MAP6 KO cells, the depolarization-induced calcium release, corresponding to the physiological activation,



was reduced by 15%. As calcium release after direct RyR1 stimulation did not show any modification, this points to an altered DHPR-RyR1 coupling. This altered coupling is probably very transient because when observed in EM, both RyR1- and DHPR-containing membranes (respectively SR terminal cisternae and TT) were

normally associated, and both proteins were normally expressed. Interestingly, it was demonstrated that MAP6 protein can stabilize microtubules against millimolar calcium concentration [60], a condition achieved only after muscle cell stimulation. It is therefore possible that the absence of MAP6 may alter the RyR1-DHPR crosstalk

Table 3 EM analysis of EDL from WT and MAP6 KO

		WT	KO
A	Fibers with SR membrane stacks (% of total)	23.5 ± 3.5	64.0 ± 4.4**
B	N. of SR stacks /100 μm ²	3.4 ± 0.6	10.6 ± 0.9**
C	Free SR volume/total volume (%)	5.3 ± 0.4	6.5 ± 0.3**
D	Free SR surface area/total volume (μm ² /μm ³)	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1*

Data are shown as mean ± SEM. Student's *t* test, **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 vs WT. Sample size: rows A and B: 20–30 fibers, 2 micrographs/fiber (22,000 magnification images in transversal sections); rows C and D: 30–45 fibers; 5 micrographs/fiber (28,000 magnification images in transversal sections)

only during depolarization, when the cytosolic concentration of calcium rises, which would explain why no other variations are observed outside of muscle fiber stimulation. Recently, it was also shown that microtubule detyrosination could play an important role in muscle contraction efficiency by modulating the production of reactive oxygen species and calcium transient [3, 50, 51]. Although we could not demonstrate a change in the ratio of tyrosinated/detyrosinated microtubules, we cannot exclude that such a transitory modification of the microtubules during stimulation may affect muscle calcium release in MAP6 KO animals. The alterations observed in calcium release during excitation-contraction coupling are probably underlying the muscle weakness of the MAP6 KO mice.

The initial characterization of these mice showed several behavioral defects, among which a larger time spent standing still or walking at the expense of grooming and feeding

[28]. Our demonstration that MAP6 KO mice also have a muscle weakness could explain in part this altered activity. Moreover, several abnormalities of the MAP6 KO mice were partially reverted using neuroleptics, leading to the proposal of this mouse line as a model for schizophrenia [28]. Interestingly, Chlorpromazine, a neuroleptic molecule used to revert MAP6 KO phenotype, was shown to increase the force in isolated muscle fibers at low concentration, by enhancing depolarization-induced calcium release [61]. A recent study also concluded to a correlative relationship between schizophrenia and muscle weakness in human patients [62]. It is therefore possible that together with a central nervous system dysfunction, skeletal muscle weakness contributes to the schizophrenia phenotype in the MAP6 KO mice.

Conclusions

Although several studies showed major roles of MAPs in muscle cell differentiation and function [4, 8, 13], our

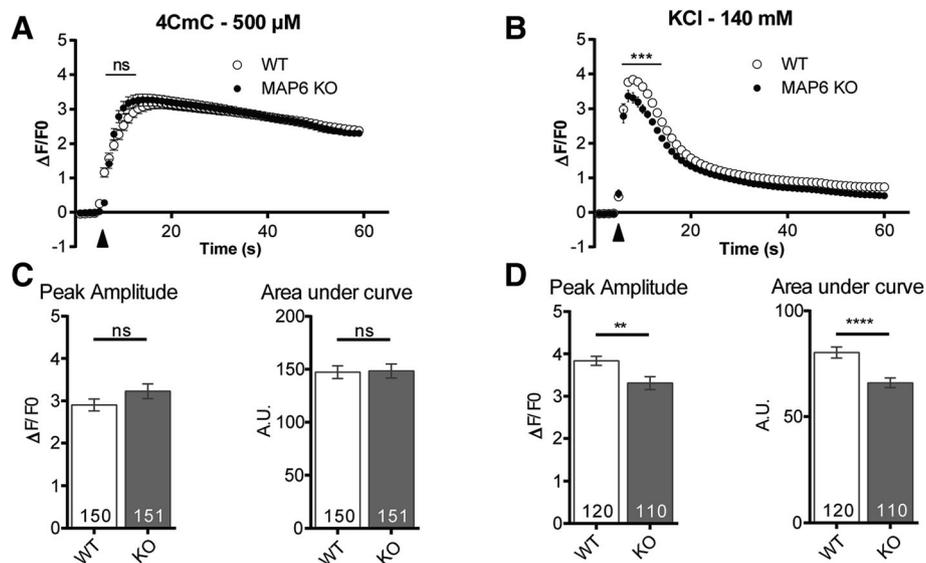


Fig. 6 Calcium release is reduced in MAP6 KO myotubes compared to WT. **a** Direct stimulation of RyR1 by 500 μM 4CmC (black arrowhead). Fluorescence variations as a function of time are represented for WT myotubes (white dots) and MAP6 KO myotubes (black dots). Values are represented as means ± SEM for *n* = 150 and 151 myotubes respectively, from three different experiments, Student's *t* test, ns: non-significant. **b** Membrane depolarization induced by addition of 140 mM KCl (black arrowhead). Fluorescence variations are presented for WT and MAP6 KO myotubes. Values are means ± SEM for *n* = 120 and 110 myotubes respectively, from three different experiments. Student's *t* test, ****p* < 0.001. **c**, **d** Maximal amplitude and area under curve for 4CmC stimulation (**c**) and KCl stimulation (**d**), with the number of analyzed-myotubes in each bar of the plot. Values are represented as means ± SEM. Student's *t* test, *****p* < 0.0001, ***p* < 0.01; ns: non-significant

report points for the first time to a defect in the contraction properties of adult muscle due to the absence of a MAP. The molecular bases for muscle weakness due to the absence of MAP6 probably rely on an alteration of the excitation-contraction coupling and calcium release, although we could not pinpoint a precise molecular mechanism so far. The subtle reorganization of the muscle fiber microtubule network could account for this excitation-contraction coupling alteration, but the involvement of other regulatory mechanisms could not be excluded as MAP6 proteins have been shown to interact with other proteins of the cytoskeleton like actin [23] or with Golgi elements [24, 25]. In conclusion, our work emphasizes that MAP6 deletion in mice leads to brain alterations as well as skeletal muscle defects that contributes to the mice schizophrenia-like phenotype.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Multiples MAP6 isoforms are present in muscle cDNA. cDNA 5'-end amplification was performed from a primer in exon 2, which is common to all known MAP6 isoforms. The two major bands were extracted, purified, and partially sequenced allowing the identification of MAP6 transcripts (NCBI reference sequences MAP6-N: NM_010837.3, MAP6-E: NM_001048167.1, MAP6-F: NM_001043355.2). (JPG 853 kb)

Additional file 2: Figure S2. Dynamic and noninvasive investigation of *gastrocnemius* muscle bioenergetics using ^{31}P -MRS. In vivo changes in *gastrocnemius* muscle PCr (A), ATP (B), and pH (C) throughout the 6-min fatiguing exercise and during the following 15-min recovery period. For each panel, the first time point ($t = 0$) indicates the basal value. Data are represented as means \pm SEM for 6 WT and 7 MAP6 KO animals. Details on muscle bioenergetics are represented in Additional file 3: Table S1. (JPG 2119 kb)

Additional file 3: Table S1. *Gastrocnemius* muscle bioenergetics assessed in vivo using ^{31}P -MRS. (DOCX 15 kb)

Additional file 4: Figure S3. Macroscopic organization of sarcomeres and triads are preserved in MAP6 KO fibers. FDB muscle fibers dissociated from WT and MAP6 KO adult mice were immuno-labeled with anti- α -actinin (green) and anti-RyR1 (red) antibodies for general appreciation of the fiber organization. Each image represents a single confocal plane. These images are representative from 6 to 10 randomly chosen fibers. Scale bar: 10 μm . (JPG 3236 kb)

Additional file 5: Figure S4. Total tubulin amount is not modified in MAP6 KO muscles. A) Representative western blot and B) quantitative analysis of β -tubulin amount in WT and MAP6 KO skeletal muscle homogenates. The amount of protein was normalized to GAPDH relative expression, and WT mean value set to 1. Values are represented as means \pm SEM from $n = 3$ blots, Mann-Whitney test, ns: non-significant. (JPG 969 kb)

Additional file 6: Figure S5. The ratio between tyrosinated and detyrosinated microtubules seems unaffected in MAP6 KO. FDB muscle fibers dissociated from WT and MAP6 KO adult mice were labeled for tyrosinated tubulin (green) and detyrosinated tubulin (red). Each image represents a single confocal plane. Scale bars: 10 μm . The ratio between tyrosinated and detyrosinated microtubule network densities, reflecting respectively the dynamic and the stable microtubules, was measured depending on their orientation: either longitudinally oriented (a) or transversally oriented (b) compared to the fiber axis, on $n = 14$ WT and 20 MAP6 KO fibers. Values are represented as means \pm SEM, Mann-Whitney test, ns: non-significant. (JPG 2421 kb)

Additional file 7: Table S2. Quantification of triads analyzed by EM. (DOCX 15 kb)

Additional file 8: Figure S6. Organization of triads and microtubules is similar in WT and MAP6 KO myotubes. WT and MAP6 primary cultures were differentiated for 3 days before being fixed and labeled with antibodies against triadin and RyR1 to visualize the triads and against tubulin to visualize the microtubules. No major difference is observed between the two genotypes for triadin, RyR, and tubulin. (JPG 1165 kb)

Abbreviations

ATP: Adenosine triphosphate; B: Brain; C: C2C12 cell line; CRC: Calcium release complex; DHPR: Dihydropyridine receptor; EDL: Extensor digitorum longus; EM: Electron microscopy; FDB: Flexor digitorum brevis; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H: Water control; KO: Knockout; M: Muscle; MAP: Microtubule-associated protein; MR: Magnetic resonance; PCr: Phosphocreatine; RyR: Ryanodine receptor; SERCA: Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase; SR: Sarcoplasmic reticulum; STOP: Stable tubule-only polypeptide; TT: Transverse tubule; WT: Wildtype

Acknowledgements

We acknowledge the members of the animal facility for the breeding and genotyping of the mice, and the members of PIC-GIN imaging platform for support and fruitful discussions. We thank Dr. M.J. Moutin for the gift of the antibody against SERCA.

Funding

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), from Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon) to MS, PA, and IM, and from Italian Ministry of Health - GR2011-02352681 to SB.

Availability of data and materials

Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study.

Authors' contributions

MS, PA, JB, BG, MC, JB, LP, SB, CB, JR, and SGF designed, performed, and analyzed the experiments. MS, IM, AFL, JF, and AA designed the study and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval

All procedures using animals were approved by the institutional ethics committee (C2EA-04) and followed the guidelines of the National Research Council Guide for the care and use of laboratory animals.

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹INSERM 1216, Grenoble Institute of Neurosciences, F-38000 Grenoble, France. ²University Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France. ³Aix Marseille Univ, CNRS, CRMBM, F-13000 Marseille, France. ⁴CeSI-Met & DNICS, University G. d' Annunzio of Chieti, I-66100 Chieti, Italy. ⁵CHU Grenoble, Biochimie et Génétique Moléculaire, F-38000 Grenoble, France. ⁶CEA-Grenoble, BIG, F-38000 Grenoble, France. ⁷GIN- Inserm U1216 - Bat EJ Safra, Chemin Fortuné Ferrini, 38700 La Tronche, France.

Received: 20 July 2018 Accepted: 12 September 2018

Published online: 19 September 2018

References

1. Kapitein LC, Hoogenraad CC. Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*. 2015;87:492–506.

2. Sparrow JC, Schock F. The initial steps of myofibril assembly: integrins pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:293–8.
3. Khairallah RJ, Shi G, Sbrana F, Prosser BL, Borroto C, Mazaitis MJ, Hoffman EP, Mahurkar A, Sachs F, Sun Y, Chen YW, Raiteri R, Lederer WJ, Dorsey SG, Ward CW. Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *Sci Signal*. 2012;5:ra56.
4. Prins KW, Humston JL, Mehta A, Tate V, Ralston E, Ervasti JM. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol*. 2009;186:363–9.
5. Oddoux S, Zaal KJ, Tate V, Kenea A, Nandkeolyar SA, Reid E, Liu W, Ralston E. Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J Cell Biol*. 2013;203:205–13.
6. Ralston E, Lu Z, Ploug T. The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J Neurosci*. 1999;19:10694–705.
7. Mangan ME, Olmsted JB. A muscle-specific variant of microtubule-associated protein 4 (MAP4) is required in myogenesis. *Development*. 1996;122:771–81.
8. Mogessie B, Roth D, Rahil Z, Straube A. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife*. 2015;4:e05697.
9. Straube A, Merdes A. EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Curr Biol*. 2007;17:1318–25.
10. Zhang T, Zaal KJ, Sheridan J, Mehta A, Gundersen GG, Ralston E. Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. *J Cell Sci*. 2009;122:1401–9.
11. Elhanany-Tamir H, Yu YV, Shnayder M, Jain A, Welte M, Volk T. Organelle positioning in muscles requires cooperation between two KASH proteins and microtubules. *J Cell Biol*. 2012;198:833–46.
12. Cadot B, Gache V, Vasyutina E, Falcone S, Birchmeier C, Gomes ER. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep*. 2012;13:741–9.
13. Metzger T, Gache V, Xu M, Cadot B, Folker ES, Richardson BE, Gomes ER, Bayliss MK. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature*. 2012;484:120–4.
14. Osseni A, Sebastien M, Sarraolt O, Baudet M, Coute Y, Faure J, Fourest-Lieuvain A, Marty I. Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and microtubules in muscle cells. *J Cell Sci*. 2016;129:3744–55.
15. Margolis RL, Rauch CT, Job D. Purification and assay of cold-stable microtubules and STOP protein. *Methods Enzymol*. 1986;134:160–70.
16. Webb BC. A validated calibration method for hydrogen peroxide vapour sensors. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2001;55:49–54.
17. Aguezzoul M, Andrieux A, Denarier E. Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics*. 2003;81:623–7.
18. Bosc C, Cronk JD, Pirolet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, Margolis RL. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2125–30.
19. Denarier E, Fourest-Lieuvain A, Bosc C, Pirolet F, Chapel A, Margolis RL, Job D. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6055–60.
20. Margolis RL, Rauch CT, Pirolet F, Job D. Specific association of STOP protein with microtubules in vitro and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells. *EMBO J*. 1990;9:4095–102.
21. Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvain A, Denarier E, Pirolet F, Lafanechere L, Job D. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol*. 1998;142:167–79.
22. Delphin C, Bouvier D, Seggio M, Couriol E, Saoudi Y, Denarier E, Bosc C, Valiron O, Bisbal M, Arnal I, Andrieux A. MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J Biol Chem*. 2012;287:35127–38.
23. Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Faure S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvain A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J Biol Chem*. 2006;281:19561–9.
24. Gory-Faure S, Windscheid V, Bosc C, Peris L, Proietto D, Franck R, Denarier E, Job D, Andrieux A. STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins. *J Biol Chem*. 2006;281:28387–96.
25. Gory-Faure S, Windscheid V, Brocard J, Montessuit S, Tsutsumi R, Denarier E, Fukata Y, Bosc C, Delarocche J, Collomb N, Fukata M, Martinou JC, Pernet-Gallay K, Andrieux A. Non-microtubular localizations of microtubule-associated protein 6 (MAP6). *PLoS One*. 2014;9:e114905.
26. Tortosa E, Adolfs Y, Fukata M, Pasterkamp RJ, Kapitein LC, Hoogenraad CC. Dynamic Palmitoylation Targets MAP6 to the Axon to Promote Microtubule Stabilization during Neuronal Polarization. *Neuron*. 2017;94(809–825):e807.
27. Deloulme JC, Gory-Faure S, Mauconduit F, Chauvet S, Jonckheere J, Boulan B, Mire E, Xue J, Jany M, Maucler C, Deparis AA, Montigon O, Daoust A, Barbier EL, Bosc C, Deglon N, Brocard J, Denarier E, Le Brun I, Pernet-Gallay K, Vilgrain I, Robinson PJ, Lahrech H, Mann F, Andrieux A. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat Commun*. 2015;6:7246.
28. Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev*. 2002;16:2350–64.
29. Fournet V, Schweitzer A, Chevarin C, Deloulme JC, Hamon M, Giros B, Andrieux A, Martres MP. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *J Neurochem*. 2012;121:99–114.
30. Volle J, Brocard J, Saoud M, Gory-Faure S, Brunelin J, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr Bull*. 2013;39:969–78.
31. Daoust A, Bohic S, Saoudi Y, Debacker C, Gory-Faure S, Andrieux A, Barbier EL, Deloulme JC. Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse - a model of schizophrenia - and alleviation by Epitholone D treatment, as observed using MEMRI. *Neuroimage*. 2014;96:133–42.
32. Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, Begou M, Pachoud B, Brun P, Gory-Faure S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Hofle G, Job D. Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2006;60:1224–30.
33. Begou M, Brun P, Bertrand JB, Job D, Schweitzer A, D'Amato T, Saoud M, Andrieux A, Suaud-Chagny MF. Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse*. 2007;61:689–97.
34. Delotterie D, Ruiz G, Brocard J, Schweitzer A, Roucard C, Roche Y, Suaud-Chagny MF, Bressand K, Andrieux A. Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology*. 2010;208:131–41.
35. Marty I, Robert M, Villaz M, De Jongh K, Lai Y, Catterall WA, Ronjat M. Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2270–4.
36. Wehland J, Willingham MC, Sandoval IV. A rat monoclonal antibody reacting specifically with the tyrosylated form of alpha-tubulin. I. Biochemical characterization, effects on microtubule polymerization in vitro, and microtubule polymerization and organization in vivo. *J Cell Biol*. 1983;97:1467–75.
37. Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, Pirolet F, Mazarguil H, Job D. Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci*. 1994;107(Pt 6):1529–43.
38. Centeno F, Deschamps S, Lompre AM, Anger M, Moutin MJ, Dupont Y, Palmgren MG, Villalba JM, Moller JV, Falson P, et al. Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in yeast. *FEBS Lett*. 1994;354:117–22.
39. Oddoux S, Brocard J, Schweitzer A, Szentesi P, Giannesini B, Brocard J, Faure J, Pernet-Gallay K, Bendahan D, Lunardi J, Csernoch L, Marty I. Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem*. 2009;284:34918–29.
40. Marty I, Thevenon D, Scotto C, Groh S, Sainnier S, Robert M, Grunwald D, Villaz M. Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem*. 2000;275:8206–12.
41. Giannesini B, Vilmen C, Le Fur Y, Dalmasco C, Cozzone PJ, Bendahan D. A strictly noninvasive MR setup dedicated to longitudinal studies of mechanical performance, bioenergetics, anatomy, and muscle recruitment in contracting mouse skeletal muscle. *Magn Reson Med*. 2010;64:262–70.
42. Pietrangolo L, D'Incecco A, Ainbinder A, Michelucci A, Kern H, Dirksen RT, Boncompagni S, Protasi F. Age-dependent uncoupling of mitochondria from Ca2(+) release units in skeletal muscle. *Oncotarget*. 2015;6:35358–71.
43. Mobley BA, Eisenberg BR. Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J Gen Physiol*. 1975;66:31–45.
44. Loud AV, Barany WC, Pack BA. Quantitative Evaluation of Cytoplasmic Structures in Electron Micrographs. *Lab Invest*. 1965;14:996–1008.
45. Galiano MR, Bosc C, Schweitzer A, Andrieux A, Job D, Hallak ME. Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J Neurosci Res*. 2004;78:329–37.
46. Wang S, Seaberg B, Paez-Colasante X, Rimer M. Defective Acetylcholine Receptor Subunit Switch Precedes Atrophy of Slow-Twitch Skeletal Muscle Fibers Lacking ERK1/2 Kinases in Soleus Muscle. *Sci Rep*. 2016;6:38745.

47. Eastwood SL, Lyon L, George L, Andrieux A, Job D, Harrison PJ. Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. *J Psychopharmacol*. 2007;21:635–44.
48. Guerrero K, Monge C, Bruckner A, Puurand U, Kadaja L, Kaambre T, Seppet E, Saks V. Study of possible interactions of tubulin, microtubular network, and STOP protein with mitochondria in muscle cells. *Mol Cell Biochem*. 2010;337:239–49.
49. Ralston E, Ploug T, Kalhovde J, Lomo T. Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites, and microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J Neurosci*. 2001;21:875–83.
50. Kerr JP, Robison P, Shi G, Bogush AI, Kempema AM, Hexum JK, Becerra N, Harki DA, Martin SS, Raiteri R, Prosser BL, Ward CW. Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nat Commun*. 2015;6:8526.
51. Robison P, Caporizzo MA, Ahmadzadeh H, Bogush AI, Chen CY, Margulies KB, Shenoy VB, Prosser BL. Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science*. 2016;352:aaf0659.
52. Boncompagni S, Thomas M, Lopez JR, Allen PD, Yuan Q, Kranias EG, Franzini-Armstrong C, Perez CF. Triadin/Junctin double null mouse reveals a differential role for Triadin and Junctin in anchoring CASQ to the jSR and regulating Ca(2+) homeostasis. *PLoS One*. 2012;7:e39962.
53. Paolini C, Quarta M, Nori A, Boncompagni S, Canato M, Volpe P, Allen PD, Reggiani C, Protasi F. Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol*. 2007;583:767–84.
54. Cowling BS, Chevremont T, Prokic I, Kretz C, Ferry A, Coirault C, Koutsopoulos O, Laugel V, Romero NB, Laporte J. Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J Clin Invest*. 2014;124:1350–63.
55. Gineste C, Duhamel G, Le Fur Y, Vilmen C, Cozzzone PJ, Nowak KJ, Bendahan D, Gondin J. Multimodal MRI and (31)P-MRS investigations of the ACTA1(Asp286Gly) mouse model of nemaline myopathy provide evidence of impaired in vivo muscle function, altered muscle structure and disturbed energy metabolism. *PLoS One*. 2013;8:e72294.
56. Ottenheijm CA, Buck D, de Winter JM, Ferrara C, Piroddi N, Tesi C, Jasper JR, Malik FI, Meng H, Stienen GJ, Beggs AH, Labeit S, Poggesi C, Lawlor MW, Granzier H. Deleting exon 55 from the nebulin gene induces severe muscle weakness in a mouse model for nemaline myopathy. *Brain*. 2013;136:1718–31.
57. Vedrenne C, Hauri HP. Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic*. 2006;7:639–46.
58. Fourest-Lieuvain A, Rendu J, Osseni A, Pernet-Gallay K, Rossi D, Oddoux S, Brocard J, Sorrentino V, Marty I, Faure J. Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J Cell Sci*. 2012;125:3443–53.
59. Boncompagni S, Protasi F, Franzini-Armstrong C. Sequential stages in the age-dependent gradual formation and accumulation of tubular aggregates in fast twitch muscle fibers: SERCA and calsequestrin involvement. *Age (Dordr)*. 2012;34:27–41.
60. Job D, Fischer EH, Margolis RL. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:4679–82.
61. Wagner R, Fink RH, Stephenson DG. Effects of chlorpromazine on excitation-contraction coupling events in fast-twitch skeletal muscle fibres of the rat. *Br J Pharmacol*. 2004;141:624–33.
62. Vancampfort D, Probst M, De Herdt A, Correia RM, Carraro A, De Wachter D, De Hert M. An impaired health related muscular fitness contributes to a reduced walking capacity in patients with schizophrenia: a cross-sectional study. *BMC Psychiatry*. 2013;13:5.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



PUBLICATION 2

Dynamics of the calcium release complex protein triadin within sarcoplasmic reticulum subdomains in skeletal muscle cells

Muriel Sébastien*, **Perrine Aubin***, Jacques Brocard, Julie Brocard, Isabelle Marty, Julien Fauré

(*) co-auteurs

Cette publication est en cours de révision chez *Molecular Biology of the Cell*, la version présentée peut être soumise à modifications avant publication.

1 **Dynamics of the calcium release complex protein triadin within sarcoplasmic**
2 **reticulum subdomains in skeletal muscle cells**

3 Muriel Sébastien^{1,2*}, Perrine Aubin^{1*}, Jacques Brocard¹, Julie Brocard¹, Isabelle Marty¹,
4 Julien Fauré^{1,3}

5
6 ¹University Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, 38000
7 Grenoble, France

8 ²present address: Department of Biology, McGill University, Montréal, Québec, Canada

9 ³University Grenoble Alpes, Inserm, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut
10 Neurosciences, 38000 Grenoble, France

11 *These authors contributed equally to this work

12
13 **Corresponding author: J.Fauré and I.Marty**

14
15
16 **Running Head:**

17 T95 dynamics in sarcoplasmic reticulum

18
19 **Keywords:**

20 Calcium release complex, sarcoplasmic reticulum, triad, photoactivation

21
22 **Abbreviations :**

23 CRC: Calcium Release Complex, jSR: junctional Sarcoplasmic Reticulum, SR:

24 Sarcoplasmic Reticulum, TM: transmembrane, RyR: Ryanodine Receptor, DHPR:

25 Dihydropyridine Receptor

26 **ABSTRACT**

27

28 In skeletal muscle, proteins of the calcium release complex (CRC) responsible for the
29 Excitation-Contraction (EC) coupling are exclusively localized in specific reticulum-plasma
30 membrane contact points named triads. The CRC protein Triadin (T95) is localized in the
31 sarcoplasmic reticulum (SR) subdomain of triads where it forms large multimers. However
32 the mechanisms leading to the steady state accumulation of T95 in these specific areas of
33 SR are largely unknown. To visualize T95 dynamics, fluorescent chimeras were expressed
34 in triadin knock-out myotubes, and their mobility was compared to the mobility of Sec61 β ,
35 a membrane protein of the sarcoplasmic reticulum unrelated to the EC coupling process.
36 At all stages of skeletal muscle cells differentiation, as well as in adult muscle, we show
37 that a part of the T95 pool is mobile and diffuse in SR membranes to progressively
38 accumulate in triads in which it is retained thanks to its transmembrane domain.

39

40 INTRODUCTION

41 Skeletal muscle contraction is triggered by a massive calcium release from intracellular
42 stores upon plasma membrane depolarization. This phenomenon, known as the
43 Excitation-Contraction (EC) coupling, occurs in specific sites of skeletal muscle called
44 triads. Each triad consists of two reticulum terminal cisternae, named junctional
45 sarcoplasmic reticulum (jSR), flanking a single invagination of the plasma membrane, the
46 transverse-tubule (T-tubule) (Flucher, 1992). From a structural point of view triads are
47 contact points between T-tubule membranes and the jSR, where proteins of the
48 multimolecular Calcium Release Complex (CRC) are located. The sharp organization of T-
49 tubule and jSR membranes is of utmost importance because it allows a physical crosstalk
50 between the two main components of the CRC that are each anchored in a different
51 membrane compartment: the voltage-gated channel dihydropyridine receptor (DHPR) in
52 the T-tubule, and the intracellular calcium channel ryanodine receptor 1 (RyR1) in the jSR
53 (Franzini-Armstrong and Jorgensen, 1994). As a consequence of this organization, the
54 structural modification of DHPR induced by membrane depolarization can mechanically
55 trigger the opening of RyR1 (Flucher and Franzini-Armstrong, 1996; Marty et al., 1994). In
56 addition to both channels, the CRC includes several regulatory proteins like calsequestrin,
57 junctin, triadin, which can modulate RyR1 function or the organization of the molecular
58 complex. Interestingly in skeletal muscles all proteins of the CRC are exclusively localized
59 in the triad membranes, without a clear view on the underlying mechanisms.

60 Muscle fibers are long and multinucleated cells with a specific endomembrane system
61 (Villa et al., 1993). The reticulum of a muscle cell is a continuum of membranes spread
62 throughout the entire fiber and wrapping the actomyosin fibrils (Ogata and Yamasaki,
63 1997). It is specialized into sub-domains either ubiquitously present in mammalian cells,
64 like rough endoplasmic (ER) reticulum for protein synthesis, or specific to the calcium
65 cycle of the fiber, like longitudinal SR and jSR (Kaisto and Metsikkö, 2003; Rahkila et al.,

66 1996; Sorrentino, 2011). In the context of a highly differentiated membrane system, the
67 traffic of CRC proteins to reach the jSR after their synthesis has so far remained
68 controversial (Barone et al., 2015; Fu and Hong, 2016), previous work suggesting either
69 vesicular trafficking (Nori et al., 2004) or diffusion within SR (McFarland et al., 2010).
70 Moreover, once proteins of the CRC are localized in the jSR, the specific mechanisms that
71 may confine them in this sub-compartment are also unclear. Previous studies suggested
72 that building of multiple protein-protein interactions within CRC and with external partners
73 could contribute to this anchoring in jSR and that the localization of CRC proteins within
74 jSR during differentiation was accompanied by a drastic reduction in their mobility
75 (Cusimano et al., 2009). Despite these data, the mechanisms leading to the confined
76 localization of CRC components in membrane sub-compartments such as the jSR are still
77 elusive, as well as their specific dynamics within a mature SR network as compared to non
78 jSR reticulum protein.

79

80 To better understand the molecular bases leading to CRC formation and function, we have
81 studied here the dynamic behavior of the triadin protein and compared it to another SR
82 protein unrelated to EC coupling, Sec61 β . Triadin (Trisk95 or T95), is the largest of the four
83 isoforms obtained from alternative splicing of the *TRDN* gene (Marty et al., 2000;
84 Vassilopoulos et al., 2005). It is a type II transmembrane protein composed of a short N-
85 terminal domain, a single transmembrane (TM) domain, and a long intraluminal domain
86 that is able to form multimers and directly link calsequestrin and RyR1 (Knudson et al.,
87 1993; Kobayashi et al., 2000; Lee et al., 2004; Marty et al., 2009). T95 is specifically
88 expressed in jSR of skeletal muscle triads, where it plays a regulatory role on the RyR1
89 channel activity (Rezgui et al., 2005), and a structural role in jSR membranes (Fourest-
90 Lieuvin et al., 2012). It was proposed that T95 anchoring at the triad could represent a first

91 event in the building of the CRC complex (Cusimano et al., 2009) and that some T95
92 domains may be responsible for its retention in the jSR (Rossi et al., 2014). To directly
93 explore T95 dynamics and anchoring at the triad, fluorescent versions of T95 were
94 expressed in cultured myotubes and adult fibers from *TRDN* knock-out (KO) animals. The
95 accumulation of T95 in triads has been visualized by using a photoactivatable form of the
96 molecule. Our results demonstrate the existence of a constant flux of T95 in- and out- of
97 jSR membranes, that is coupled to a retention mechanism driven by the TM domain of T95
98 in the jSR to create to the steady state localization of the molecule.

99

100 RESULTS

101 Triad organization and T95 behavior during cell differentiation

102 To study T95 dynamic inside a mature SR membrane system, fluorescent versions of T95
103 were expressed in primary myotubes cultured from *TRDN* KO mice, thus avoiding
104 competition between the recombinant and endogenous proteins for localization in the jSR,
105 a sub-compartment of limited size. The cultured myotubes were observed at two
106 developmental stages, 3 days of differentiation (DIF3) when they are still immature, and 9
107 days (DIF9), when the overall organization of triads is close to the organization of an adult
108 muscle fiber (Fig. 1A). We had previously shown that in adult muscles of *TRDN* KO mice
109 triad organization is unaffected at the macroscopic level (Oddoux et al., 2009), and first
110 confirmed that the absence of endogenous T95 did not alter the presence nor the
111 organization of triads in cultured myotubes, as shown by RyR1 staining which displays
112 double rows of dots intertwined with the Z-disc marker alpha-actinin at DIF9 (Fig. 1A).
113 Moreover, the localization of a GFP-tagged version of T95 in *TRDN* KO cultured myotubes
114 was identical to the labeling of endogenous triadin in WT cells (Fig. S1). Video-microscopy
115 experiments were next undertaken to follow T95-GFP dynamics in DIF3 and DIF9
116 myotubes (Fig. 1B). The movies showed clusters of T95-GFP, similar to the clusters
117 detected by immunolabeling on fixed cells. However, in DIF3 myotubes only a few T95-
118 GFP clusters movements were detectable while no mobile clusters were visible at DIF9
119 during the 10 min recording (Fig. 1B). To determine if a fraction of the T95-GFP expressed
120 in DIF9 myotubes was mobile but undetected by video-microscopy, we used FRAP
121 experiments. After bleaching small areas, a partial recovery of the fluorescence was
122 recorded, and the T95-GFP mobile fraction was estimated at 16% (Fig. S2). These results
123 confirmed that only a small fraction of T95-GFP is under motion when expressed in DIF9
124 *TRDN* KO myotubes, and that simple video microscopy tracking of the T95-GFP is not
125 sensitive enough to uncover its dynamics.

126

127 **T95 dynamics in SR membranes**

128 To observe T95 movements, we turned to a photoactivatable version of the protein (T95-
129 PAGFP) (Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002) and decided to compare its behavior to
130 that of two recombinant proteins Sec61 β -PAGFP and PAGFP-KDEL, which served as
131 controls of SR proteins dynamics since they are unrelated to the EC coupling process and
132 localized in different SR compartments. Sec61 β is a subunit of the translocon, a type II
133 transmembrane protein of the reticulum with a single transmembrane domain present in
134 whole SR membrane (Greenfield and High, 1999; Rapoport et al., 1996). PAGFP-KDEL is
135 localized in the lumen of the reticulum, thanks to its signal sequence and a KDEL retention
136 motif (Munro and Pelham, 1987) (Fig. 2A).

137 All the photoactivatable constructs were expressed at a similar level, and displayed their
138 expected localization in DIF3 and DIF9 myotubes (Figs. 2B-C). T95-PAGFP localizes with
139 the jSR marker RyR1 in scattered clusters in the immature myotubes (DIF3) or in
140 organized double rows of dots in mature myotubes (DIF9) (Figs. 2C-D). Sec61 β -PAGFP
141 and PAGFP-KDEL did not colocalize with RyR1 and showed diffuse labeling (Fig. 2C).
142 Moreover, PAGFP-KDEL showed denser striations in between RyR1 dots, therefore
143 marking the longitudinal SR (Figs. 2C-D). In the subsequent experiments, a red version of
144 the KDEL construct (DsRed-KDEL) was used in combination with all photoactivatable
145 proteins in order to label longitudinal SR and confirm that observed myotubes are mature.
146 Photoactivation was achieved with a single 405nm laser pulse in a large region of interest
147 (ROI) in myotubes expressing PAGFP-tagged constructs and the fluorescent molecules
148 were followed for 169 seconds (Fig. 3A). The fluorescence of PAGFP-KDEL molecules
149 initially detected in the ROI rapidly faded away after activation in both DIF3 and DIF9
150 myotubes (Fig. S3A and movies 1-2), as expected for a peptide freely diffusing in the SR
151 lumen. Immediately after activation, Sec61 β -PAGFP showed a diffuse fluorescence inside

152 the ROI that decreased over time, and a wave of fluorescence was observed spreading
153 outside the ROI in both DIF3 and DIF9 myotubes (Fig. 3B, and movies 3-4). In contrast, for
154 T95-PAGFP the initial fluorescent patterns of activated proteins in the ROI were either
155 scattered dots in DIF3 myotubes or double rows of dots in DIF9 myotubes and no
156 spreading of fluorescence outside the ROI was observed (Fig. 3C and movies 5-6). For the
157 three molecules, the fluorescence decrease in the activated ROI was fitted with an
158 exponential decay curve, and the half time to decay ($t_{1/2}$) was calculated (Table 1 and Fig.
159 S3B). Values of $t_{1/2}$ for T95-PAGFP and Sec61 β -PAGFP were much higher than the ones
160 recorded for PAGFP-KDEL, reflecting differences in the mobility of proteins localized within
161 the lumen or in the membrane of SR. Comparison of $t_{1/2}$ values suggested that T95-
162 PAGFP mobility was more restricted than that of Sec61 β -PAGFP. Although both molecules
163 have a single transmembrane domain, they differ in their topology and molecular weight,
164 and we wondered if the restricted diffusion of T95 could in fact arise from steric hindrance
165 due to its much longer C-terminal luminal part (Fig. 2A). To test this hypothesis, we
166 investigated with the same protocol the mobility of a truncated version of T95 missing most
167 of its luminal region (T95 Δ Cter, deletion of amino acid 113 to the C-terminal end) (see
168 scheme on Fig. 6A). In DIF3 myotubes, T95 Δ Cter-PAGFP fluorescence in the ROI rapidly
169 decreased over time, while in DIF9 myotubes a small decrease of fluorescence could be
170 observed in the ROI together with spreading of a wave of fluorescence outside the ROI
171 (Fig. S3C and movies 7-8). Calculated $t_{1/2}$ for T95 Δ Cter-PAGFP were respectively close to
172 that of Sec61 β -PAGFP in DIF3 myotubes and no different from T95-PAGFP in DIF9
173 myotubes (Table 1 and Fig. S3B). Of note T95 Δ Cter shows the same pattern of triad
174 localization than full length T95 at DIF9 (Fig. S3C, and see later T95-PAGFP on Fig. 3C).

175

176 These experiments strongly suggested that although behaving like a Sec61 β in immature
177 (DIF3) myotubes, T95 Δ Cter acquires some of the properties of full length T95 as the
178 myotube differentiate: a triad localization and in a restricted mobility as compared to
179 Sec61 β . Hence, the restricted mobility of T95 as compared to Sec61 β cannot be entirely
180 attributed to steric hindrance due to its long luminal domain but rather to specific molecular
181 properties, at least in a mature SR.

182

183 **T95 diffuses in SR membranes and is trapped in the triads**

184 In the previous experiments, the fact that no fluorescence was detected outside the ROI
185 after activation of T95-PAGFP correlated with the low mobile fraction previously calculated
186 by FRAP (Fig. S2) and suggested that too few T95-PAGFP activated molecules had left
187 the ROI to be detected. To directly observe T95 mobility we reasoned that more
188 fluorescent T95-PAGFP needed to be activated and designed a protocol where
189 photoactivation in a smaller ROI was performed iteratively during the video recording (one
190 laser pulse every four movie frames), instead of using a single laser pulse (Fig. 4).

191 Repetitive activation of Sec61 β -PAGFP in small ROIs resulted in diffuse fluorescence
192 inside the ROI that progressively spread throughout the cell as a wave (Fig. 4A and
193 movies 9-10). This suggested a fast isotropic diffusion of Sec61 β -PAGFP in all SR
194 membranes, which was confirmed by colocalization with DsRed-KDEL on the average
195 intensity projection images (Fig. 4A). Two parameters were quantified to describe these
196 movements: the speed of the wave of fluorescence, and the fluorescence decay rate as a
197 function of the distance from the photoactivation zone (Figs. S4A and S5A).

198 For T95-PAGFP, repetitive activation of a small ROI led to more complex observations.
199 First, after the initial fluorescence activation, a continuous decrease within the ROI was
200 observed (Fig. 4B). This was interpreted as photobleaching of the slowly mobile or

201 motionless T95-PAGFP with repetitive laser pulses in the same ROI. Second, the initial
202 fluorescence inside the ROI was followed by a fluorescence wave that diffused outside the
203 ROI and became rapidly undetectable (Fig. 4B, and movies 11-12). When the speed of the
204 wave of fluorescence and the fluorescence decay rate were calculated, it was obvious that
205 this fluorescence was short-lived and did not spread more than 3 μm away from the ROI
206 (Figs. S4B and S5B). The speed of the wave for T95-PAGFP was very similar to the speed
207 for Sec61 β -PAGFP in DIF3 myotubes whereas it seemed slower in DIF9 myotubes (Figs
208 4C, S4Ac and S4Bc for DIF3; S5Ac and S5Bc for DIF9). The recorded fluorescence decay
209 rates for T95-PAGFP in both DIF3 and DIF9 myotubes were significantly higher than the
210 rates measured for Sec61 β -PAGFP (Figs 4D, S4Ad and S4Bd for DIF3; and S5Ad and
211 S5Bd for DIF9). Finally, clusters of more intense fluorescence were detected outside the
212 ROI in both DIF3 and DIF9 myotubes (arrowheads on average intensity projections Fig.
213 4B, and movies 11-12). This showed that T95-PAGFP activated in the ROI reached
214 specific spots located at distance from the activation zone. Comparison of T95-PAGFP
215 with DsRed-KDEL localization on the average intensity projection showed no overlaps, but
216 in DIF9 myotubes the clusters of T95-PAGFP were organized in rows on both sides of the
217 DsRed-KDEL striations, which is characteristic of triad organization (Fig. 4B, DIF9 Average
218 image).

219 Overall, we concluded that these experiments allowed to directly visualize a diffusion and
220 accumulation of T95 in jSR: 1-the detection of clusters of T95-PAGFP corresponding to
221 triads outside the ROI showed that molecules of T95-PAGFP activated in the ROI had
222 reached distant jSR membranes and became trapped and 2- the detection of the
223 spreading of an isotropic wave of T95-PAGFP fluorescence similar to what is observed
224 during diffusion of Sec61 β -PAGFP strongly suggested that T95 diffuses in SR membranes
225 before reaching jSR.

226

227 **T95 diffuses and is trapped in the triads of adult muscle fibers**

228 Although mature cultured myotubes represent a good model to observe CRC proteins
229 dynamics, they may not recapitulate all phenomena taking place in an adult muscle. We
230 next wondered if the dynamic behavior of T95 so far described by our experiments could
231 also be observed in a mature muscle fiber. To this end, T95-PAGFP and DsRed-KDEL
232 were expressed in *flexor digitorum brevis* (FDB) muscles of adult *TRDN*-KO mice using an
233 electroporation protocol (DiFranco et al., 2009). Iterative activations of T95-PAGFP with
234 laser pulses in a small ROI induced a fluorescence wave detected outside the ROI,
235 together with photobleaching in the ROI, reminiscent of what was obtained in DIF9
236 myotubes (Fig. 5 and movie 13). Observation of time-lapse images also showed the
237 accumulation of fluorescence in clusters outside the ROI. These clusters were easily
238 detected on the average intensity projection image as well-aligned dots that are typical for
239 triad labeling in muscle fibers (Fig. 5, arrowheads). This experiment strongly suggested
240 that a fraction of the T95-PAGFP is also permanently diffusing in the SR of adult muscle
241 fibers, just as it is in DIF9 myotubes, before accumulating in triad membranes.

242

243 **T95 resides at the triads thanks to its transmembrane domain**

244 Previous experiments allowed the recording of a permanent flux of T95 within
245 endomembranes of muscle cells, together with a progressive accumulation of T95 in jSR.
246 We next investigated the molecular motifs that could account for the acquisition of a longer
247 residence time for T95 when it reaches jSR membranes. The C-terminal luminal domain of
248 T95 is involved in oligomerization and binding to other CRC proteins, and could therefore
249 play a role in T95 targeting to jSR (Fourest-Lieuvain et al., 2012; Rossi et al., 2014). Our
250 previous experiment suggested that removing most of the C-terminal luminal part of T95
251 did not affect its apparent steady state localization in triads, as observed on images of

252 photoactivation (Fig. S3C). The quantification performed by immunolocalization showed
253 that the relative amount of T95 Δ Cter colocalized with RyR1 reached 80% of the T95/RyR1
254 colocalization (Fig. 6D). In comparison, due to Sec61 β diffuse pattern of expression,
255 Sec61 β and RyR1 colocalization was quantified at 55% of the T95/RyR1 colocalization
256 (Fig. 6D). These experiments suggested that motifs present in the first 113 amino acids of
257 T95 were sufficient to drive the localization of T95 Δ Cter at the triad. As Sec61 β and T95
258 have the same TM domain length, we decided to swap them in order to test if T95 TM may
259 confer triad localization to a Sec61 hybrid molecule, and if its removal induces a
260 delocalization of T95 Δ Cter (Fig. 6A). Sec61^{TM-T95} and T95 Δ Cter^{TM-Sec61} hybrids molecules
261 were produced and expressed in cultured DIF9 myotubes (Fig. S6). The T95 Δ Cter^{TM-Sec61}
262 construct accumulated in small clusters clearly different from RyR1-labeled triads (Figs.
263 6B-C-D). Strikingly, Sec61^{TM-T95} formed double rows of clusters that were colocalized with
264 RyR1 (Figs. 6B-C). Moreover, the respective levels of colocalizations of Sec61^{TM-T95} and
265 T95 Δ Cter with RyR1 were not different (Fig. 6D). We concluded that replacing the TM
266 domain of Sec61 β with the one of T95 induced the localization of the Sec61^{TM-T95} hybrid in
267 the triads demonstrating that TM domain of T95 is the main molecular motif responsible for
268 its anchoring in jSR.

269 **DISCUSSION**

270 In skeletal muscle, the EC coupling process is mediated by the CRC localized in triad
271 membranes (Flucher, 1992; Flucher et al., 1992; Villa et al., 1993). Reticulum proteins of
272 the CRC are exclusively localized in specific subdomains, the jSR, but the mechanisms by
273 which they are confined there are elusive, as well as their dynamic within the SR
274 membranes. One major difficulty to address these questions is that upon observation, a
275 majority of CRC proteins are localized in triads where they show a low mobility (Cusimano
276 et al., 2009). Nevertheless, the visualization of the small fraction of mobile CRC proteins is
277 important to understand how they can reach the triad and be retained there. To explore the
278 dynamic behavior of triadin (T95), we expressed T95 fluorescent chimeras in *TRDN* KO
279 myotubes or adult muscles. We confirm in our experimental system that only a small
280 proportion of T95 is mobile, which explains why video-microscopy cannot be used for this
281 study. We therefore followed small pools of a photoactivated fluorescent T95 chimera
282 (T95-PAGFP), and compared their dynamic behaviors to other proteins of the SR, whose
283 traffic is unrelated to EC coupling.

284 **T95 can diffuse in SR membranes**

285 Our first goal was to characterize the dynamic behavior of T95. Single laser pulse
286 photoactivation experiments could theoretically uncover the dynamic of PAGFP chimeras
287 expressed in myotubes in 2 ways: the direct observation of protein movement outside the
288 ROI and the decrease of fluorescence inside the ROI. T95-PAGFP movement was hardly
289 detectable outside the activated ROI, in contrary to movement of PAGFP-KDEL or
290 Sec61 β -PAGFP. However, T95-PAGFP dynamics could be evaluated with half time to
291 fluorescence decay ($t_{1/2}$) within the ROI, which was comparable, to that of Sec61 β -PAGFP,
292 a protein known to diffuse within the reticulum membrane (Cui et al., 2015). This
293 comparison suggested that mobile T95 molecules were undergoing diffusion in the SR

294 membranes. When iterative photoactivation in a ROI were next performed, the movement
295 of T95-PAGFP outside the ROI became detectable, and their analysis confirmed a
296 diffusion mechanism. In young (DIF3) and mature (DIF9) myotubes, the movement of
297 Sec61 β -PAGFP was characterized by a wave of fluorescence spreading isotropically. The
298 same pattern of isotropic diffusion was found for waves of T95-PAGFP fluorescence,
299 although it could be followed on a smaller distance. The speed of diffusion of these waves
300 was comparable for Sec61 β -PAGFP and T95-PAGFP in young myotubes, but seemed
301 slower for T95-PAGFP in mature myotubes. Importantly during these experiments, ROI
302 were selected in random locations showing that diffusion of T95-PAGFP is not restricted to
303 specific areas of the myotubes and suggesting the existence of a permanent flux of T95
304 molecules in SR.

305 **T95 acquisition of a long residence time in jSR membranes**

306 The comparison of Sec61 β -PAGFP and T95-PAGFP dynamics after photoactivation also
307 demonstrated that in addition to diffusion, T95-PAGFP acquires a long residence time
308 whenever reaching jSR. During iterative photoactivation, the calculated fluorescence
309 decay rate was stronger for T95-PAGFP at both stages of myotubes differentiation.
310 Because the speed of diffusion of the wave of Sec61 β -PAGFP and T95-PAGFP
311 fluorescence was similar, one can assume that the enhanced fluorescence decay rate
312 observed for T95-PAGFP is not due to an accelerated diffusion. More likely, this decay rate
313 arises from a restriction in the movement of a part of the activated pool of T95-PAGFP.
314 Accordingly T95-PAGFP fluorescence was locally strongly enhanced in spots outside the
315 ROI, whose localization is typical for triads: at DIF3 these clusters are spread in the whole
316 cell, whereas at DIF9 they were aligned on each side of the Z-discs. Therefore, our
317 experiments suggest that even if T95-PAGFP can constantly diffuse in SR membranes, it
318 acquires a longer residence time in jSR membranes and part of the activated T95-PAGFP

319 progressively accumulates in jSR. The fact that the same phenomenon was observed in
320 adult muscles indicates that this hypothesis is not restricted to developing myotubes. Our
321 experiments thus suggest that the constitution of the T95 pool inside jSR membranes in
322 skeletal muscle results from an equilibrium between constant fluxes of T95 molecules
323 diffusing in and out of triads, where a specific mechanism confines T95 molecules.

324 **T95 domains involved in jSR localization**

325 Previous studies have highlighted the molecular properties of T95 and several domains
326 could be involved in the mechanisms leading to the confinement of T95 in jSR
327 membranes. Multimerization of T95 via disulfide bridges was suggested to contribute to
328 triad formation (Froemming et al., 1999; Marty, 2015) and may represent a mechanism by
329 which T95 residence time in jSR is enhanced. However, we show that deletion of the
330 majority of the luminal sequence of T95, which contains the reactive cysteines of the
331 protein, does not change the localization of T95 Δ Cter. Of note, the T95 C-terminal domain
332 also contains the motifs responsible for interaction with other proteins such as
333 calsequestrin and RyR1 (Knudson et al., 1993; Kobayashi et al., 2000; Lee et al., 2004;
334 Marty et al., 2009, 1994), or the structural protein Climp-63 (Osseni et al., 2016). Neither
335 multimerization via disulfide-bridges nor binding to known interactors seems required for
336 T95 localization at the triad. However these motifs contribute to the mobility of T95 in the
337 SR because: 1- it has previously been shown that a version of T95 deleted from its C-
338 terminus interaction motif and mutated on its cysteines has an enhanced mobility in
339 muscle fibers (Fourest-Lieuvain et al., 2012; Rossi et al., 2014) and 2- in this study the
340 removal of the luminal domain of T95 confers to T95 Δ Cter-PAGFP a rate of diffusion
341 similar to the rate of Sec61 β in immature (DIF3) myotubes.

342 Nevertheless we show that removing the TM domain of T95 Δ Cter strongly reduces its
343 localization at the jSR, while replacing the TM domain of Sec61 β by T95's one confers to

344 Sec61^{TM-T95} hybrid a jSR membrane localization. This directly proves that it is the TM
345 domain of T95 that is the main driver for the protein localization. The intimate mechanisms
346 leading to retention in jSR through such a hydrophobic domain has to be deciphered but
347 may involve direct molecular interactions with other proteins, a mechanism described for
348 two proteins of the longitudinal part of skeletal muscle SR, phospholamban and SERCA
349 (Martin et al., 2018), or interaction with the jSR membrane lipids. Indeed, the specific lipid
350 composition of the jSR membrane could affect the dynamic of its protein components, and
351 the lipid bilayer thickness of intracellular organelles is known to contribute to segregation
352 of proteins according to their TM domain size (Sharpe et al., 2010).

353

354 **Model for T95 localization during SR differentiation**

355 Overall, our set of experiments supports a model in which T95 diffuses in SR membranes
356 before being trapped in jSR, a mechanism contributing to a general turnover of T95 in jSR
357 in adult muscle. Interestingly, specific features were observed in developing myotubes
358 during this study. First, when T95-GFP was followed by video microscopy experiments, a
359 few vesicular movements were detected in young (DIF3) myotubes, that were absent in
360 mature (DIF9) myotubes. One cannot exclude that the mobility of T95 proteins may rely on
361 vesicular trafficking as well as diffusion inside membranes of the SR, albeit in variable
362 proportions as the muscle cells differentiate. Such a switch in trafficking mechanisms
363 between different stages of muscle cells differentiation was already proposed for
364 phospholamban, a modulator of the muscle calcium ATPase (Stenoien et al., 2007).
365 Second, the comparison of PAGFP-chimeras dynamics between young and mature
366 myotubes also revealed that the dynamics of T95, Sec61 β and KDEL evaluated with $t_{1/2}$
367 (Table 1) were all slowed down at the same rate (67%) in mature myotubes. This shows
368 that a phenomenon affecting whole SR properties is responsible for lowering the mobility
369 of the three molecules. During myoblast differentiation, the SR becomes tethered to the

370 contractile acto-myosin apparatus (Bagnato et al., 2003) which fills an important part of the
371 cell cytoplasm. A reduction in the space occupied by the SR may explain the reduction in
372 mobility of SR proteins. The apparition within the SR of sub-compartments, such as jSR,
373 with specific structure or composition that would limit diffusion of molecules could also
374 explain this drop in mobility during differentiation. Such a mechanism was suggested to
375 explain the local retention of cargos destined to secretion in the ER of neurons (Cui-Wang
376 et al., 2012). The authors of this work pointed that the reticulum molecule Climp-63 played
377 a pivotal role in the building of reticulum zone whose molecular complexity could hinder
378 cargos mobility. Interestingly we recently showed that Climp-63 interacts with T95 (Osseni
379 et al., 2016), and that removing the interaction motif of T95 with Climp-63 enhanced T95
380 mobility (Fourest-Lieuvain et al., 2012). The modulation of SR properties or composition
381 during muscle cell differentiation could therefore alter T95 properties regarding jSR
382 membrane. Along these lines, we show here that the dynamic behavior of T95 Δ Cter that is
383 close to Sec61 β in DIF3 myotubes, shifts to a behavior close to full length T95's one in
384 DIF9 myotubes showing that the acquisition of jSR retention due the TM domain requires
385 an underlying mechanism due to myotube differentiation.

386

387

388 Overall the present study demonstrates in a model of mature myotubes, as well as in adult
389 muscle fibers, the dynamic behavior of T95. It allowed a direct visualization of T95
390 movement in SR and suggests that T95 can diffuse in SR membranes before being
391 trapped in the triads (Fig. 7). The model we proposed also implies that a permanent flux of
392 T95 may be responsible for the steady state composition of the CRC. The molecular
393 mechanisms leading to the exclusive localization of T95 in jSR involve the presence of its
394 TM segment, suggesting that the composition of jSR may be important in this process. The

395 question whether other components of the CRC follow the same traffic and retention
396 mechanisms remains open, especially for the giant RyR1 tetrameric calcium channel.
397

398 **MATERIEL AND METHODS**

399 ***Antibodies and immunolabeling***

400 Polyclonal antibodies against triadin and RyR1 were described previously (Marty et al.,
401 1994; Vassilopoulos et al., 2005). Monoclonal antibodies against RyR1, GFP, alpha-actinin
402 and β -tubulin were purchased from Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB,
403 #34C), Abcam (#ab290) and Sigma (#A7811 and #T5201), respectively.

404 After fixation with 4% PFA, the differentiated cells were permeabilized for 15 min in PBS
405 supplemented with 1% triton X-100 and saturated for 30min in PBS with 0.1% Triton X-
406 100, 0.5% BSA, and 2% goat serum. Incubations with primary and secondary antibodies
407 were done in the saturation buffer overnight at 4°C and for 2h at room temperature,
408 respectively.

409

410 ***Plasmids and lentivirus production***

411 Full-length rat T95 (accession number #AJ243304) and the mutant T95 Δ Cter were cloned
412 in a pcDNA3.1 plasmid backbone as previously described (Fourest-Lieuvain et al., 2012;
413 Marty et al., 2000). The pPAGFP-N1 plasmid was a gift from Jennifer Lippincott-Schwartz
414 (Addgene plasmid # 11909 ; <http://n2t.net/addgene:11909> ; RRID:Addgene_11909) while
415 pDsRed2ER was purchased from Clontech (#632409). pWPXLd was a gift from Didier
416 Trono (Addgene plasmid #12258; <http://n2t.net/addgene:12258> ; RRID:Addgene_12258)
417 and tdTomato-Sec61-N-18 was a gift from Michael Davidson (Addgene plasmid #58130;
418 <http://n2t.net/addgene:58130> ; RRID:Addgene_58130). The plasmids were amplified by
419 transformation in Stbl3 bacteria and purified with Macherey-Nagel maxi kit (#740424).

420 PAGFP-T95 in the lentiviral vector pWPXLd (PAGFP-T95pW) was produced by digestion
421 of T95 by EcoRI, ligation in pPAGFP-N1 and insertion in pWPXLd with In-Fusion cloning
422 kit (Clontech) after removal of GFP. The Sec61 β and the mutant T95 Δ Cter cDNA
423 sequences were produced by PCR amplification and inserted by recombination in place of

424 T95 in PAGFP-T95pW. Hybrid sequences were obtained from Genscript and inserted in
425 place of T95 in PAGFP-T95pW.

426 The lentiviral vectors were produced by a triple transfection of pWPXLd, psPAX2 and
427 pCMV-VSV-G in HEK293T, as described previously (Osseni et al., 2016). Titrations were
428 done with an accuri6 cell counter for constitutively fluorescent constructs, and with a
429 confocal microscope equipped with a FRAP module and a 405 nm laser for photo-
430 activatable constructs.

431

432 ***Animals***

433 The *TRDN* KO mice described previously (Oddoux et al., 2009) were used to produce
434 wildtype (WT) and *TRDN* KO littermates. All procedures using animals were approved by
435 the Institutional ethics committee and followed the guidelines of the National Research
436 Council Guide for the care and use of laboratory animals.

437

438 ***Western blot analysis***

439 The presence of T95, Sec61 β , KDEL, T95 Δ Cter, T95 Δ Cter^{TM-Sec61} and Sec61^{TM-T95} in
440 triadin KO cells was assayed by Western blot analysis, using a chemiluminescent reagent
441 after electrophoretic separation of the protein on a 12% acrylamide gel and electrotransfer
442 on Immobilon P (Millipore) (Oddoux et al., 2009). The signal was compared to the amount
443 of β -tubulin. The secondary antibody were labeled with horseradish peroxidase and
444 supplied by Jackson ImmunoResearch Laboratories.

445

446

447 ***Cell culture and transduction***

448 Satellite cell preparations were performed as previously described from hind limbs of new
449 born pups (Marty et al., 2000). Cells (50,000 cells/dish) were seeded on matrigel (BD,

450 1:100 dilution) coated ibidi dishes (#81156 Biovalley - Clinisciences) in HamF10 (Life
451 Technologies) supplemented with 20% Foetal Bovine Serum (Life Technologies) and 1%
452 penicillin/streptomycin. The cells were transduced with lentivirus before induction of
453 differentiation (DMEM supplemented with 2% horse serum and 1%
454 penicillin/streptomycin). After two days of differentiation, a second layer of matrigel (dilution
455 1:3) was added on the cells and the differentiation medium was supplemented with 50
456 ng.ml⁻¹ of agrin (R&D Systems) as described previously (Falcone et al., 2014; Pimentel et
457 al., 2017)

458

459 ***Electroporation and fiber dissociation***

460 Mice *flexor digitorum brevis* (FDB) muscles were electroporated as described before
461 (DiFranco et al., 2009), by injection of 100µg pPAGFP-T95 and 56µg pDsRed-KDEL. FDB
462 muscles were dissected five days after electroporation, dissociated enzymatically for 45
463 min at 37°C in 1.5 mg ml⁻¹ collagenase (Sigma) then mechanically, and the fibers were
464 plated on ibidi dishes (#81156 Biovalley - Clinisciences) for analysis.

465

466 ***Photoactivation and video-microscopy experiments***

467 For photoactivation and video-microscopy experiments, cells differentiated for 3 (DIF3,
468 young myotubes) or 9 (DIF9, mature myotubes) days were placed in fresh medium devoid
469 of phenol red at least 1h prior to observations. Cell monitoring was performed on a 37°C
470 heating plate, with a Zeiss LSM710 confocal microscope. A 63x 1.40 N.A. Plan-
471 Apochromat oil immersion objective and a pinhole aperture of 1 Airy unit were used.

472 For video-microscopy experiments, cells were monitored with an image every 15 seconds
473 for 10.6 minutes.

474 For single photoactivation experiments, three images were acquired before PAGFP
475 activation in the region of interest (ROI) with 50% power of the 405 nm laser. Laser scan

476 speed and gain parameters were the same for the acquisition of all photo-activated
477 constructs. All images were acquired without any averaging. Single activated cells were
478 monitored with an image every 4 seconds for 169 seconds. Each time-lapse has been
479 corrected for photo-bleaching and normalized between 1 and 0 (0 being the baseline
480 before photo-activation and 1 the intensity right after activation). The obtained curves were
481 fit to an exponential decay from which half-time values ($t_{1/2}$) were extracted.

482 For iterative photoactivation experiments, activated cells were acquired every 2 seconds
483 for 87 seconds with an activation every 4 images. Fluorescence intensities (Figs. S4-S5)
484 were measured within concentric squares drawn around the initially photoactivated ROI
485 and plotted against time. For each colored curve - corresponding to each concentric
486 square - a temporal maximum was detected and associated to the distance vis-à-vis the
487 initial ROI. After plotting mean delays to maximum fluorescence for each concentric
488 square, a linear regression performed with the GraphPad Prism 6.0 software enabled for
489 the calculation of a slope and thus the speed of fluorescence wave, following the equation
490 indicated.-

491 Alternatively, fluorescence values at the time of maximal fluorescence observed in each
492 concentric square and normalized to that observed in the first square, gave rise to a plot
493 that could be fit with an exponential decay using the GraphPad Prism6.0 software. The k
494 parameter of the plot was estimated, and thus a decay rate, following the equation
495 indicated.

496

497 ***FRAP on differentiated myotubes***

498 Live-cell video recordings were performed using an inverted microscope (Axio Observer,
499 Zeiss) coupled to a spinning-disk confocal system (CSU-W1-T3, Yokogawa, pinhole
500 aperture of 1 Airy units) connected to wide-field electron-multiplying CCD camera (ProEM+
501 1024, Princeton Instrument) and maintained at 37 °C and 5% CO₂. Images were taken at

502 1 Hz for 60 s using a 63x oil-immersion objective (1.46 NA). The raw fluorescence values
503 from the unbleached area were subtracted from the values obtained in the photobleached
504 areas. The values were then normalized to 0-100%, with 100% corresponding to the
505 fluorescence value recorded just before photobleaching and 0% just after. A non-linear fit
506 with an unconstrained model "One site binding - Specific binding" from GraphPad Prism
507 6.0 was applied and indicated Bmax values for each experiment. To obtain a more
508 accurate mean value, square roots of Bmax values were then represented.

509

510 ***Colocalization measure***

511 Colocalization percentages were obtained as described before (Osseni et al., 2016) by
512 generation of binary masks of the overlap between the two channels.

513

514 ***Statistical analysis***

515 All statistical analyses were performed with Microsoft Office Excel, and GraphPad Prism
516 6.0. Data are presented as means \pm Confidence Intervals (c.i.). The number of
517 independent experiments (n) is indicated in the figure legends.

518

519 **ACKNOWLEDGEMENTS**

520 We would like to thank Eric Denarier and Sami Chaaban for fruitful discussions and critical
521 review of this manuscript and the imaging facility platform (PIC-GIN) for help with image
522 acquisitions.

523

524 **COMPETING INTERESTS**

525 The authors declare that they have no competing interests.

526

527

528 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

529 Conceptualization: J.F., I.M.; Methodology: M.S., P.A., J.F.; Formal analysis: J.B.;
530 Investigation: M.S., P.A., J.B.; Writing-original draft preparation: M.S., P.A., J.F.; Writing-
531 review and editing: M.S., P.A., J.B., J.B., I.M., J.F.; Supervision: J.F.; Funding acquisition:
532 I.M.

533

534 **FUNDING**

535 This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche
536 Médicale (INSERM), from Fondation Ducoin to MS, and from Association Française contre
537 les Myopathies (AFM-Téléthon) to MS, PA and IM.

538

539 **DATA AVAILABILITY**

540 Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed
541 during the current study.

542

543 **REFERENCES**

- 544 Bagnato, P., Barone, V., Giacomello, E., Rossi, D., Sorrentino, V., 2003. Binding of an
545 ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic
546 reticulum and myofibrils in striated muscles. *J. Cell Biol.* 160, 245–253.
547 <https://doi.org/10.1083/jcb.200208109>
- 548 Barone, V., Randazzo, D., Del Re, V., Sorrentino, V., Rossi, D., 2015. Organization of
549 junctional sarcoplasmic reticulum proteins in skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res.*
550 *Cell. Motil.* 36, 501–515. <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9421-5>
- 551 Cui, X.A., Zhang, H., Ilan, L., Liu, A.X., Kharchuk, I., Palazzo, A.F., 2015. mRNA encoding
552 Sec61 β , a tail-anchored protein, is localized on the endoplasmic reticulum. *J. Cell.*
553 *Sci.* 128, 3398–3410. <https://doi.org/10.1242/jcs.168583>
- 554 Cui-Wang, T., Hanus, C., Cui, T., Helton, T., Bourne, J., Watson, D., Harris, K.M., Ehlers,
555 M.D., 2012. Local zones of endoplasmic reticulum complexity confine cargo in
556 neuronal dendrites. *Cell* 148, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.056>
- 557 Cusimano, V., Pampinella, F., Giacomello, E., Sorrentino, V., 2009. Assembly and
558 dynamics of proteins of the longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum in
559 skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4695–4700.
560 <https://doi.org/10.1073/pnas.0810243106>
- 561 DiFranco, M., Quinonez, M., Capote, J., Vergara, J., 2009. DNA transfection of mammalian
562 skeletal muscles using in vivo electroporation. *J. Vis. Exp.*
563 <https://doi.org/10.3791/1520>

- 564 Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I.,
565 Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., Romero, N.B., Marazzi, G., Sassoon, D.,
566 Laporte, J., Gomes, E.R., 2014. N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-
567 dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is
568 involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med* 6,
569 1455–1475. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404436>
- 570 Flucher, B.E., 1992. Structural analysis of muscle development: transverse tubules,
571 sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev. Biol.* 154, 245–260.
- 572 Flucher, B.E., Franzini-Armstrong, C., 1996. Formation of junctions involved in excitation-
573 contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
574 93, 8101–8106.
- 575 Flucher, B.E., Phillips, J.L., Powell, J.A., Andrews, S.B., Daniels, M.P., 1992. Coordinated
576 development of myofibrils, sarcoplasmic reticulum and transverse tubules in normal
577 and dysgenic mouse skeletal muscle, in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 150, 266–280.
- 578 Fourest-Lieuvin, A., Rendu, J., Osseni, A., Pernet-Gallay, K., Rossi, D., Oddoux, S.,
579 Brocard, J., Sorrentino, V., Marty, I., Fauré, J., 2012. Role of triadin in the
580 organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J. Cell. Sci.* 125, 3443–
581 3453. <https://doi.org/10.1242/jcs.100958>
- 582 Franzini-Armstrong, C., Jorgensen, A.O., 1994. Structure and development of E-C
583 coupling units in skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 509–534.
584 <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002453>
- 585 Froemming, G.R., Murray, B.E., Ohlendieck, K., 1999. Self-aggregation of triadin in the
586 sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1418,
587 197–205.
- 588 Fu, Y., Hong, T., 2016. BIN1 regulates dynamic t-tubule membrane. *Biochim. Biophys. Acta*
589 1863, 1839–1847. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.004>
- 590 Greenfield, J.J., High, S., 1999. The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-
591 Golgi intermediate compartment. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 10), 1477–1486.
- 592 Kaisto, T., Metsikkö, K., 2003. Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship
593 with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Exp. Cell Res.* 289, 47–57.
- 594 Knudson, C.M., Stang, K.K., Jorgensen, A.O., Campbell, K.P., 1993. Biochemical
595 characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic
596 reticulum glycoprotein (triadin). *J. Biol. Chem.* 268, 12637–12645.
- 597 Kobayashi, Y.M., Alseikhan, B.A., Jones, L.R., 2000. Localization and characterization of
598 the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in
599 mediating the protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 17639–17646.
600 <https://doi.org/10.1074/jbc.M002091200>
- 601 Lee, J.M., Rho, S.-H., Shin, D.W., Cho, C., Park, W.J., Eom, S.H., Ma, J., Kim, D.H., 2004.
602 Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor
603 are involved in the interaction with triadin. *J. Biol. Chem.* 279, 6994–7000.
604 <https://doi.org/10.1074/jbc.M312446200>
- 605 Martin, P.D., James, Z.M., Thomas, D.D., 2018. Effect of Phosphorylation on Interactions
606 between Transmembrane Domains of SERCA and Phospholamban. *Biophys. J.*
607 114, 2573–2583. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.035>
- 608 Marty, I., 2015. Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J. Physiol. (Lond.)*
609 593, 3261–3266. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.281147>
- 610 Marty, I., Fauré, J., Fourest-Lieuvin, A., Vassilopoulos, S., Oddoux, S., Brocard, J., 2009.
611 Triadin: what possible function 20 years later? *J. Physiol. (Lond.)* 587, 3117–3121.
612 <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171892>
- 613 Marty, I., Robert, M., Villaz, M., De Jongh, K., Lai, Y., Catterall, W.A., Ronjat, M., 1994.
614 Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and

615 ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
616 *U.S.A.* 91, 2270–2274.

617 Marty, I., Thevenon, D., Scotto, C., Groh, S., Sainnier, S., Robert, M., Grunwald, D., Villaz,
618 M., 2000. Cloning and Characterization of a New Isoform of Skeletal Muscle Triadin.
619 *J. Biol. Chem.* 275, 8206–8212. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8206>

620 McFarland, T.P., Milstein, M.L., Cala, S.E., 2010. Rough endoplasmic reticulum to
621 junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult
622 cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 556–564.
623 <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.05.012>

624 Munro, S., Pelham, H.R., 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER
625 proteins. *Cell* 48, 899–907.

626 Nori, A., Bortoloso, E., Frasson, F., Valle, G., Volpe, P., 2004. Vesicle budding from
627 endoplasmic reticulum is involved in calsequestrin routing to sarcoplasmic reticulum
628 of skeletal muscles. *Biochem. J.* 379, 505–512. <https://doi.org/10.1042/BJ20031875>

629 Oddoux, S., Brocard, Julie, Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, Jacques,
630 Fauré, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J., Csernoch, L., Marty, I.,
631 2009. Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J. Biol. Chem.*
632 284, 34918–34929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022442>

633 Ogata, T., Yamasaki, Y., 1997. Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of
634 mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and
635 intermediate muscle fibers. *Anat. Rec.* 248, 214–223.
636 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199706\)248:2<214::AID-AR8>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199706)248:2<214::AID-AR8>3.0.CO;2-S)

637 Osseni, A., Sébastien, M., Sarrault, O., Baudet, M., Couté, Y., Fauré, J., Fourest-Lieuvin,
638 A., Marty, I., 2016. Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and
639 microtubules in muscle cells. *J. Cell. Sci.* 129, 3744–3755.
640 <https://doi.org/10.1242/jcs.188862>

641 Patterson, G.H., Lippincott-Schwartz, J., 2002. A photoactivatable GFP for selective
642 photolabeling of proteins and cells. *Science* 297, 1873–1877.
643 <https://doi.org/10.1126/science.1074952>

644 Pimentel, M.R., Falcone, S., Cadot, B., Gomes, E.R., 2017. In Vitro Differentiation of
645 Mature Myofibers for Live Imaging. *J Vis Exp.* <https://doi.org/10.3791/55141>

646 Rahkila, P., Alakangas, A., Väänänen, K., Metsikkö, K., 1996. Transport pathway,
647 maturation, and targeting of the vesicular stomatitis virus glycoprotein in skeletal
648 muscle fibers. *J. Cell. Sci.* 109 (Pt 6), 1585–1596.

649 Rapoport, T.A., Jungnickel, B., Kutay, U., 1996. Protein transport across the eukaryotic
650 endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 65,
651 271–303. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001415>

652 Rezgui, S.S., Vassilopoulos, S., Brocard, J., Platel, J.C., Bouron, A., Arnoult, C., Oddoux,
653 S., Garcia, L., De Waard, M., Marty, I., 2005. Triadin (Trisk 95) overexpression
654 blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* 280,
655 39302–39308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506566200>

656 Rossi, D., Bencini, C., Maritati, M., Benini, F., Lorenzini, S., Pierantozzi, E., Scarcella,
657 A.M., Paolini, C., Protasi, F., Sorrentino, V., 2014. Distinct regions of triadin are
658 required for targeting and retention at the junctional domain of the sarcoplasmic
659 reticulum. *Biochem. J.* 458, 407–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20130719>

660 Sharpe, H.J., Stevens, T.J., Munro, S., 2010. A comprehensive comparison of
661 transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell* 142, 158–169.
662 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.037>

663 Sorrentino, V., 2011. Sarcoplasmic reticulum: structural determinants and protein
664 dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1075–1078.
665 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.04.004>

666 Stenoien, D.L., Knyushko, T.V., Londono, M.P., Opresko, L.K., Mayer, M.U., Brady, S.T.,
667 Squier, T.C., Bigelow, D.J., 2007. Cellular trafficking of phospholamban and
668 formation of functional sarcoplasmic reticulum during myocyte differentiation. *Am. J.*
669 *Physiol., Cell Physiol.* 292, C2084-2094. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00523.2006>
670 Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Rezgui, S.S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A.,
671 Lunardi, J., De Waard, M., Marty, I., 2005. Triadins are not triad-specific proteins:
672 two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of
673 sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280, 28601–28609.
674 <https://doi.org/10.1074/jbc.M501484200>
675 Villa, A., Podini, P., Nori, A., Panzeri, M.C., Martini, A., Meldolesi, J., Volpe, P., 1993. The
676 endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection. II. Postnatal
677 differentiation of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Res.*
678 209, 140–148.
679
680

Localization	Proteins	DIF3 $t_{1/2}$ (s)	DIF9 $t_{1/2}$ (s)
Triads	T95	68.97 (64.86 to 73.64)	104.00 (92.74 to 118.4)
SR membranes	Sec61 β	39.87 (38.05 to 41.88)	57.33 (54.62 to 60.32)
SR Lumen	KDEL	7.73 (7.49 to 7.98)	11.37 (11.01 to 11.75)
	T95 Δ Cter	34.54 (33.31 to 35.86)	89.79 (79.76 to 102.7)

Table 1: Half-life time to decay values ($t_{1/2}$) for each protein at DIF3 and DIF9. Values are represented as means (c.i.), $n = 32, 32, 36$ and 34 cells for T95, Sec61 β , T95 Δ Cter and KDEL at DIF3, respectively and $n = 34, 40, 28$ and 34 cells for T95, Sec61 β , T95 Δ Cter and KDEL at DIF9, respectively from 4 independent experiments.

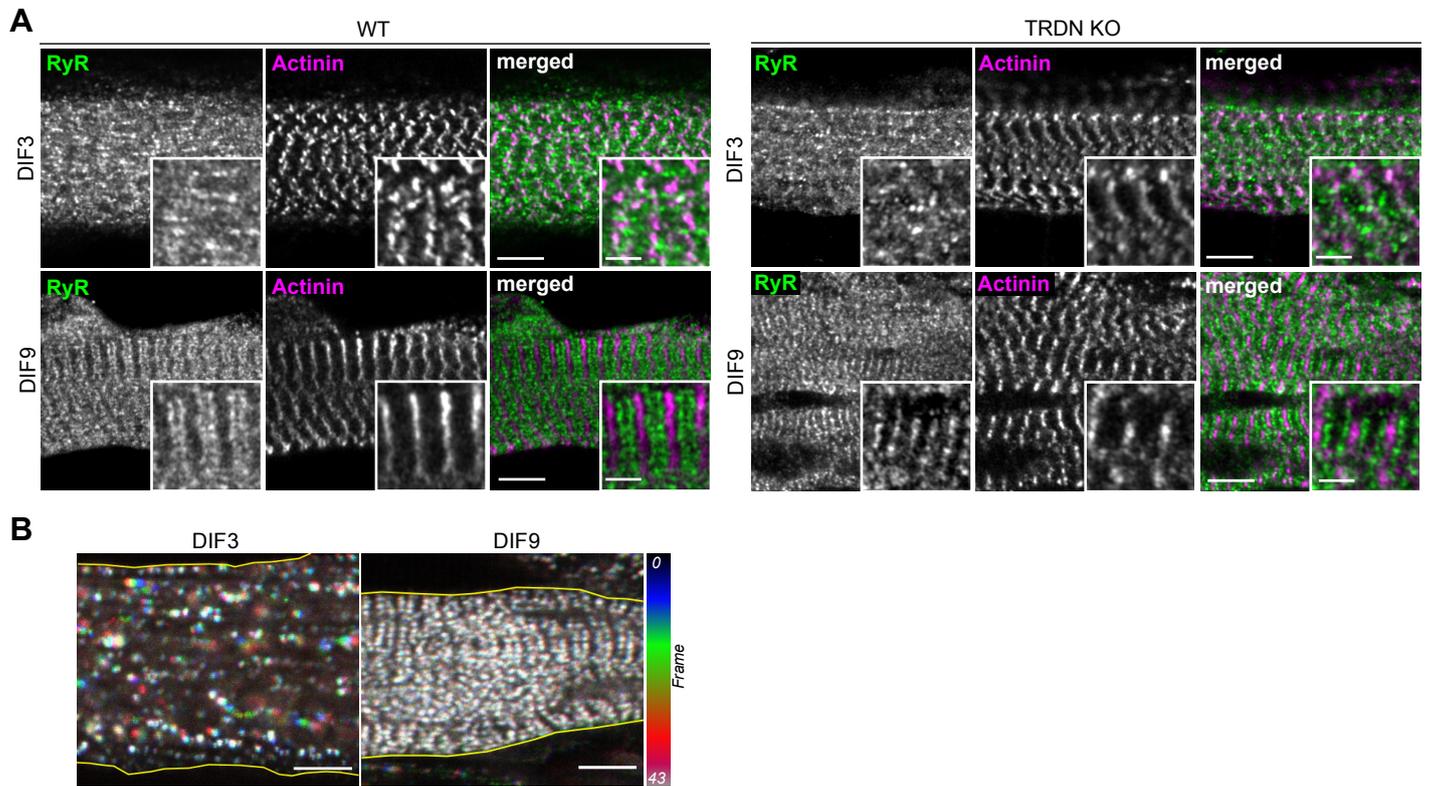


Figure 1: Triad organization and T95 behavior

A) DIF3 (upper panels) and DIF9 (lower panels) WT (left) and *TRDN* KO (right) myotubes labeled with anti-RyR1 (green), and anti-alpha-actinin (magenta) antibodies. Single confocal planes, scale bars = 5 μm . For each image, insets of triad and of Z-discs for general sarcomere organization assessment are shown. Scale bars = 2 μm . **B)** Color-coded representation of 10.6 min movies (43 frames) of DIF3 (left) and DIF9 (right) myotubes expressing T95-GFP. T95-GFP movements (represented by colored clusters) are only observed at DIF3. Scale bars = 5 μm .

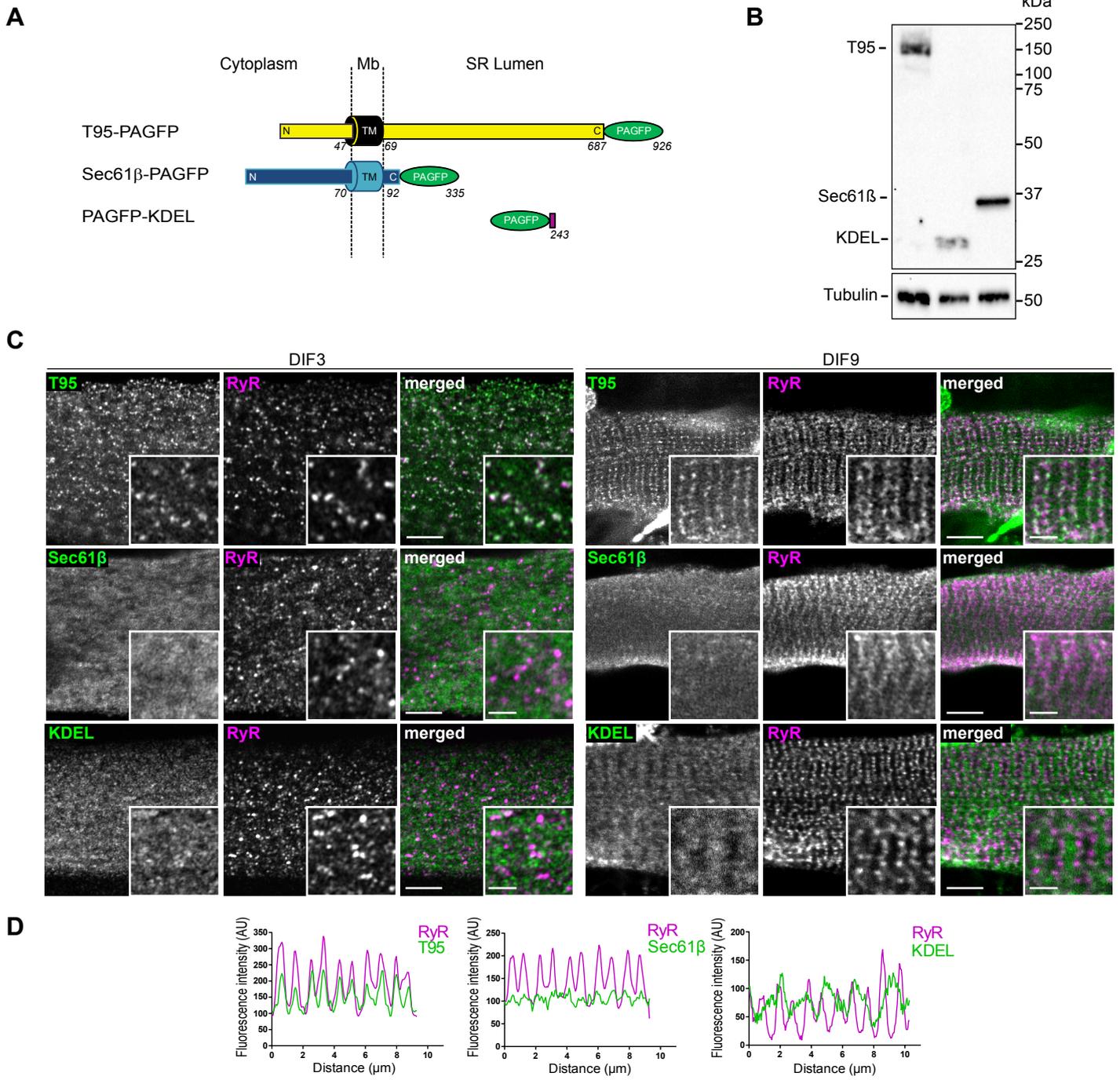


Fig 2.

Figure 2: T95, Sec61 β and KDEL localize respectively in SR membranes and lumen

A) Schematic representation of T95, Sec61 β and KDEL constructs fused to PAGFP, with N-terminal (N), C-terminal (C) and transmembrane (TM) domains sequence length and localization regarding the SR membrane (Cytoplasm, Membrane (Mb) and SR lumen). Amino acid numbers from N-terminal to C-terminal end are indicated. **B)** Western blot analysis has been performed with antibody against GFP on 10 μ g triadin KO cells lysates transduced with T95-PAGFP or PAGFP-KDEL or Sec61 β -PAGFP. Three bands are detected at 150 kDa (T95-PAGFP), 37 kDa (Sec61 β -PAGFP) and 28 kDa (PAGFP-KDEL). The β -tubulin has been used as a loading control (lower panel). **C)** DIF3 (left) and DIF9 (right) myotubes expressing T95, Sec61 β or KDEL immunolabeled with anti-GFP (green) and anti-RyR1 (magenta) antibodies. Scale bars = 5 μ m. Insets of T95, Sec61 β or KDEL immunolabelings with that of RyR1 are shown. Scale bars = 2 μ m. **D)** Plot profiles of constructs (green) versus RyR1 (magenta) intensities as a function of distance for 10 μ m (five successive triads) in *TRDN* KO myotubes at DIF9.

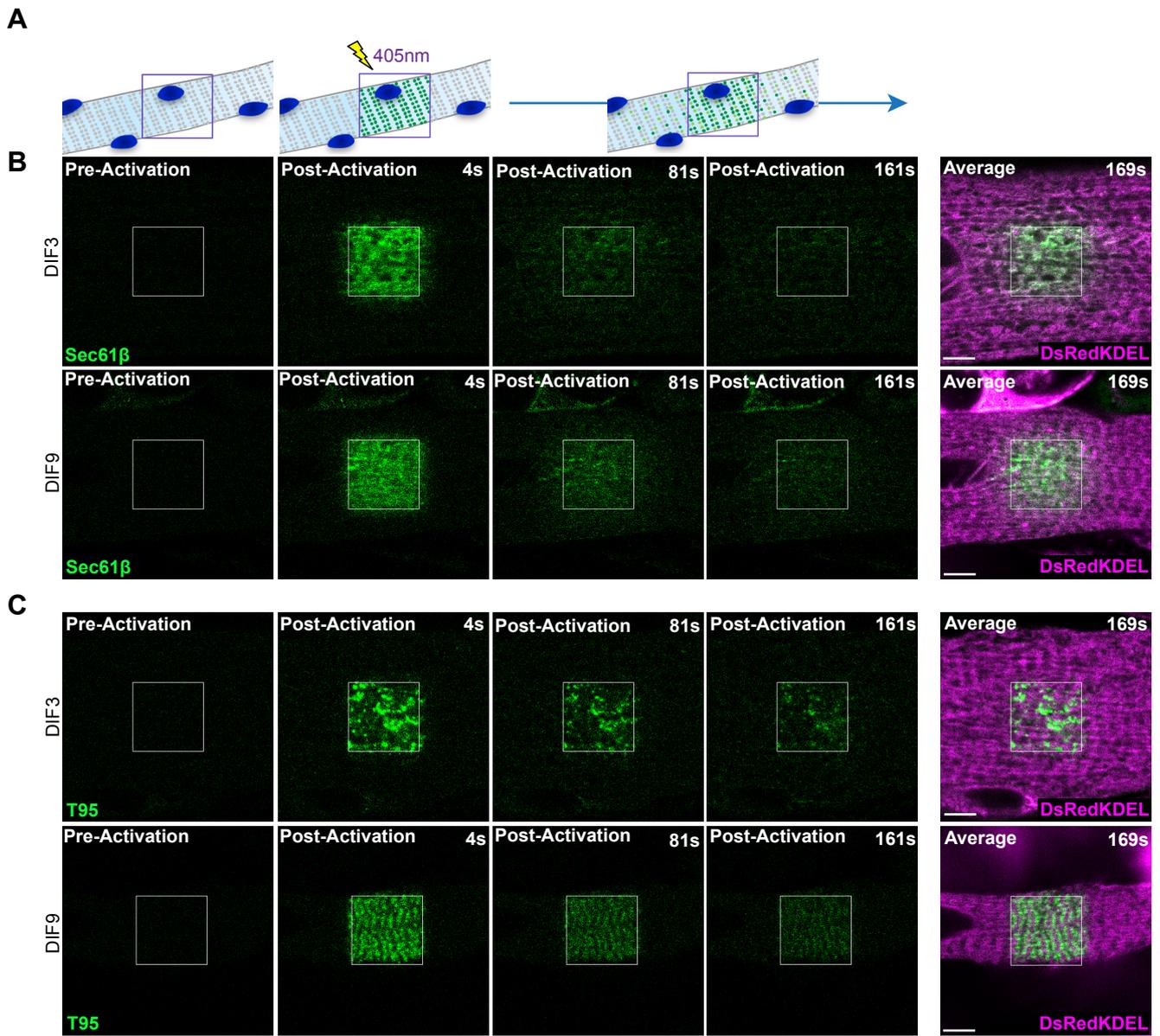


Fig 3.

Figure 3: T95 dynamics compared to control reticulum protein Sec61 β in cultured myotubes

A) Schematic representation of a photoactivation experiment: a myotube expressing a PAGFP-tagged protein of the triads is photoactivated in a specific ROI with a 405 nm laser, revealing the fluorescence of the proteins inside that region. The dynamic behavior of the activated proteins can be followed and recorded. **B)** Single photoactivation of DIF3 (upper panels) and DIF9 (lower panels) myotubes co-expressing Sec61 β -PAGFP (green) and DsRedKDEL (luminal reticulum marker, magenta). Shown are one image pre-activation and three images post-activation (4, 81, 161 seconds). Average images are average intensity projections of all post-activation frames (169 seconds). Scale bars = 5 μ m. **C)** Single photoactivation of DIF3 (upper panels) and DIF9 (lower panels) myotubes co-expressing T95-PAGFP (green) and DsRedKDEL (luminal reticulum marker, magenta). Shown are one image pre-activation and three images post-activation (4, 81, 161 seconds). Average images are maximum intensity projections of all post-activation frames (169 seconds). Scale bars = 5 μ m.

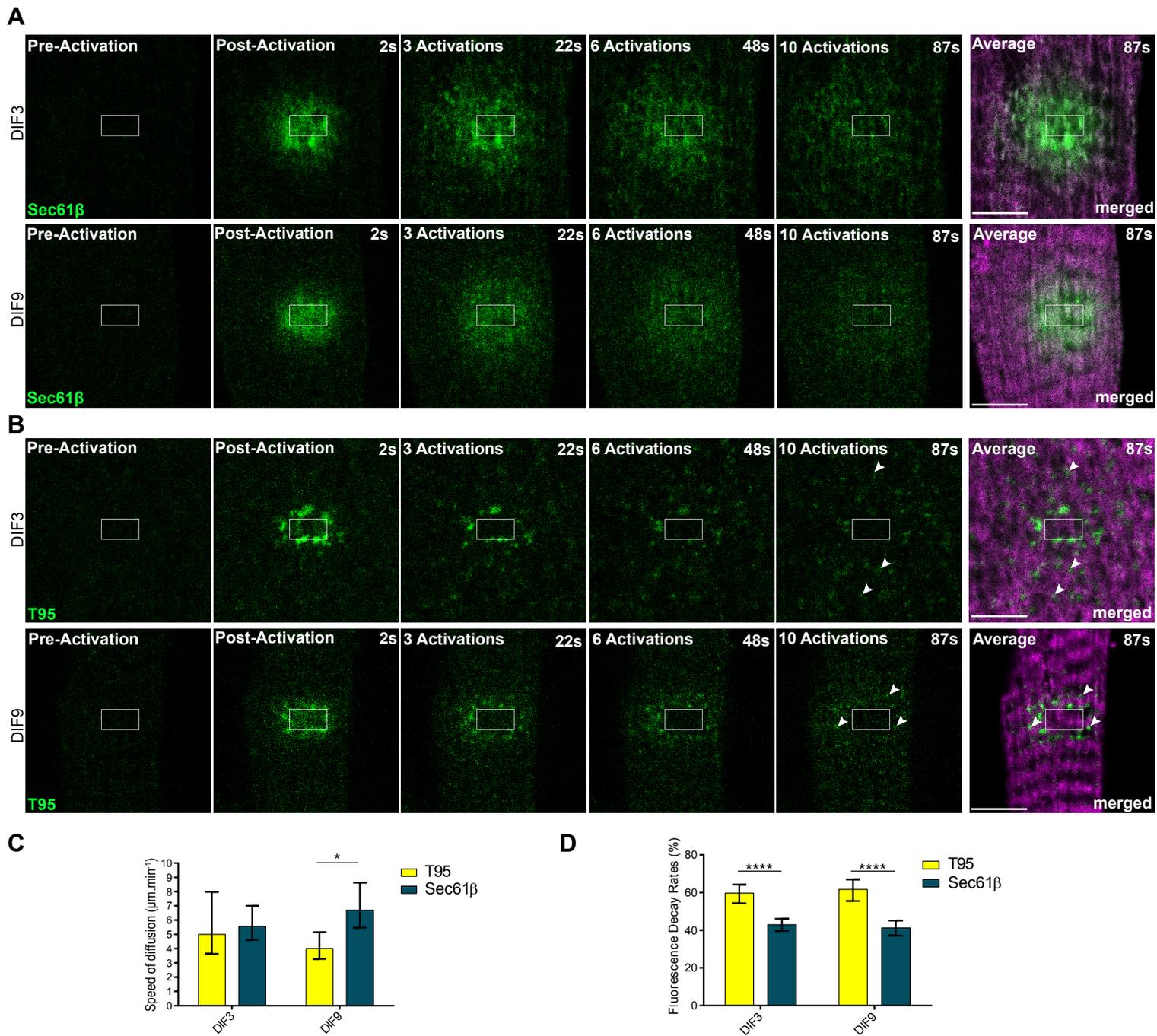


Fig 4.

Figure 4: T95 diffuses in SR membranes of cultured myotubes

A) Iterative photoactivation of DIF3 (upper panels) and DIF9 (lower panels) myotubes co-expressing Sec61 β -PAGFP (green) and DsRedKDEL (magenta). Shown are one image pre-activation and four images post-activation (2, 22, 48 and 87 seconds). Average images are average intensity projections of all post-activation frames (87 seconds). Scale bars = 5 μ m. **B)** Iterative photoactivation of DIF3 (upper panels) and DIF9 (lower panels) myotubes co-expressing T95-PAGFP (green) and DsRedKDEL (magenta). Shown are one image pre-activation and four images post-activation (2, 22, 48 and 87 seconds). Average images are average intensity projections of all post-activation frames (87 seconds). T95 clusters appear at distant sites from the activation ROI (white arrowheads) and organize on each side of the DsRedKDEL striations at DIF9. Scale bars = 5 μ m. **C)** Speed of the fluorescence wave of Sec61 β -PAGFP and T95-PAGFP at DIF3 and DIF9. Values are represented as means \pm c.i. obtained from linear regressions as indicated on Figs. S4-S5. * $p=0.01232$ using model comparison of linear regressions, as performed by GraphPad Prism 6.0 (see Methods section). $n= 12$ and 11 cells for Sec61 β at DIF3 and DIF9 respectively, from 3 independent experiments. $n= 10$ and 7 cells for T95 at DIF3 and DIF9 respectively, from 3 independent experiments. **D)** Fluorescence decay rates for Sec61 β -PAGFP and T95-PAGFP at DIF3 and DIF9. Values are represented as means \pm c.i. obtained from exponential decay modelization as indicated on Figs.S4-S5. **** $p<0.0001$, using model comparison of exponential decays, as performed by GraphPad Prism 6.0 (see Methods section). $n = 12$ and 11 cells for Sec61 β at DIF3 and DIF9 respectively, from 3 independent experiments. $n= 10$ and 7 cells for T95 at DIF3 and DIF9 respectively, from 3 independent experiments.

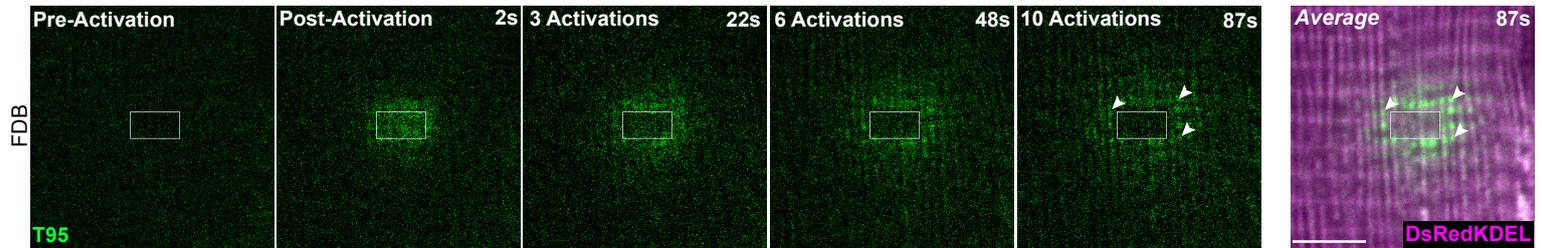


Figure 5: T95 is dynamic in adult muscle fibers

Iterative photoactivation of a representative *FDB* fiber co-expressing T95-PAGFP (green) and DsRedKDEL (luminal reticulum marker, magenta). Shown are one image pre-activation and four images post-activation (2, 22, 48 and 87 seconds). Average images are average intensity projections of all post-activation frames (87 seconds). White arrowheads indicate clusters of T95 organized in double rows of dots around DsRedKDEL striations. Scale bars = 5 μ m.

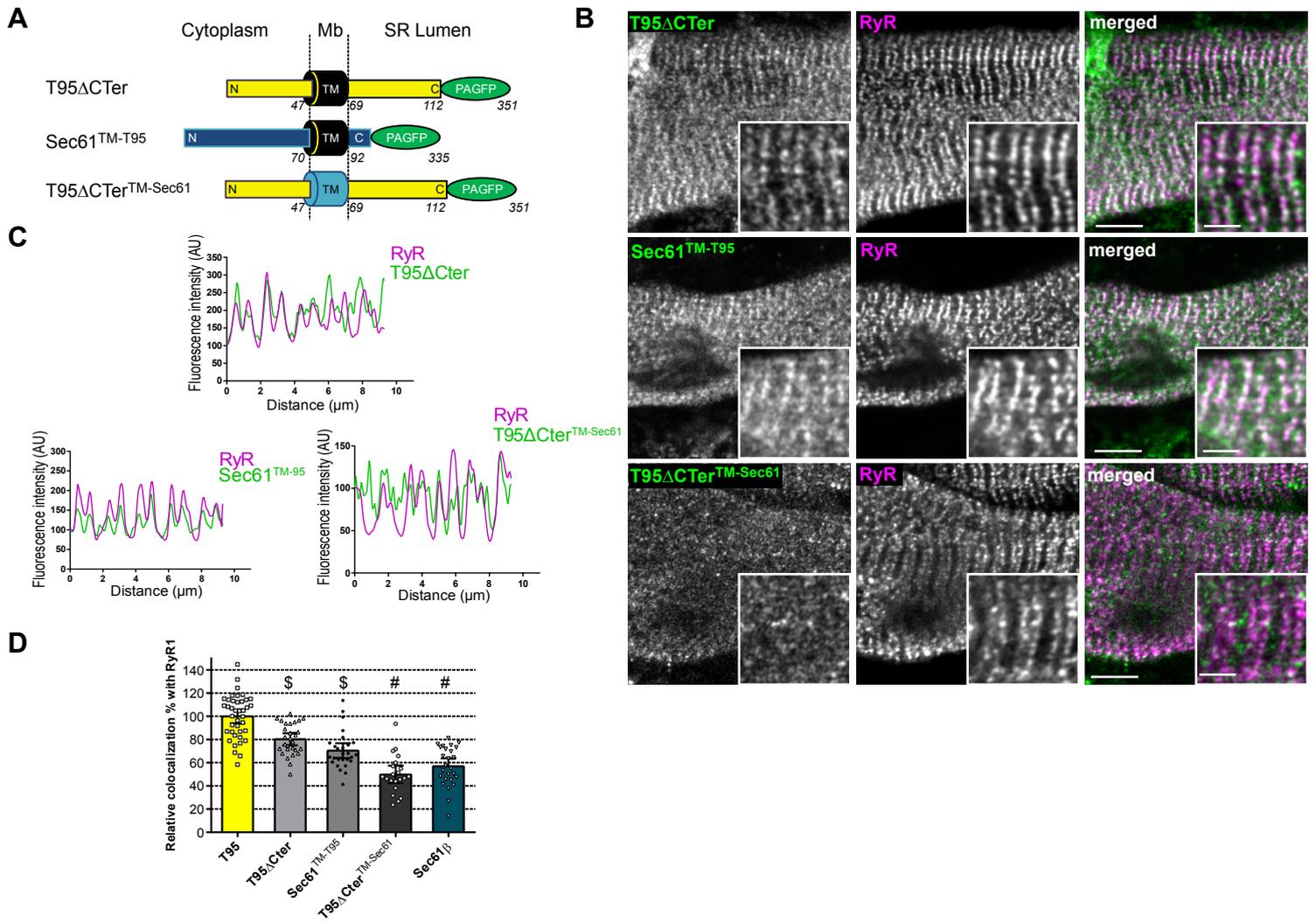


Fig 6.

Figure 6: Triadin transmembrane domain is necessary for localization at triads

A) Schematic representation of T95 Δ Cter, Sec61^{TM-T95} and T95 Δ Cter^{TM-Sec61} constructs with length of amino-acids sequence and localization of the SR membrane. **B)** DIF9 myotubes expressing T95 Δ Cter, Sec61^{TM-T95} and T95 Δ Cter^{TM-Sec61} immunolabeled with anti-GFP (green) and anti-RyR1 (magenta) antibodies. Scale bars = 5 μ m. **C)** Plot profiles of constructs (green) versus RyR1 (magenta) intensities as a function of distance for 10 μ m (five successive triads) in *TRDN* KO myotubes at DIF9. **D)** Percentage of PAGFP constructs colocalized with RyR1 labeling and normalized to that of DIF9 T95. Values are means \pm c.i., n = 40 cells from 4 independent experiments for T95, n = 26 cells from 3 independent experiments for Sec61 β , n = 28 cells from 3 independent experiments for T95 Δ Cter, n = 21 cells from 2 independent experiments for T95 Δ Cter^{TM-Sec61}, n = 27 cells from 2 independent experiments for Sec61^{TM-T95}.

Using a parametric one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc comparisons: \$ comparison with Sec61 β : T95 Δ Cter (p<0.0001) and Sec61^{TM-T95} (p<0.05). # comparison with T95 Δ Cter (p<0.0001).

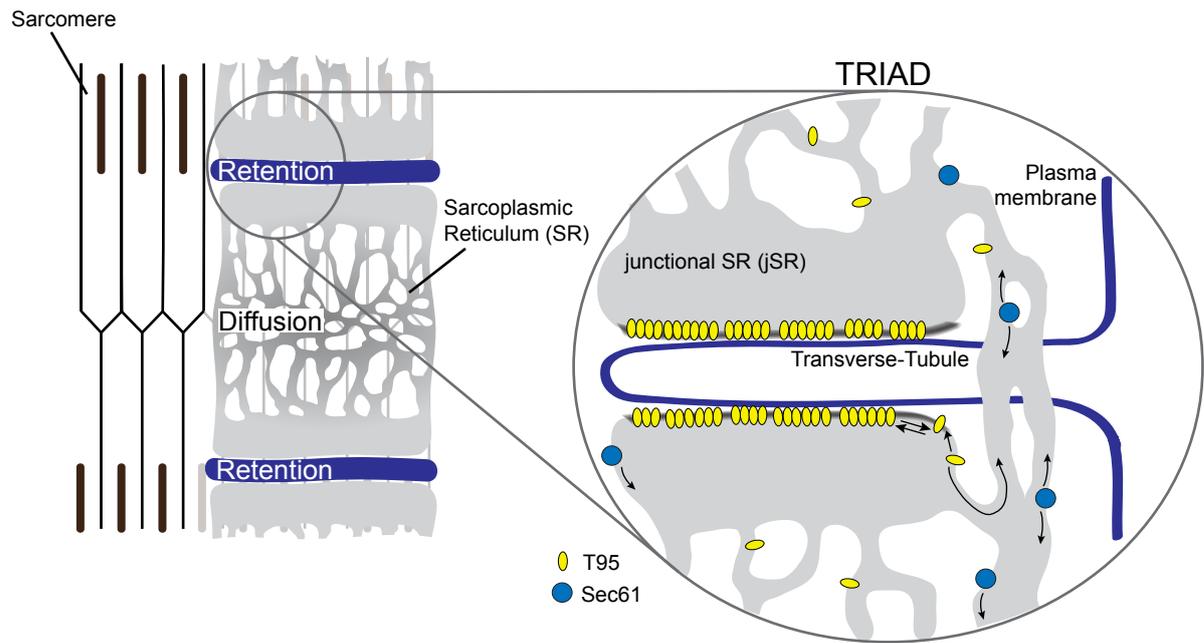


Figure 7: Model of T95 dynamic behavior in adult muscle fibers

Schematic representation of T95 (yellow ovals) and Sec61β (blue disks) dynamics inside an adult muscle fiber. As Sec61β, T95 constantly diffuses inside the SR. However, once in the jSR T95 accumulates in this sub-compartment thanks to its TM domain. The residence time of T95 inside the jSR could be due to a specific membrane composition (gray line) of this compartment or to the multimerization of T95.

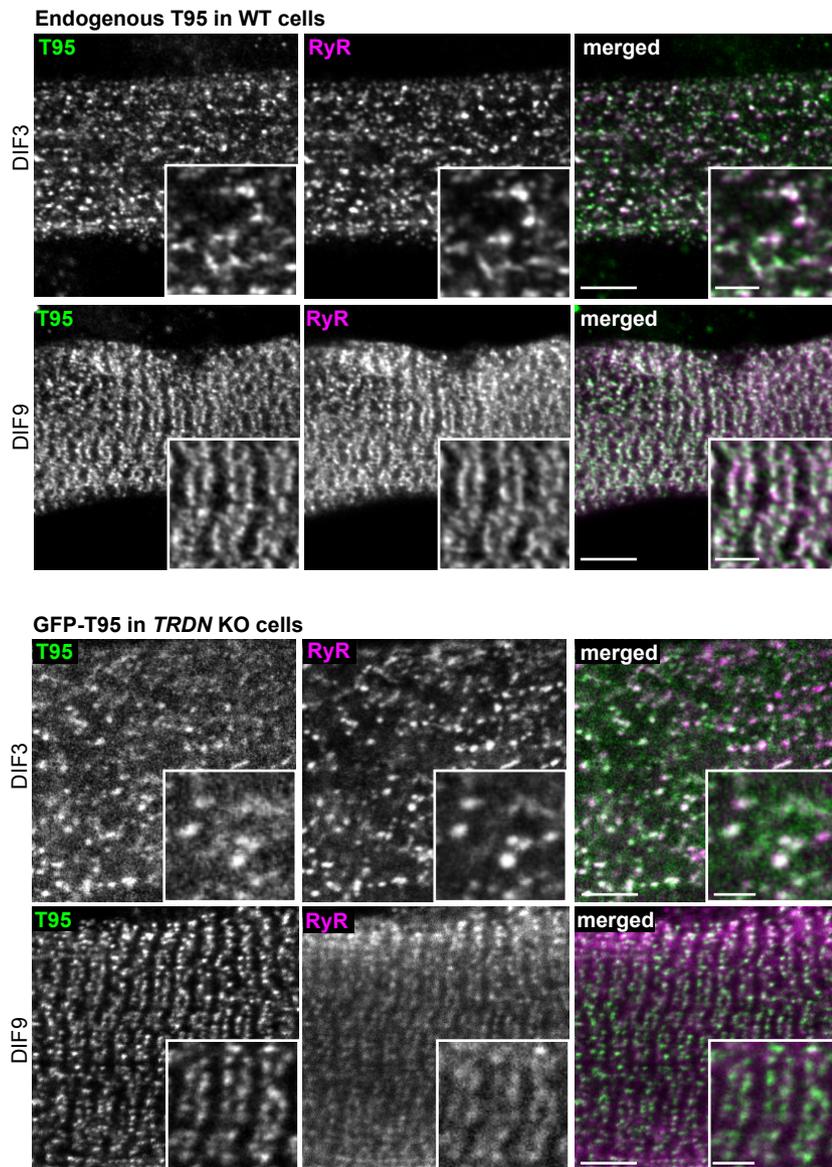


Figure S1: GFP-tagged version of T95 and endogenous T95 have the same localization in triads

DIF3 and DIF9 WT (upper panels) and *TRDN* KO (lower panels) myotubes immunolabeled with anti-Triadin (T95) (green) and anti-RyR1 (magenta) antibodies. Scale bars = 5 μm. Endogenous T95 and T95-GFP colocalize with RyR1 as scattered clusters at DIF3 and double rows of dots at DIF9 (insets, scale bars 2 μm).

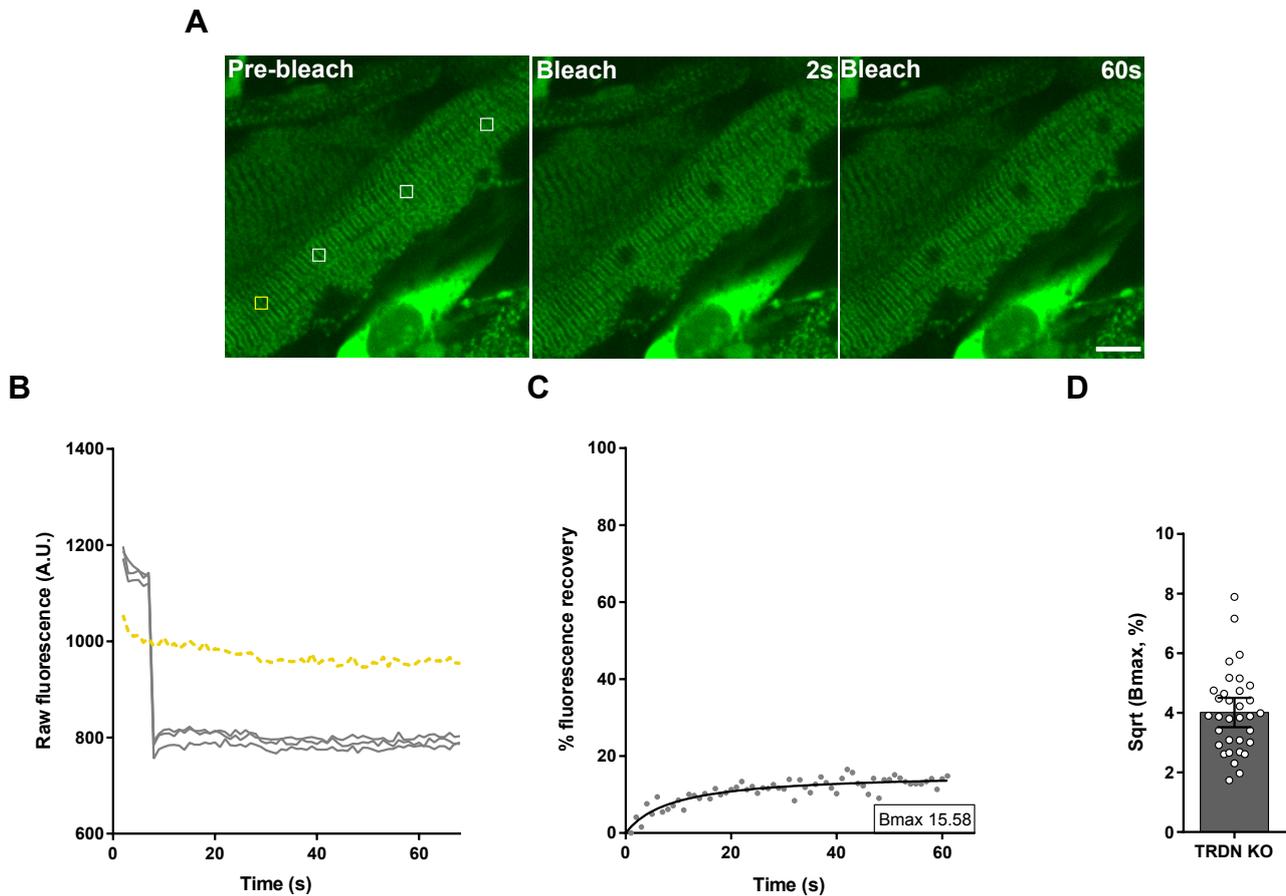


Figure S2: A fraction of T95 is still mobile at DIF9

A) Images of FRAP experiments in DIF9 *TRDN* KO cells expressing T95-GFP localized in triads. The three white squares represent the bleached areas while the yellow square was used to measure variations of unbleached fluorescence during the experiment. Shown are one image pre-bleach and two images post bleach (2 and 60 seconds). Scale bars = 10 μ m. **B)** Raw fluorescence measurements from the white areas (gray curves) and the yellow area (yellow dotted curve), as indicated in A. **C)** Mean fluorescence measurements from the gray curves, corrected for the variations of unbleached fluorescence (yellow curve) as shown in B. Bmax is the percentage of fluorescence recovery as calculated (see Methods section). **D)** Histogram of Bmax values calculated as described in C for $n=33$ cells from 2 independent experiments. Note that distribution of "Square root (Bmax, %)" was preferred to obtain more accurate mean \pm c.i. values.

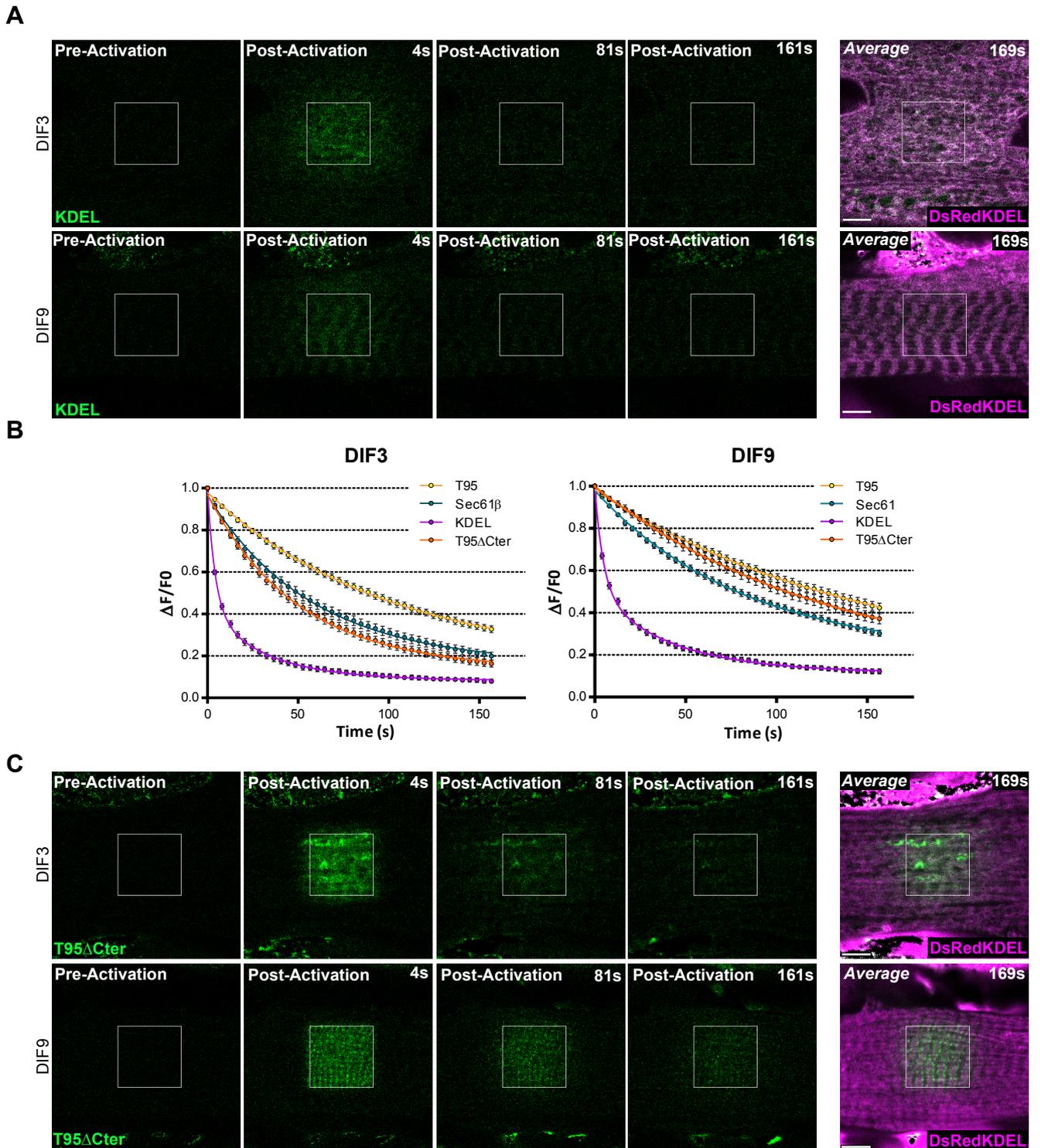


Fig S3.

Figure S3: Proteins dynamics at DIF3 and DIF9

A) Single photoactivation of DIF3 (upper panels) and DIF9 (lower panels) myotubes coexpressing PAGFP-KDEL (green) and DsRedKDEL (luminal reticulum marker, magenta). Shown are one image pre-activation, and three images post-activation (4, 81, 161 seconds). Average images are average intensity projections of all post-activation frames (169 seconds). Scale bars = 5 μ m. **B)** Curves representing the decrease in fluorescence intensity quantified for each protein-PAGFP in the activated ROI after a single photoactivation in DIF3 (left) and DIF9 (right) myotubes. Each image was normalized to 0 as the background intensity and to 1 as the fluorescence intensity of the first image post-activation. Values obtained were fitted to an exponential decay and mean \pm c.i. are represented. n = 32, 32, 36 and 34 cells for T95, Sec61 β , T95 Δ Cter and KDEL at DIF3, respectively and n = 34, 40, 28 and 34 cells for T95, Sec61 β , T95 Δ Cter and KDEL at DIF9, respectively from 4 independent experiments. **C)** Single photoactivation of DIF3 (upper panels) and DIF9 (lower panels) myotubes coexpressing T95 Δ Cter-PAGFP (green) and DsRedKDEL (luminal reticulum marker, magenta). Shown are one image pre-activation, and three images post-activation (4, 81, 161 seconds). Average images are average intensity projections of all post-activation frames (169 seconds). Scale bars = 5 μ m.

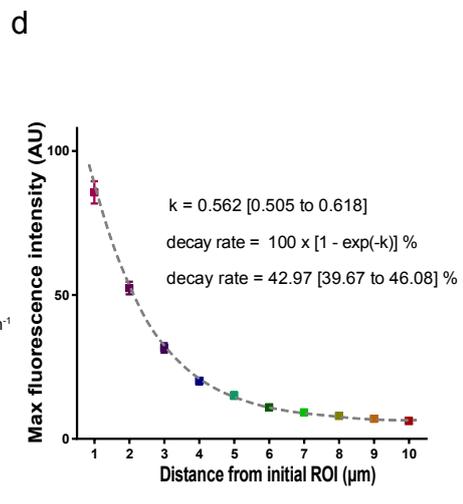
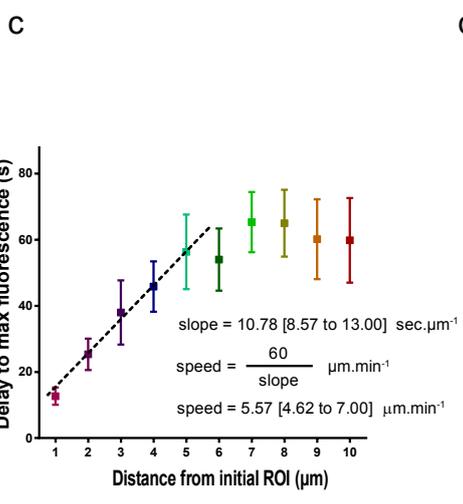
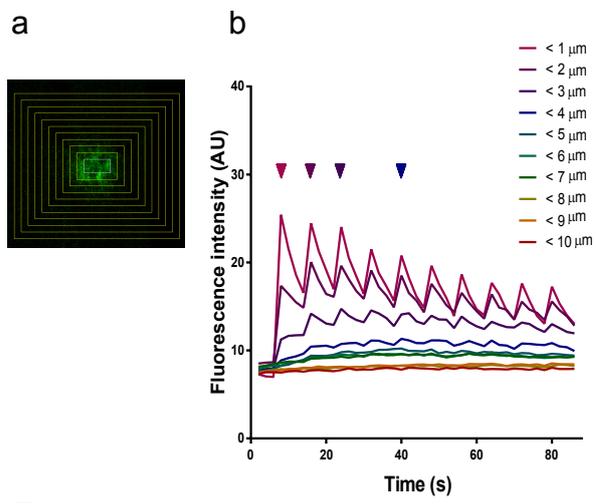
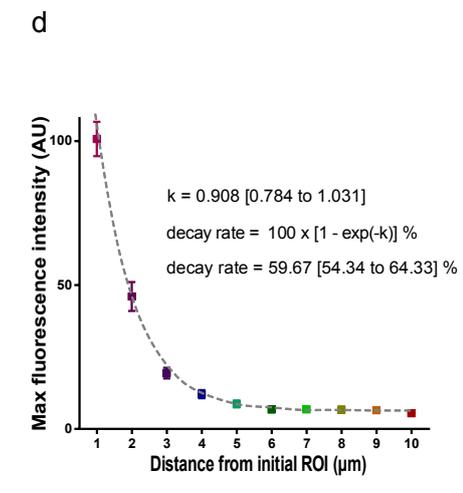
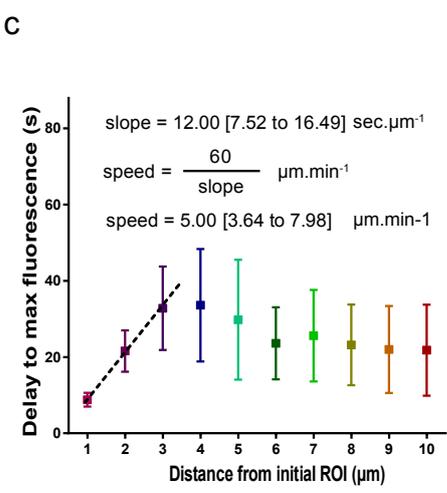
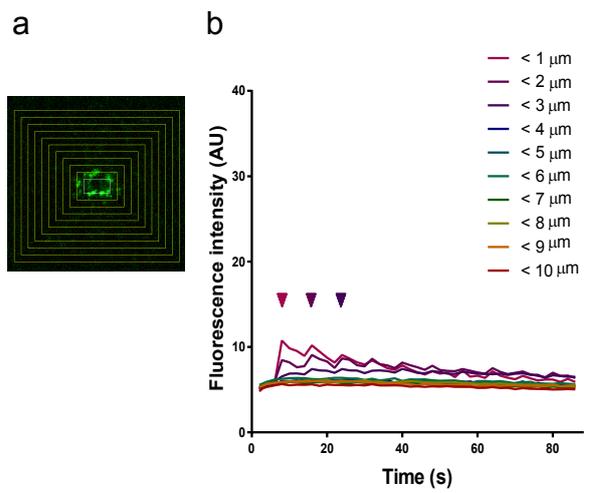
A**B**

Fig S4.

Figure S4 : Quantification of T95 and Sec61 β diffusion in SR membranes of cultured myotubes at DIF3

Cultured myotubes at DIF3 co-expressing Sec61 β -PAGFP and DsRedKDEL (**A**) or T95-PAGFP and DsRedKDEL (**B**) were imaged and repeatedly photoactivated as described in M&M. **Aa)** and **Ba)** Concentric squares drawn around the initially photoactivated ROI allowed for measurements of fluorescence in increasingly distant "rings" as reported in **Ab)** and **Bb)**. Arrowheads indicate the time of maximum fluorescence in the curve of the corresponding color (red-violet, purple, dark purple, dark blue for 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m distances from the photoactivated ROI, respectively). **Ac)** and **Bc)** Delay to maximal fluorescence observed in each concentric "ring" (red-violet, purple, dark purple, dark blue, light blue, dark green, light green, yellow, orange and red for 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m, 5 μ m, 6 μ m, 7 μ m, 8 μ m, 9 μ m and 10 μ m distances from the photoactivated ROI, respectively). On each graph, linear fitting of the aligned first points (dotted gray line) enabled the calculation of the slope and thus the speed of the fluorescence wave, as indicated. **Ad)** and **Bd)** Fluorescence values at the time of maximal fluorescence observed in each concentric "ring" (red-violet, purple, dark purple, dark blue, light blue, dark green, light green, yellow, orange and red for 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m, 5 μ m, 6 μ m, 7 μ m, 8 μ m, 9 μ m and 10 μ m distances from the photoactivated ROI, respectively) and normalized to that observed in the first square, as 100%. On each graph, exponential decay fitting of all the points (dotted gray curve) enabled the calculation of the k parameter and thus the decay rate, as indicated. Values are means \pm c.i. n = 12 and 10 cells for Sec61 β and T95 respectively at DIF3 from 3 independent experiments.

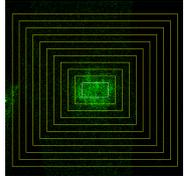
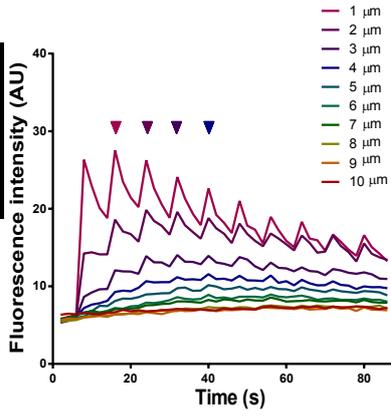
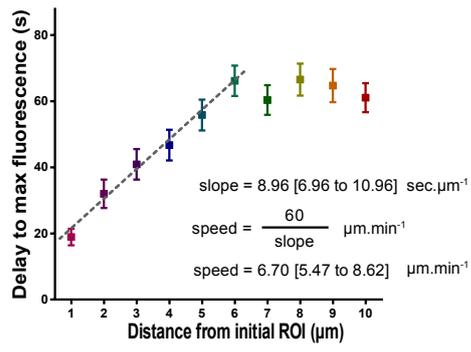
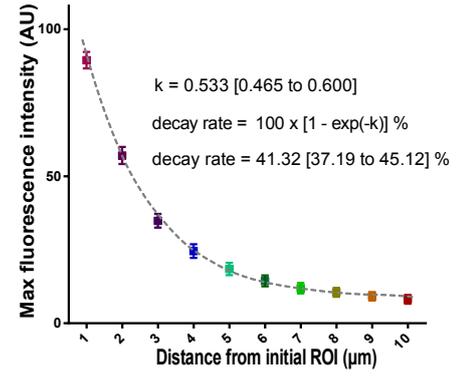
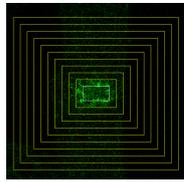
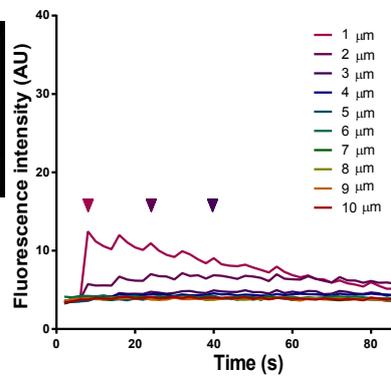
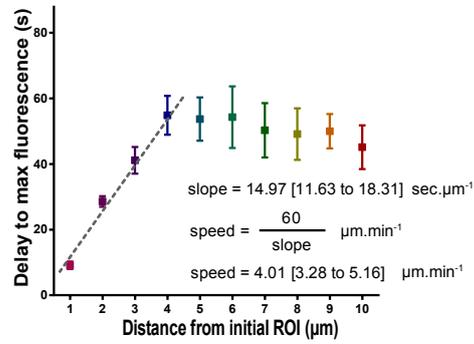
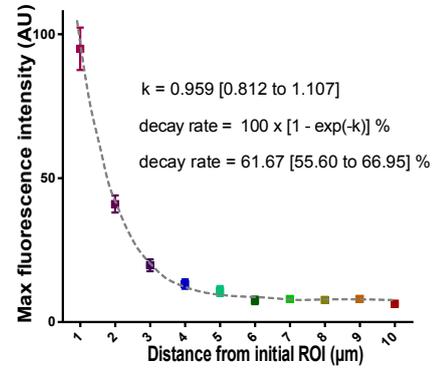
A**a****b****c****d****B****a****b****c****d**

Figure S5 : Quantification of T95 and Sec61 β diffusion in SR membranes of cultured myotubes at DIF9

Cultured myotubes at DIF9 co-expressing Sec61 β -PAGFP and DsRedKDEL (**A**) or T95-PAGFP and DsRedKDEL (**B**) were imaged and repeatedly photoactivated as described in M&M. **Aa**) and **Ba**) Concentric squares drawn around the initially photoactivated ROI allowed for measurements of fluorescence in increasingly distant "rings" as reported in **Ab**) and **Bb**). Arrowheads indicate the time of maximum fluorescence in the curve of the corresponding color (red-violet, purple, dark purple, dark blue for 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m distances from the photoactivated ROI, respectively). **Ac**) and **Bc**) Delay to maximal fluorescence observed in each concentric "ring" (red-violet, purple, dark purple, dark blue, light blue, dark green, light green, yellow, orange and red for 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m, 5 μ m, 6 μ m, 7 μ m, 8 μ m, 9 μ m and 10 μ m distances from the photoactivated ROI, respectively). On each graph, linear fitting of the aligned first points (dotted gray line) enabled for the calculation of the slope and thus the speed of fluorescence wave, as indicated. **Ad**) and **Bd**) Fluorescence values at the time of maximal fluorescence observed in each concentric "ring" (red-violet, purple, dark purple, dark blue, light blue, dark green, light green, yellow, orange and red for 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m, 5 μ m, 6 μ m, 7 μ m, 8 μ m, 9 μ m and 10 μ m distances from the photoactivated ROI, respectively) and normalized to that observed in the first square, as 100%. On each graph, exponential decay fitting of all the points (dotted gray curve) enabled the calculation of the k parameter and thus the decay rate, as indicated. Values are means \pm c.i. n = 11 and 7 cells for Sec61 β and T95 at DIF9 respectively, from 3 independent experiments.

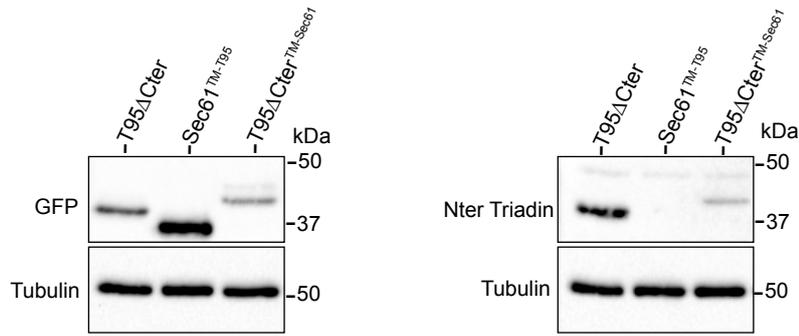


Figure S6 : Western blot analysis of mutant and hybrids proteins

Western blot analysis has been performed with antibodies against GFP (left) or against N-terminal part of triadin (right) on 20 μ g triadin KO cells lysates transduced with T95 Δ Cter-PAGFP, Sec61^{TM-T95}-PAGFP or T95 Δ Cter^{TM-Sec61}-PAGFP. Antibody against GFP detected bands at 40kDa for T95 Δ Cter-PAGFP and T95 Δ Cter^{TM-Sec61}-PAGFP, and at 37kDa for Sec61^{TM-T95}-PAGFP. As expected, antibody against the N-terminal part of triadin, detected only T95 Δ Cter-PAGFP and T95 Δ Cter^{TM-Sec61}-PAGFP. The β -tubulin has been used as a loading control (lower panel).

Supplementary movie 1

Single photoactivation of DIF3 myotubes expressing PAGFP-KDEL. Scale bars = 5 μm .

The fluorescence of PAGFP-KDEL molecules initially detected in the ROI rapidly faded away after activation.

Supplementary movie 2

Single photoactivation of DIF9 myotubes expressing PAGFP-KDEL. Scale bars = 5 μm .

The fluorescence of PAGFP-KDEL molecules initially detected in the ROI rapidly faded away after activation.

Supplementary movie 3

Single photoactivation of DIF3 myotubes expressing Sec61 β -PAGFP. Scale bars = 5 μm .

The fluorescence of Sec61 β -PAGFP spreads outside the ROI overtime.

Supplementary movie 4

Single photoactivation of DIF9 myotubes expressing Sec61 β -PAGFP. Scale bars = 5 μm .

The fluorescence of Sec61 β -PAGFP spreads outside the ROI overtime.

Supplementary movie 5

Single photoactivation of DIF3 myotubes expressing T95-PAGFP. Scale bars = 5 μm .

No spreading of T95-PAGFP fluorescence outside the ROI was observed.

Supplementary movie 6

Single photoactivation of DIF9 myotubes expressing T95-PAGFP. Scale bars = 5 μm .

No spreading of T95-PAGFP fluorescence outside the ROI was observed.

Supplementary movie 7

Single photoactivation of DIF3 myotubes expressing T95 Δ Cter-PAGFP. Scale bars = 5 μm .

The fluorescence of T95 Δ Cter-PAGFP spreads outside the ROI overtime.

Supplementary movie 8

Single photoactivation of DIF9 myotubes expressing T95 Δ Cter-PAGFP. Scale bars = 5 μ m.
A small decrease of fluorescence of T95 Δ Cter-PAGFP could be observed in the ROI with a subtle spreading of a wave of fluorescence outside the ROI.

Supplementary movie 9

Iterative photoactivation of DIF3 myotubes expressing Sec61 β -PAGFP. Scale bars = 5 μ m.
The fluorescence of Sec61 β -PAGFP spreads throughout the cell overtime.

Supplementary movie 10

Iterative photoactivation of DIF9 myotubes expressing Sec61 β -PAGFP. Scale bars = 5 μ m.
The fluorescence of Sec61 β -PAGFP spreads throughout the cell overtime.

Supplementary movie 11

Iterative photoactivation of DIF3 myotubes expressing T95-PAGFP. Scale bars = 5 μ m.
The fluorescence of T95-PAGFP diffuses outside the ROI and progressively accumulates in clusters far away from the activation zone

Supplementary movie 12

Iterative photoactivation of DIF9 myotubes expressing T95-PAGFP. Scale bars = 5 μ m.
The fluorescence of T95-PAGFP diffuses outside the ROI and progressively accumulates in clusters far away from the activation zone.

Supplementary movie 13

Iterative photoactivation of an adult muscle fiber (*FDB*) expressing T95-PAGFP. Scale bars = 5 μ m.
In an adult muscle fiber, the fluorescence of T95-PAGFP also diffuses outside the ROI and progressively accumulates in clusters far away from the activation zone.

Références

- A -

Aguezzoul, M., Andrieux, A., Denarier, E., 2003. Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics* 81, 623–7.

Aillaud, C., Bosc, C., Peris, L., Bosson, A., Heemeryck, P., Van Dijk, J., Le Friec, J., Boulan, B., Vossier, F., Sanman, L.E., Syed, S., Amara, N., Couté, Y., Lafanechère, L., Denarier, E., Delphin, C., Pelletier, L., Humbert, S., Bogyo, M., Andrieux, A., Rogowski, K., Moutin, M.-J., 2017. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science* 358, 1448–1453. <https://doi.org/10.1126/science.aao4165>

Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., 2015. Microtubule minus-end-targeting proteins. *Curr Biol* 25, R162-71. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.027>

Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell. Sci.* 123, 3415–3419. <https://doi.org/10.1242/jcs.062414>

Akhmanova, A., Steinmetz, M.O., 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 309–22. <https://doi.org/10.1038/nrm2369>

Al-Qusairi, L., Laporte, J., 2011. T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet Muscle* 1, 26. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-26>

Altschaf, B.A., Arvanitis, D.A., Fuentes, O., Yuan, Q., Kranias, E.G., Valdivia, H.H., 2011. Dual role of junctin in the regulation of ryanodine receptors and calcium release in cardiac ventricular myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 6063–6080. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.215988>

Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Faure, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., Job, D., 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16, 2350–64. <https://doi.org/10.1101/gad.223302>

Appenzeller-Herzog, C., Hauri, H.-P., 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of Cell Science* 119, 2173–2183. <https://doi.org/10.1242/jcs.03019>

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

- B -

Baas, P.W., Pienkowski, T.P., Cimbalnik, K.A., Toyama, K., Bakalis, S., Ahmad, F.J., Kosik, K.S., 1994. Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 1), 135–43.

Bai, X.-C., Yan, Z., Wu, J., Li, Z., Yan, N., 2016. The Central domain of RyR1 is the transducer for long-range allosteric gating of channel opening. *Cell Res* 26, 995–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.89>

Bannykh, S.I., Nishimura, N., Balch, W.E., 1998. Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol* 8, 21–5.

Bannykh, S.I., Rowe, T., Balch, W.E., 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J. Cell Biol.* 135, 19–35. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.19>

- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S.S., Groh, S., Chen, C.C., Williamson, R., McNeil, P.L., Campbell, K.P., 2003. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423, 168–72. <https://doi.org/10.1038/nature01573>
- Baratier, J., Peris, L., Brocard, J., Gory-Faure, S., Dufour, F., Bosc, C., Fourest-Lieuvain, A., Blanchoin, L., Salin, P., Job, D., Andrieux, A., 2006. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J Biol Chem* 281, 19561–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509602200>
- Barlowe, C., 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1404, 67–76.
- Barlowe, C., Helenius, A., 2016. Cargo Capture and Bulk Flow in the Early Secretory Pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125016>
- Barra, H.S., Arce, C.A., Argaraña, C.E., 1988. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol. Neurobiol.* 2, 133–153.
- Baumann, O., Walz, B., 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 205, 149–214.
- Beam, K.G., Adams, B.A., Niidome, T., Numa, S., Tanabe, T., 1992. Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel. *Nature* 360, 169–171. <https://doi.org/10.1038/360169a0>
- Beard, N.A., Casarotto, M.G., Wei, L., Varsanyi, M., Laver, D.R., Dulhunty, A.F., 2005. Regulation of ryanodine receptors by calsequestrin: effect of high luminal Ca²⁺ and phosphorylation. *Biophys J* 88, 3444–54. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.051441>
- Beard, N.A., Laver, D.R., Dulhunty, A.F., 2004. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 85, 33–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.07.001>
- Beard, N.A., Sakowska, M.M., Dulhunty, A.F., Laver, D.R., 2002. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys J* 82, 310–20. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75396-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75396-4)
- Beck, R., Rawet, M., Ravet, M., Wieland, F.T., Cassel, D., 2009. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS Lett.* 583, 2701–2709. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.032>
- Begou, M., Brun, P., Bertrand, J.B., Job, D., Schweitzer, A., D'Amato, T., Saoud, M., Andrieux, A., Suaud-Chagny, M.F., 2007. Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse* 61, 689–97. <https://doi.org/10.1002/syn.20409>
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P.W., Deng, S.X., Landry, D.W., Nieman, D., Lehnart, S.E., Samaru, M., LaCampagne, A., Marks, A.R., 2008. Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2198–202. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711074105>
- Belmadani, S., Pous, C., Fischmeister, R., Mery, P.F., 2004. Post-translational modifications of tubulin and microtubule stability in adult rat ventricular myocytes and immortalized HL-1 cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 258, 35–48.
- Belmont, L., Mitchison, T., Deacon, H.W., 1996. Catastrophic revelations about Op18/stathmin. *Trends Biochem Sci* 21, 197–8.

- Benardais, K., Kasem, B., Couegnas, A., Samama, B., Fernandez, S., Schaeffer, C., Antal, M.C., Job, D., Schweitzer, A., Andrieux, A., Giersch, A., Nehlig, A., Boehm, N., 2010. Loss of STOP protein impairs peripheral olfactory neurogenesis. *PLoS One* 5, e12753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012753>
- Ben-Tekaya, H., Miura, K., Pepperkok, R., Hauri, H.-P., 2005. Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *J. Cell. Sci.* 118, 357–367. <https://doi.org/10.1242/jcs.01615>
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>
- Bers, D.M., Stiffel, V.M., 1993. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am J Physiol* 264, C1587-93.
- Bertocchini, F., Ovitt, C.E., Conti, A., Barone, V., Schöler, H.R., Bottinelli, R., Reggiani, C., Sorrentino, V., 1997. Requirement for the ryanodine receptor type 3 for efficient contraction in neonatal skeletal muscles. *EMBO J.* 16, 6956–6963. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.6956>
- Bishop, W.R., Bell, R.M., 1988. Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 579–610. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.003051>
- Block, B.A., Imagawa, T., Campbell, K.P., Franzini-Armstrong, C., 1988. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 107, 2587–2600.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704–1708. <https://doi.org/10.1126/science.1065874>
- Boncompagni, S., d'Amelio, L., Fulle, S., Fanò, G., Protasi, F., 2006. Progressive disorganization of the excitation-contraction coupling apparatus in aging human skeletal muscle as revealed by electron microscopy: a possible role in the decline of muscle performance. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 995–1008. <https://doi.org/10.1093/gerona/61.10.995>
- Boncompagni, S., Thomas, M., Lopez, J.R., Allen, P.D., Yuan, Q., Kranias, E.G., Franzini-Armstrong, C., 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 Ca(2+) homeostasis. *PLoS One* 7, e39962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039962>
- Boncompain, G., Perez, F., 2012. Synchronizing protein transport in the secretory pathway. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 15, Unit 15.19. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1519s57>
- Bonifacino, J.S., Glick, B.S., 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153–166. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)
- Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P., Larcher, J.C., 2001. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J. Biol. Chem.* 276, 12839–12848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011380200>
- Borgese, N., 2016. Getting membrane proteins on and off the shuttle bus between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Cell. Sci.* 129, 1537–1545. <https://doi.org/10.1242/jcs.183335>

- Bosc, C., Cronk, J.D., Pirollet, F., Watterson, D.M., Haiech, J., Job, D., Margolis, R.L., 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2125–30.
- Bottanelli, F., Kilian, N., Ernst, A.M., Rivera-Molina, F., Schroeder, L.K., Kromann, E.B., Lessard, M.D., Erdmann, R.S., Schepartz, A., Baddeley, D., Bewersdorf, J., Toomre, D., Rothman, J.E., 2017. A novel physiological role for ARF1 in the formation of bidirectional tubules from the Golgi. *Mol. Biol. Cell* 28, 1676–1687. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-12-0863>
- Boudriau, S., Vincent, M., Cote, C.H., Rogers, P.A., 1993. Cytoskeletal structure of skeletal muscle: identification of an intricate exosarcomeric microtubule lattice in slow- and fast-twitch muscle fibers. *J Histochem Cytochem* 41, 1013–21.
- Bourguignon, L.Y., Chu, A., Jin, H., Brandt, N.R., 1995. Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca²⁺ release in mouse T-lymphoma cells. *J Biol Chem* 270, 17917–22.
- Bourguignon, L.Y., Jin, H., Iida, N., Brandt, N.R., Zhang, S.H., 1993. The involvement of ankyrin in the regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated internal Ca²⁺ release from Ca²⁺ storage vesicles in mouse T-lymphoma cells. *J Biol Chem* 268, 7290–7.
- Boylan, K., Serr, M., Hays, T., 2000. A molecular genetic analysis of the interaction between the cytoplasmic dynein intermediate chain and the glued (dynactin) complex. *Mol. Biol. Cell* 11, 3791–3803. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.11.3791>
- Brady, S.T., Pfister, K.K., Bloom, G.S., 1990. A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1061–5.
- Brandt, N.R., Caswell, A.H., Wen, S.R., Talvenheimo, J.A., 1990. Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J. Membr. Biol.* 113, 237–251.
- Breuzza, L., Halbeisen, R., Jenö, P., Otte, S., Barlowe, C., Hong, W., Hauri, H.-P., 2004. Proteomics of endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC) membranes from brefeldin A-treated HepG2 cells identifies ERGIC-32, a new cycling protein that interacts with human Erv46. *J. Biol. Chem.* 279, 47242–47253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406644200>
- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasova, E., Moschella, M.C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E., Marks, A.R., 1994. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77, 513–23.
- Brotto, M.A., Nagaraj, R.Y., Brotto, L.S., Takeshima, H., Ma, J.J., Nosek, T.M., 2004. Defective maintenance of intracellular Ca²⁺ homeostasis is linked to increased muscle fatigability in the MG29 null mice. *Cell Res* 14, 373–8. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290237>
- Brun, P., Begou, M., Andrieux, A., Mouly-Badina, L., Clerget, M., Schweitzer, A., Scarna, H., Renaud, B., Job, D., Suaud-Chagny, M.F., 2005. Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem* 94, 63–73. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03166.x>
- Buraei, Z., Yang, J., 2010. The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev* 90, 1461–506. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2009>
- Buratti, R., Prestipino, G., Menegazzi, P., Treves, S., Zorzato, F., 1995. Calcium dependent activation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 1082–90. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2238>

Butler, J., Lee, A.G., Wilson, D.I., Spalluto, C., Hanley, N.A., East, J.M., 2007. Phospholamban and sarcolipin are maintained in the endoplasmic reticulum by retrieval from the ER-Golgi intermediate compartment. *Cardiovasc Res* 74, 114–23. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.01.006>

- C -

Cadot, B., Gache, V., Vasyutina, E., Falcone, S., Birchmeier, C., Gomes, E.R., 2012. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3. *EMBO Rep* 13, 741–9. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.89>

Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Pan, Z., Nishi, M., Komazaki, S., Takeshima, H., Ma, J., 2009a. MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells. *J Biol Chem* 284, 3314–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808866200>

Cai, C., Weisleder, N., Ko, J.K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., Ma, J., 2009b. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J Biol Chem* 284, 15894–902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009589>

Cala, S.E., Miles, K., 1992. Phosphorylation of the cardiac isoform of calsequestrin in cultured rat myotubes and rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1118, 277–87.

Callaway, C., Seryshev, A., Wang, J.P., Slavik, K.J., Needleman, D.H., Cantu, C., 3rd, Wu, Y., Jayaraman, T., Marks, A.R., Hamilton, S.L., 1994. Localization of the high and low affinity [³H]ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem* 269, 15876–84.

Campbell, K.P., MacLennan, D.H., Jorgensen, A.O., Mintzer, M.C., 1983. Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53,000 dalton glycoprotein. *J Biol Chem* 258, 1197–204.

Campiglio, M., Kaplan, M.M., Flucher, B.E., 2018. STAC3 incorporation into skeletal muscle triads occurs independent of the dihydropyridine receptor. *J. Cell. Physiol.* 233, 9045–9051. <https://doi.org/10.1002/jcp.26767>

Caplow, M., Shanks, J., 1996. Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell* 7, 663–675. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.4.663>

Carl, S.L., Felix, K., Caswell, A.H., Brandt, N.R., Ball, W.J., Vaghy, P.L., Meissner, G., Ferguson, D.G., 1995a. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J. Cell Biol.* 129, 673–682. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.3.673>

Carl, S.L., Felix, K., Caswell, A.H., Brandt, N.R., Brunschwig, J.P., Meissner, G., Ferguson, D.G., 1995b. Immunolocalization of triadin, DHP receptors, and ryanodine receptors in adult and developing skeletal muscle of rats. *Muscle Nerve* 18, 1232–1243. <https://doi.org/10.1002/mus.880181104>

Carman, P.J., Dominguez, R., 2018. BAR domain proteins—a linkage between cellular membranes, signaling pathways, and the actin cytoskeleton. *Biophys Rev* 10, 1587–1604. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0467-7>

Cassimeris, L., Pryer, N.K., Salmon, E.D., 1988. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J Cell Biol* 107, 2223–31.

Cassimeris, L., Spittle, C., 2001. Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* 210, 163–226.

Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>

Chaube, R., Hess, D.T., Wang, Y.-J., Plummer, B., Sun, Q.-A., Laurita, K., Stamler, J.S., 2014. Regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor/Ca²⁺-release channel RyR1 by S-palmitoylation. *J. Biol. Chem.* 289, 8612–8619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548925>

Chelu, M.G., Danila, C.I., Gilman, C.P., Hamilton, S.L., 2004. Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc. Med.* 14, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2004.06.003>

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., Hirokawa, N., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674–7. <https://doi.org/10.1038/360674a0>

Chopra, N., Yang, T., Asghari, P., Moore, E.D., Huke, S., Akin, B., Cattolica, R.A., Perez, C.F., Hlaing, T., Knollmann-Ritschel, B.E., Jones, L.R., Pessah, I.N., Allen, P.D., Franzini-Armstrong, C., Knollmann, B.C., 2009. Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7636–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902919106>

Chretien, D., Metoz, F., Verde, F., Karsenti, E., Wade, R.H., 1992. Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J Cell Biol* 117, 1031–40.

Collot, M., Ashokkumar, P., Anton, H., Boutant, E., Faklaris, O., Galli, T., Mély, Y., Danglot, L., Klymchenko, A.S., 2019. MemBright: A Family of Fluorescent Membrane Probes for Advanced Cellular Imaging and Neuroscience. *Cell Chem Biol* 26, 600-614.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.01.009>

Cui, Y., Tae, H.-S., Norris, N.C., Karunasekara, Y., Pouliquin, P., Board, P.G., Dulhunty, A.F., Casarotto, M.G., 2009. A dihydropyridine receptor alpha1s loop region critical for skeletal muscle contraction is intrinsically unstructured and binds to a SPRY domain of the type 1 ryanodine receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.004>

Cui-Wang, T., Hanus, C., Cui, T., Helton, T., Bourne, J., Watson, D., Harris, K.M., Ehlers, M.D., 2012. Local zones of endoplasmic reticulum complexity confine cargo in neuronal dendrites. *Cell* 148, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.056>

Curtis, B.M., Catterall, W.A., 1984. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23, 2113–2118. <https://doi.org/10.1021/bi00305a001>

Cusimano, V., Pampinella, F., Giacomello, E., Sorrentino, V., 2009. Assembly and dynamics of proteins of the longitudinal and junctional sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4695–4700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810243106>

- D -

Dabiri, G.A., Turnacioglu, K.K., Sanger, J.M., Sanger, J.W., 1997. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9493–8.

Dainese, M., Quarta, M., Lyfenko, A.D., Paolini, C., Canato, M., Reggiani, C., Dirksen, R.T., Protasi, F., 2009. Anesthetic- and heat-induced sudden death in calsequestrin-1-knockout mice. *FASEB J* 23, 1710–20. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121335>

- D'Alessandro, M., Hnia, K., Gache, V., Koch, C., Gavriilidis, C., Rodriguez, D., Nicot, A.S., Romero, N.B., Schwab, Y., Gomes, E., Labouesse, M., Laporte, J., 2015. Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus Positioning and Shape by Linking the Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Dev Cell* 35, 186–98. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.09.018>
- Damiani, E., Picello, E., Saggin, L., Margreth, A., 1995. Identification of triadin and of histidine-rich Ca(2+)-binding protein as substrates of 60 kDa calmodulin-dependent protein kinase in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of rabbit fast muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 457–65. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1524>
- Damiani, E., Volpe, P., Margreth, A., 1990. Coexpression of two isoforms of calsequestrin in rabbit slow-twitch muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 11, 522–30.
- Deloulme, J.C., Gory-Faure, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucier, C., Deparis, A.A., Montigon, O., Daoust, A., Barbier, E.L., Bosc, C., Deglon, N., Brocard, J., Denarier, E., Le Brun, I., Pernet-Gallay, K., Vilgrain, I., Robinson, P.J., Lahrech, H., Mann, F., Andrieux, A., 2015. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat Commun* 6, 7246. <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>
- Delphin, C., Bouvier, D., Seggio, M., Couriol, E., Saoudi, Y., Denarier, E., Bosc, C., Valiron, O., Bisbal, M., Arnal, I., Andrieux, A., 2012. MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *J Biol Chem* 287, 35127–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.398339>
- Denarier, E., Aguezoul, M., Jolly, C., Vourc'h, C., Roure, A., Andrieux, A., Bosc, C., Job, D., 1998a. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 791–796. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8179>
- Denarier, E., Fourest-Lieuvain, A., Bosc, C., Pirollet, F., Chapel, A., Margolis, R.L., Job, D., 1998b. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6055–60.
- Desai, A., Mitchison, T.J., 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83>
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., Walczak, C.E., 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96, 69–78.
- DiFranco, M., Quinonez, M., Capote, J., Vergara, J., 2009. DNA transfection of mammalian skeletal muscles using in vivo electroporation. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/1520>
- Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Pous, C., Perez, F., 2008. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science* 322, 1353–6. <https://doi.org/10.1126/science.1165401>
- Doms, R.W., Russ, G., Yewdell, J.W., 1989. Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109, 61–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.1.61>

Donaldson, P.L., Beam, K.G., 1983. Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. *J. Gen. Physiol.* 82, 449–468. <https://doi.org/10.1085/jgp.82.4.449>

Doucet, C.M., Hetzer, M.W., 2010. Nuclear pore biogenesis into an intact nuclear envelope. *Chromosoma* 119, 469–477. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0289-2>

Draeger, A., Weeds, A.G., Fitzsimons, R.B., 1987. Primary, secondary and tertiary myotubes in developing skeletal muscle: a new approach to the analysis of human myogenesis. *J. Neurol. Sci.* 81, 19–43.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., Kirschner, M.W., 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3, 1141–54.

Drewes, G., Ebner, A., Mandelkow, E.M., 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* 23, 307–11.

Dulhunty, A.F., Haarmann, C.S., Green, D., Laver, D.R., Board, P.G., Casarotto, M.G., 2002. Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 79, 45–75.

Duncan, J.E., Goldstein, L.S.B., 2006. The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genet.* 2, e124. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020124>

- E, F -

Eckhardt, J., Bachmann, C., Sekulic-Jablanovic, M., Enzmann, V., Park, K.H., Ma, J., Takeshima, H., Zorzato, F., Treves, S., 2019. Extraocular muscle function is impaired in *ryr3*^{-/-} mice. *J. Gen. Physiol.* <https://doi.org/10.1085/jgp.201912333>

Efremov, R.G., Leitner, A., Aebersold, R., Raunser, S., 2015. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* 517, 39–43. <https://doi.org/10.1038/nature13916>

Endow, S.A., Kull, F.J., Liu, H., 2010. Kinesins at a glance. *J. Cell. Sci.* 123, 3420–3424. <https://doi.org/10.1242/jcs.064113>

Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., Salin, P.A., Job, D., Wehland, J., 2005. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7853–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409626102>

Errico, A., Ballabio, A., Rugarli, E.I., 2002. Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum. Mol. Genet.* 11, 153–163. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.2.153>

Fagone, P., Jackowski, S., 2009. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S311-316. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800049-JLR200>

Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I., Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., Romero, N.B., Marazzi, G., Sassoon, D., Laporte, J., Gomes, E.R., 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. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404436>

Fan, H., Brandt, N.R., Caswell, A.H., 1995. Disulfide bonds, N-glycosylation and transmembrane topology of skeletal muscle triadin. *Biochemistry* 34, 14902–8.

Faulkner, G., Lanfranchi, G., Valle, G., 2001. Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life* 51, 275–282. <https://doi.org/10.1080/152165401317190761>

Felder, E., Protasi, F., Hirsch, R., Franzini-Armstrong, C., Allen, P.D., 2002. Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys. J.* 82, 3144–3149. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75656-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75656-7)

Flucher, B.E., 1992. Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev. Biol.* 154, 245–260.

Flucher, B.E., Kasielke, N., Grabner, M., 2000. The triad targeting signal of the skeletal muscle calcium channel is localized in the COOH terminus of the alpha(1S) subunit. *J Cell Biol* 151, 467–78.

Flucher, B.E., Phillips, J.L., Powell, J.A., 1991. Dihydropyridine receptor alpha subunits in normal and dysgenic muscle in vitro: expression of alpha 1 is required for proper targeting and distribution of alpha 2. *J Cell Biol* 115, 1345–56.

Flucher, B.E., Takekura, H., Franzini-Armstrong, C., 1993. Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: association of sarcoplasmic reticulum and transverse tubules with myofibrils. *Dev Biol* 160, 135–47. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1292>

Fourest-Lieuvain, A., Rendu, J., Osseni, A., Pernet-Gallay, K., Rossi, D., Oddoux, S., Brocard, J., Sorrentino, V., Marty, I., Fauré, J., 2012. Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J. Cell. Sci.* 125, 3443–3453. <https://doi.org/10.1242/jcs.100958>

Fournet, V., Schweitzer, A., Chevarin, C., Deloulme, J.C., Hamon, M., Giros, B., Andrieux, A., Martres, M.P., 2012. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. *J Neurochem* 121, 99–114. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07615.x>

Fox, P.D., Haberkorn, C.J., Weigel, A.V., Higgins, J.L., Akin, E.J., Kennedy, M.J., Krapf, D., Tamkun, M.M., 2013. Plasma membrane domains enriched in cortical endoplasmic reticulum function as membrane protein trafficking hubs. *Mol Biol Cell* 24, 2703–13. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0895>

Franzini-Armstrong, C., 2004. Functional implications of RyR-dHPR relationships in skeletal and cardiac muscles. *Biol. Res.* 37, 507–512.

Franzini-Armstrong, C., 1991. Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. *Dev Biol* 146, 353–63.

Franzini-Armstrong, C., Kenney, L.J., Varriano-Marston, E., 1987. The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J Cell Biol* 105, 49–56.

Franzini-Armstrong, C., Porter, K.R., 1964. SARCOLEMMA INVAGINATIONS CONSTITUTING THE T SYSTEM IN FISH MUSCLE FIBERS. *J. Cell Biol.* 22, 675–696. <https://doi.org/10.1083/jcb.22.3.675>

Friedman, J.R., Voeltz, G.K., 2011. The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol* 21, 709–17. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.004>

Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., Voeltz, G.K., 2010. ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* 190, 363–375. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911024>

Froemming, G.R., Murray, B.E., Ohlendieck, K., 1999. Self-aggregation of triadin in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1418, 197–205.

Fu, Y., Hong, T., 2016. BIN1 regulates dynamic t-tubule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1839–1847. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.004>

Füllekrug, J., Sönnichsen, B., Schäfer, U., Nguyen Van, P., Söling, H.D., Mieskes, G., 1997. Characterization of brefeldin A induced vesicular structures containing cycling proteins of the intermediate compartment/cis-Golgi network. *FEBS Lett.* 404, 75–81. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00097-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00097-5)

- G -

Gache, V., Gomes, E.R., Cadot, B., 2017. Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell* 28, 865–874. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-06-0405>

Galbiati, F., Engelman, J.A., Volonte, D., Zhang, X.L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Edelmann, W., Lisanti, M.P., 2001. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 276, 21425–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100828200>

Galjart, N., 2010. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr. Biol.* 20, R528-537. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.022>

Gallo, A., Vannier, C., Galli, T., 2016. Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Associations: Structures and Functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 279–301. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125024>

Gao, L., Balshaw, D., Xu, L., Tripathy, A., Xin, C., Meissner, G., 2000. Evidence for a role of the luminal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor) activity and conductance. *Biophys. J.* 79, 828–840. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76339-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76339-9)

- Gatti, G., Podini, P., Meldolesi, J., 1997. Overexpression of calsequestrin in L6 myoblasts: formation of endoplasmic reticulum subdomains and their evolution into discrete vacuoles where aggregates of the protein are specifically accumulated. *Mol Biol Cell* 8, 1789–803.
- Gerace, L., Foisner, R., 1994. Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.* 4, 127–131.
- Geva, Y., Schuldiner, M., 2014. The back and forth of cargo exit from the endoplasmic reticulum. *Curr Biol* 24, R130-6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.008>
- Giacomello, E., Ronchi, P., Pepperkok, R., 2019. GM130 and p115 play a key role in the organisation of the early secretory pathway during skeletal muscle differentiation. *J. Cell. Sci.* 132. <https://doi.org/10.1242/jcs.222083>
- Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M., Sorrentino, V., 1995. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell Biol.* 128, 893–904. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.5.893>
- Giannini, G., Sorrentino, V., 1995. Molecular structure and tissue distribution of ryanodine receptors calcium channels. *Med Res Rev* 15, 313–323.
- Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P., Cleveland, D.W., 1991. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* 115, 1639–1650.
- Ginkel, L.M., Wordeman, L., 2000. Expression and partial characterization of kinesin-related proteins in differentiating and adult skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell* 11, 4143–4158. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4143>
- Giudice, J., Loehr, J.A., Rodney, G.G., Cooper, T.A., 2016. Alternative Splicing of Four Trafficking Genes Regulates Myofiber Structure and Skeletal Muscle Physiology. *Cell Rep* 17, 1923–1933. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.072>
- Goldberg, M.W., Allen, T.D., 1995. Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 301–309.
- Goldstein, L.S., Philp, A.V., 1999. The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 141–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.141>
- Golini, L., Chouabe, C., Berthier, C., Cusimano, V., Fornaro, M., Bonvallet, R., Formoso, L., Giacomello, E., Jacquemond, V., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292755>
- Gonzalez-Serratos, H., Valle-Aguilera, R., Lathrop, D.A., Garcia, M.C., 1982. Slow inward calcium currents have no obvious role in muscle excitation-contraction coupling. *Nature* 298, 292–294.
- Goonasekera, S.A., Beard, N.A., Groom, L., Kimura, T., Lyfenko, A.D., Rosenfeld, A., Marty, I., Dulhunty, A.F., Dirksen, R.T., 2007. Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the

ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J. Gen. Physiol.* 130, 365–378. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709790>

Gory-Faure, S., Windscheid, V., Bosc, C., Peris, L., Proietto, D., Franck, R., Denarier, E., Job, D., Andrieux, A., 2006. STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins. *J Biol Chem* 281, 28387–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603380200>

Gory-Faure, S., Windscheid, V., Brocard, J., Montessuit, S., Tsutsumi, R., Denarier, E., Fukata, Y., Bosc, C., Delaroche, J., Collomb, N., Fukata, M., Martinou, J.C., Pernet-Gallay, K., Andrieux, A., 2014. Non-microtubular localizations of microtubule-associated protein 6 (MAP6). *PLoS One* 9, e114905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114905>

Granger, B.L., Lazarides, E., 1978. The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell* 15, 1253–1268.

Greenfield, J.J., High, S., 1999. The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 10), 1477–1486.

Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J.A., Coronado, R., Powers, P.A., 1996. Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13961–6.

Griffiths, G., Warren, G., Quinn, P., Mathieu-Costello, O., Hoppeler, H., 1984. Density of newly synthesized plasma membrane proteins in intracellular membranes. I. Stereological studies. *J Cell Biol* 98, 2133–41.

Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Jr., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., 2008. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol* 18, 177–82. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.050>

Groh, S., Marty, I., Ottolia, M., Prestipino, G., Chapel, A., Villaz, M., Ronjat, M., 1999. Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 12278–12283.

Guerrero, K., Monge, C., Bruckner, A., Puurand, U., Kadaja, L., Kaambre, T., Seppet, E., Saks, V., 2010. Study of possible interactions of tubulin, microtubular network, and STOP protein with mitochondria in muscle cells. *Mol Cell Biochem* 337, 239–49. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0304-1>

Guo, W., Campbell, K.P., 1995. Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270, 9027–30.

- H -

Halpain, S., Dehmelt, L., 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7, 224.

- Handhale, A., Ormonde, C.E., Thomas, N.L., Bralesford, C., Williams, A.J., Lai, F.A., Zissimopoulos, S., 2016. Calsequestrin interacts directly with the cardiac ryanodine receptor luminal domain. *J Cell Sci.* <https://doi.org/10.1242/jcs.191643>
- Hauri, H.P., Kappeler, F., Andersson, H., Appenzeller, C., 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 4), 587–596.
- Hernández-Deviez, D.J., Martin, S., Laval, S.H., Lo, H.P., Cooper, S.T., North, K.N., Bushby, K., Parton, R.G., 2006. Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Hum. Mol. Genet.* 15, 129–142. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi434>
- Hesselmans, L.F., Jennekens, F.G., Van den Oord, C.J., Veldman, H., Vincent, A., 1993. Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: relation to acetylcholine receptors. *Anat. Rec.* 236, 553–562. <https://doi.org/10.1002/ar.1092360315>
- Hetzer, M.W., 2010. The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000539>
- Hirokawa, N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519–526. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.519>
- Hirokawa, N., Nitta, R., Okada, Y., 2009. The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 877–84. <https://doi.org/10.1038/nrm2807>
- Hong, T.T., Smyth, J.W., Gao, D., Chu, K.Y., Vogan, J.M., Fong, T.S., Jensen, B.C., Colecraft, H.M., Shaw, R.M., 2010. BIN1 localizes the L-type calcium channel to cardiac T-tubules. *PLoS Biol* 8, e1000312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000312>
- Hughes, H., Stephens, D.J., 2008. Assembly, organization, and function of the COPII coat. *Histochem. Cell Biol.* 129, 129–151. <https://doi.org/10.1007/s00418-007-0363-x>
- Hulme, J.T., Konoki, K., Lin, T.W.-C., Gritsenko, M.A., Camp, D.G., Bigelow, D.J., Catterall, W.A., 2005. Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5274–5279. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409885102>
- Huxley, H.E., 1953. Electron microscope studies of the organisation of the filaments in striated muscle. *Biochim Biophys Acta* 12, 387–94.
- Hyman, A., Karsenti, E., 1998. The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J Cell Sci* 111 (Pt 15), 2077–83.
- Hyman, A.A., Chretien, D., Arnal, I., Wade, R.H., 1995. Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. *J Cell Biol* 128, 117–25.
- Hyman, A.A., Salser, S., Drechsel, D.N., Unwin, N., Mitchison, T.J., 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol. Biol. Cell* 3, 1155–1167. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1155>

- I, J -

Inui, M., Saito, A., Fleischer, S., 1987. Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262, 1740–1747.

Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura, K., Takeshima, H., 2001. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol* 154, 1059–67. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105040>

James, P., Vorherr, T., Carafoli, E., 1995. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem Sci* 20, 38–42.

Janke, C., 2014. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 206, 461–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406055>

Job, D., Fischer, E.H., Margolis, R.L., 1981. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4679–82.

Job, D., Rauch, C.T., Fischer, E.H., Margolis, R.L., 1983. Regulation of microtubule cold stability by calmodulin-dependent and -independent phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3894–8.

Jones, L.R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A.O., Kelley, J., 1995. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270, 30787–96.

Jorgensen, A.O., Shen, A.C., Arnold, W., Leung, A.T., Campbell, K.P., 1989. Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: an immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol* 109, 135–47.

Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., Laporte, J., 2008. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 3, 26. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-26>

- K -

Kaakinen, M., Papponen, H., Metsikkö, K., 2008. Microdomains of endoplasmic reticulum within the sarcoplasmic reticulum of skeletal myofibers. *Exp. Cell Res.* 314, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.10.009>

Kaisto, T., Luukela, V., Birr, E., Metsikkö, K., 2002. Retargeting of viral glycoproteins into a non-exporting compartment during the myogenic differentiation of rat L6 cells. *Cell Tissue Res.* 308, 381–390. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0556-5>

Kaisto, T., Metsikkö, K., 2003. Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers. *Exp. Cell Res.* 289, 47–57.

Kaisto, T., Rahkila, P., Marjomaki, V., Parton, R.G., Metsikko, K., 1999. Endocytosis in skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 253, 551–60. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4659>

- Kano, Y., Fujimaki, N., Ishikawa, H., 1991. The distribution and arrangement of microtubules in mammalian skeletal muscle fibers. *Cell Struct Funct* 16, 251–61.
- Kardon, J.R., Vale, R.D., 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 854–865. <https://doi.org/10.1038/nrm2804>
- Karin, N.J., Settle, V.J., 1992. The sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, SERCA1a, contains endoplasmic reticulum targeting information. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 219–227. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)80796-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80796-x)
- Karki, S., Holzbaur, E.L., 1999. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 45–53.
- Karolczak, J., Pavlyk, I., Majewski, Ł., Sobczak, M., Niewiadomski, P., Rzhetsky, Y., Sikorska, A., Nowak, N., Pomorski, P., Prószyński, T., Ehler, E., Rędownicz, M.J., 2015. Involvement of unconventional myosin VI in myoblast function and myotube formation. *Histochem. Cell Biol.* 144, 21–38. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1322-6>
- Kerr, J.P., Robison, P., Shi, G., Bogush, A.I., Kempema, A.M., Hexum, J.K., Becerra, N., Harki, D.A., Martin, S.S., Raiteri, R., Prosser, B.L., Ward, C.W., 2015. Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nat Commun* 6, 8526. <https://doi.org/10.1038/ncomms9526>
- Khairallah, R.J., Shi, G., Sbrana, F., Prosser, B.L., Borroto, C., Mazaitis, M.J., Hoffman, E.P., Mahurkar, A., Sachs, F., Sun, Y., Chen, Y.W., Raiteri, R., Lederer, W.J., Dorsey, S.G., Ward, C.W., 2012. Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *Sci Signal* 5, ra56. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002829>
- Kieny, M., Mauger, A., Chevallier, A., Pautou, M.P., 1988. Origin and development of avian skeletal musculature. *Reprod Nutr Dev* 28, 673–686.
- Kilarski, W., Jakubowska, M., 1979. An electron microscope study of myofibril formation in embryonic rabbit skeletal muscle. *Z Mikrosk Anat Forsch* 93, 1159–81.
- Kim, E., Youn, B., Kemper, L., Campbell, C., Milting, H., Varsanyi, M., Kang, C., 2007. Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J. Mol. Biol.* 373, 1047–1057. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.055>
- Kim, K.C., Caswell, A.H., Talvenheimo, J.A., Brandt, N.R., 1990. Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* 29, 9281–9289.
- King, S.M., 2000. AAA domains and organization of the dynein motor unit. *J Cell Sci* 113 (Pt 14), 2521–6.
- Klinge, L., Harris, J., Sewry, C., Charlton, R., Anderson, L., Laval, S., Chiu, Y.H., Hornsey, M., Straub, V., Barresi, R., Lochmuller, H., Bushby, K., 2010. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 41, 166–73. <https://doi.org/10.1002/mus.21166>

- Klinge, L., Laval, S., Keers, S., Haldane, F., Straub, V., Barresi, R., Bushby, K., 2007. From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB J* 21, 1768–76. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7659com>
- Klopfenstein, D.R., Kappeler, F., Hauri, H.P., 1998. A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J* 17, 6168–77. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6168>
- Klopfenstein, D.R., Klumperman, J., Lustig, A., Kammerer, R.A., Oorschot, V., Hauri, H.P., 2001. Subdomain-specific localization of CLIMP-63 (p63) in the endoplasmic reticulum is mediated by its luminal alpha-helical segment. *J Cell Biol* 153, 1287–300.
- Knollmann, B.C., Chopra, N., Hlaing, T., Akin, B., Yang, T., Etensohn, K., Knollmann, B.E.C., Horton, K.D., Weissman, N.J., Holinstat, I., Zhang, W., Roden, D.M., Jones, L.R., Franzini-Armstrong, C., Pfeifer, K., 2006. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J. Clin. Invest.* 116, 2510–2520. <https://doi.org/10.1172/JCI29128>
- Knudson, C.M., Chaudhari, N., Sharp, A.H., Powell, J.A., Beam, K.G., Campbell, K.P., 1989. Specific absence of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine receptor in mice with muscular dysgenesis. *J Biol Chem* 264, 1345–8.
- Knudson, C.M., Stang, K.K., Jorgensen, A.O., Campbell, K.P., 1993. Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J. Biol. Chem.* 268, 12637–12645.
- Kobayashi, Y.M., Alseikhan, B.A., Jones, L.R., 2000. Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 17639–17646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002091200>
- Kobayashi, Y.M., Jones, L.R., 1999. Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J. Biol. Chem.* 274, 28660–28668.
- Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T., Sabe, H., 2004. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J* 23, 4413–22. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600442>
- Komazaki, S., Ito, K., Takeshima, H., Nakamura, H., 2002. Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. *FEBS Lett* 524, 225–9.
- Komazaki, S., Nishi, M., Kangawa, K., Takeshima, H., 1999. Immunolocalization of mitsugumin29 in developing skeletal muscle and effects of the protein expressed in amphibian embryonic cells. *Dev Dyn* 215, 87–95. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199906\)215:2<87::AID-DVDY1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199906)215:2<87::AID-DVDY1>3.0.CO;2-Y)
- Komazaki, S., Nishi, M., Takeshima, H., Nakamura, H., 2001. Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. *Dev Growth Differ* 43, 717–23.
- Konishi, Y., Setou, M., 2009. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 12, 559–67. <https://doi.org/10.1038/nn.2314>

Kuehn, M.J., Schekman, R., 1997. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 477–483.

Kumar, J., Yu, H., Sheetz, M.P., 1995. Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. *Science* 267, 1834–1837. <https://doi.org/10.1126/science.7892610>

Kumar, P., Wittmann, T., 2012. +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol.* 22, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.005>

- L -

Lacampagne, A., Fauconnier, J., Richard, S., 2008. [Ryanodine receptor and heart disease]. *Med Sci (Paris)* 24, 399–405. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008244399>

Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N.D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D.W., Janke, C., 2010. Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* 189, 945–54. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001024>

Lamb, G.D., 2000. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 216–24.

Lamb, G.D., Stephenson, D.G., 1996. Effects of FK506 and rapamycin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 494 (Pt 2), 569–76.

Landstrom, A.P., Beavers, D.L., Wehrens, X.H.T., 2014. The junctophilin family of proteins: from bench to bedside. *Trends Mol Med* 20, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.02.004>

Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., Hamilton, S.L., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>

Larsson, L., Ansved, T., 1995. Effects of ageing on the motor unit. *Prog. Neurobiol.* 45, 397–458.

Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.C., Farsad, K., Wenk, M.R., De Camilli, P., 2002. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297, 1193–6. <https://doi.org/10.1126/science.1071362>

Lee, J.M., Rho, S.-H., Shin, D.W., Cho, C., Park, W.J., Eom, S.H., Ma, J., Kim, D.H., 2004. Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor are involved in the interaction with triadin. *J. Biol. Chem.* 279, 6994–7000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312446200>

Lee, M.C.S., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., Schekman, R., 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 87–123. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.105307>

Leenhardt, A., Denjoy, I., Guicheney, P., 2012. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 5, 1044–52. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.962027>

- Lewis, K.M., Munske, G.R., Byrd, S.S., Kang, J., Cho, H.-J., Ríos, E., Kang, C., 2016. Characterization of Post-Translational Modifications to Calsequestrins of Cardiac and Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17091539>
- Lewis, K.M., Ronish, L.A., Rios, E., Kang, C., 2015. Characterization of Two Human Skeletal Calsequestrin Mutants Implicated in Malignant Hyperthermia and Vacuolar Aggregate Myopathy. *J Biol Chem* 290, 28665–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.686261>
- Lewkowicz, E., Herit, F., Le Clainche, C., Bourdoncle, P., Perez, F., Niedergang, F., 2008. The microtubule-binding protein CLIP-170 coordinates mDia1 and actin reorganization during CR3-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* 183, 1287–98. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807023>
- Li, L., Mirza, S., Richardson, S.J., Gallant, E.M., Thekkedam, C., Pace, S.M., Zorzato, F., Liu, D., Beard, N.A., Dulhunty, A.F., 2015. A new cytoplasmic interaction between junctin and ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. *J Cell Sci* 128, 951–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.160689>
- Lindsey, J.D., Ellisman, M.H., 1985. The neuronal endomembrane system. I. Direct links between rough endoplasmic reticulum and the cis element of the Golgi apparatus. *J. Neurosci.* 5, 3111–3123.
- Linsley, J.W., Hsu, I.-U., Wang, W., Kuwada, J.Y., 2017. flucher. *Traffic* 18, 622–632. <https://doi.org/10.1111/tra.12502>
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, N.B., Marotta, A., Conrad, P.A., Bloom, G.S., 1995. Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. *J. Cell Biol.* 128, 293–306. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.3.293>
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J.G., Schweizer, A., Berger, E.G., Hauri, H.P., Yuan, L.C., Klausner, R.D., 1990. Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60, 821–836. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90096-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90096-w)
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Tang, Z., Sargiacomo, M., 1994. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 4, 231–5.
- Liu, S.H., Towler, M.C., Chen, E., Chen, C.Y., Song, W., Apodaca, G., Brodsky, F.M., 2001. A novel clathrin homolog that co-distributes with cytoskeletal components functions in the trans-Golgi network. *EMBO J* 20, 272–84. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.272>
- Liu, W., Chakkalakal, J.V., 2018. The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 99–124. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.005>
- Lomakin, A.J., Semenova, I., Zaliapin, I., Kraikivski, P., Nadezhdina, E., Slepchenko, B.M., Akhmanova, A., Rodionov, V., 2009. CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport. *Dev Cell* 17, 323–33. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.07.010>

Lu, Z., Joseph, D., Bugnard, E., Zaal, K.J., Ralston, E., 2001. Golgi complex reorganization during muscle differentiation: visualization in living cells and mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12, 795–808. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.795>

Ludueno, R.F., 1998. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 178, 207–75.

Luff, A.R., Atwood, H.L., 1971. Changes in the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system of fast and slow skeletal muscles of the mouse during postnatal development. *J Cell Biol* 51, 369–83.

- M -

Maas, C., Belgardt, D., Lee, H.K., Heisler, F.F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M.M., van Dijk, J., Hausrat, T.J., Janke, C., Kneussel, M., 2009. Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8731–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812391106>

MacLennan, D.H., Chen, S.R.W., 2009. Store overload-induced Ca²⁺ release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 3113–3115. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172155>

MacLennan, D.H., Wong, P.T., 1971. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 1231–5.

Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., 1995. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 72–81.

Mandelkow, E.M., Lange, G., Jagla, A., Spann, U., Mandelkow, E., 1988. Dynamics of the microtubule oscillator: role of nucleotides and tubulin-MAP interactions. *EMBO J.* 7, 357–365.

Manno, C., Figueroa, L.C., Gillespie, D., Fitts, R., Kang, C., Franzini-Armstrong, C., Rios, E., 2017. Calsequestrin depolymerizes when calcium is depleted in the sarcoplasmic reticulum of working muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E638–E647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620265114>

Margolis, R.L., Wilson, L., 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* 13, 1–8.

Marks, A.R., Tempst, P., Hwang, K.S., Taubman, M.B., Inui, M., Chadwick, C., Fleischer, S., Nadal-Ginard, B., 1989. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8683–8687. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.8683>

Martin, P.D., James, Z.M., Thomas, D.D., 2018. Effect of Phosphorylation on Interactions between Transmembrane Domains of SERCA and Phospholamban. *Biophys. J.* 114, 2573–2583. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.035>

Marty, I., 2015. Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J. Physiol. (Lond.)* 593, 3261–3266. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.281147>

- Marty, I., 2014. Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J Physiol.* <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.281147>
- Marty, I., Fauré, J., Fourest-Lieuvain, A., Vassilopoulos, S., Oddoux, S., Brocard, J., 2009. Triadin: what possible function 20 years later? *J. Physiol. (Lond.)* 587, 3117–3121. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171892>
- Marty, I., Robert, M., Ronjat, M., Bally, I., Arlaud, G., Villaz, M., 1995. Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem J* 307 (Pt 3), 769–74.
- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., De Jongh, K., Lai, Y., Catterall, W.A., Ronjat, M., 1994. Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2270–2274.
- Marty, I., Thevenon, D., Scotto, C., Groh, S., Sainnier, S., Robert, M., Grunwald, D., Villaz, M., 2000. Cloning and Characterization of a New Isoform of Skeletal Muscle Triadin. *J. Biol. Chem.* 275, 8206–8212. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8206>
- McFarland, T.P., Milstein, M.L., Cala, S.E., 2010. Rough endoplasmic reticulum to junctional sarcoplasmic reticulum trafficking of calsequestrin in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49, 556–64. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.05.012>
- McFarland, T.P., Sleiman, N.H., Yaeger, D.B., Cala, S.E., 2011. The cytosolic protein kinase CK2 phosphorylates cardiac calsequestrin in intact cells. *Mol. Cell. Biochem.* 353, 81–91. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0777-6>
- McNally, F.J., Vale, R.D., 1993. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75, 419–29.
- Meissner, G., 1986. Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261, 6300–6306.
- Meissner, G., Rios, E., Tripathy, A., Pasek, D.A., 1997. Regulation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺ and monovalent cations and anions. *J. Biol. Chem.* 272, 1628–1638. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1628>
- Merisko, E.M., Fletcher, M., Palade, G.E., 1986. The reorganization of the Golgi complex in anoxic pancreatic acinar cells. *Pancreas* 1, 95–109.
- Metzger, T., Gache, V., Xu, M., Cadot, B., Folker, E.S., Richardson, B.E., Gomes, E.R., Baylies, M.K., 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature* 484, 120–4. <https://doi.org/10.1038/nature10914>
- Meur, G., Parker, A.K., Gergely, F.V., Taylor, C.W., 2007. Targeting and retention of type 1 ryanodine receptors to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 282, 23096–103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702457200>
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., Numa, S., 1989. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340, 230–233. <https://doi.org/10.1038/340230a0>

- Milstein, M.L., Houle, T.D., Cala, S.E., 2009. Calsequestrin isoforms localize to different ER subcompartments: evidence for polymer and heteropolymer-dependent localization. *Exp. Cell Res.* 315, 523–534. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.11.006>
- Milstein, M.L., McFarland, T.P., Marsh, J.D., Cala, S.E., 2008. Inefficient glycosylation leads to high steady-state levels of actively degrading cardiac triadin-1. *J. Biol. Chem.* 283, 1929–1935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704623200>
- Mitchison, T., Kirschner, M., 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237–42.
- Mitchison, T.J., 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261, 1044–1047.
- Mogessie, B., Roth, D., Rahil, Z., Straube, A., 2015. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife* 4, e05697. <https://doi.org/10.7554/eLife.05697>
- Mohan, R., John, A., 2015. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life* 67, 395–403. <https://doi.org/10.1002/iub.1384>
- Monnier, N., Procaccio, V., Stieglitz, P., Lunardi, J., 1997. Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1316–1325. <https://doi.org/10.1086/515454>
- Monnier, N., Romero, N.B., Lerule, J., Landrieu, P., Nivoche, Y., Fardeau, M., Lunardi, J., 2001. Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum Mol Genet* 10, 2581–92.
- Moore, C.P., Rodney, G., Zhang, J.Z., Santacruz-Tolosa, L., Strasburg, G., Hamilton, S.L., 1999. Apocalmodulin and Ca²⁺ calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *Biochemistry* 38, 8532–7. <https://doi.org/10.1021/bi9907431>
- Morkin, E., 1970. Postnatal muscle fiber assembly: localization of newly synthesized myofibrillar proteins. *Science* 167, 1499–501.
- Morrill, J.A., Cannon, S.C., 2000. COOH-terminal truncated alpha(1S) subunits conduct current better than full-length dihydropyridine receptors. *J. Gen. Physiol.* 116, 341–348. <https://doi.org/10.1085/jgp.116.3.341>
- 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., Shah, N., Soler, A.P., Prendergast, G.C., 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, 4295–306.
- Munro, S., Pelham, H.R., 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899–907.

- Nakada, T., Kashihara, T., Komatsu, M., Kojima, K., Takeshita, T., Yamada, M., 2018. Physical interaction of junctophilin and the CaV1.1 C terminus is crucial for skeletal muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 4507–4512. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716649115>
- Nakai, J., Dirksen, R.T., Nguyen, H.T., Pessah, I.N., Beam, K.G., Allen, P.D., 1996. Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* 380, 72–5. <https://doi.org/10.1038/380072a0>
- Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B., Beam, K.G., 1998. Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* 273, 24983–6.
- Nakańo, A., Muramatsu, M., 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 109, 2677–2691. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.6.2677>
- Nelson, B.R., Wu, F., Liu, Y., Anderson, D.M., McAnally, J., Lin, W., Cannon, S.C., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2013. Skeletal muscle-specific T-tubule protein STAC3 mediates voltage-induced Ca²⁺ release and contractility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 11881–11886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310571110>
- Neuhuber, B., Gerster, U., Doring, F., Glossmann, H., Tanabe, T., Flucher, B.E., 1998. Association of calcium channel alpha1S and beta1a subunits is required for the targeting of beta1a but not of alpha1S into skeletal muscle triads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5015–20.
- Nevalainen, M., Kaisto, T., Metsikkö, K., 2010. Mobile ER-to-Golgi but not post-Golgi membrane transport carriers disappear during the terminal myogenic differentiation. *Cell Tissue Res.* 342, 107–116. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1041-1>
- Newton, T., Black, J.P., Butler, J., Lee, A.G., Chad, J., East, J.M., 2003. Sarco/endoplasmic-reticulum calcium ATPase SERCA1 is maintained in the endoplasmic reticulum by a retrieval signal located between residues 1 and 211. *Biochem J* 371, 775–82. <https://doi.org/10.1042/BJ20021477>
- Nigg, E.A., 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779–787. <https://doi.org/10.1038/386779a0>
- Nishi, M., Sakagami, H., Komazaki, S., Kondo, H., Takeshima, H., 2003. Coexpression of junctophilin type 3 and type 4 in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 118, 102–10.
- Nissinen, M., Kaisto, T., Salmela, P., Peltonen, J., Metsikko, K., 2005. Restricted distribution of mRNAs encoding a sarcoplasmic reticulum or transverse tubule protein in skeletal myofibers. *J Histochem Cytochem* 53, 217–27. <https://doi.org/10.1369/jhc.4A6431.2005>
- Nogales, E., Wang, H.W., 2006. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Curr Opin Cell Biol* 18, 179–84. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.009>

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., Downing, K.H., 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79–88.

Nori, A., Bortoloso, E., Frasson, F., Valle, G., Volpe, P., 2004. Vesicle budding from endoplasmic reticulum is involved in calsequestrin routing to sarcoplasmic reticulum of skeletal muscles. *Biochem. J.* 379, 505–512. <https://doi.org/10.1042/BJ20031875>

Nori, A., Furlan, S., Patiri, F., Cantini, M., Volpe, P., 2000. Site-directed mutagenesis and deletion of three phosphorylation sites of calsequestrin of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Effects on intracellular targeting. *Exp Cell Res* 260, 40–9. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4989>

Nori, A., Gola, E., Tosato, S., Cantini, M., Volpe, P., 1999. Targeting of calsequestrin to sarcoplasmic reticulum after deletions of its acidic carboxy terminus. *Am J Physiol* 277, C974-81.

Nori, A., Valle, G., Bortoloso, E., Turcato, F., Volpe, P., 2006. Calsequestrin targeting to sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C245-53. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00370.2005>

Nori, A., Valle, G., Massimino, M.L., Volpe, P., 2001. Targeting of calsequestrin to the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle upon deletion of its glycosylation site. *Exp. Cell Res.* 265, 104–113. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5172>

- O -

Oddoux, S., Brocard, Julie, Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, Jacques, Fauré, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J., Csernoch, L., Marty, I., 2009. Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J. Biol. Chem.* 284, 34918–34929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022442>

Oddoux, S., Zaal, K.J., Tate, V., Kenea, A., Nandkeolyar, S.A., Reid, E., Liu, W., Ralston, E., 2013. Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J. Cell Biol.* 203, 205–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304063>

Ogata, T., Yamasaki, Y., 1997. Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat. Rec.* 248, 214–223. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199706\)248:2<214::AID-AR8>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199706)248:2<214::AID-AR8>3.0.CO;2-S)

Olah, T., Fodor, J., Oddoux, S., Ruzsnavszky, O., Marty, I., Csernoch, L., 2011. Trisk 32 regulates IP(3) receptors in rat skeletal myoblasts. *Pflugers Arch* 462, 599–610. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1001-y>

Osseni, A., Sébastien, M., Sarraut, O., Baudet, M., Couté, Y., Fauré, J., Fourest-Lieuvin, A., Marty, I., 2016. Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and microtubules in muscle cells. *J. Cell. Sci.* 129, 3744–3755. <https://doi.org/10.1242/jcs.188862>

Otsuka, S., Bui, K.H., Schorb, M., Hossain, M.J., Politi, A.Z., Koch, B., Eltsov, M., Beck, M., Ellenberg, J., 2016. Nuclear pore assembly proceeds by an inside-out extrusion of the nuclear envelope. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19071>

- P -

Panda, D., Miller, H.P., Wilson, L., 1999. Rapid treadmilling of brain microtubules free of microtubule-associated proteins in vitro and its suppression by tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12459–64.

Paolini, C., Quarta, M., Nori, A., Boncompagni, S., Canato, M., Volpe, P., Allen, P.D., Reggiani, C., Protasi, F., 2007. Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol* 583, 767–84. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.138024>

Park, H., Wu, S., Dunker, A.K., Kang, C., 2003. Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca²⁺ regulation. *J. Biol. Chem.* 278, 16176–16182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300120200>

Park, K.W., Goo, J.H., Chung, H.S., Kim, H., Kim, D.H., Park, W.J., 1998. Cloning of the genes encoding mouse cardiac and skeletal calsequestrins: expression pattern during embryogenesis. *Gene* 217, 25–30.

Park, S.H., Zhu, P.-P., Parker, R.L., Blackstone, C., 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J. Clin. Invest.* 120, 1097–1110. <https://doi.org/10.1172/JCI40979>

Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N., Stang, E., 1997. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 136, 137–54.

Patterson, G.H., Lippincott-Schwartz, J., 2002. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297, 1873–1877. <https://doi.org/10.1126/science.1074952>

Pediconi, M.F., Donoso, P., Hidalgo, C., Barrantes, F.J., 1987. Lipid composition of purified transverse tubule membranes isolated from amphibian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 921, 398–404.

Peotter, J., Kasberg, W., Pustova, I., Audhya, A., 2019. COPII-mediated trafficking at the ER/ERGIC interface. *Traffic* 20, 491–503. <https://doi.org/10.1111/tra.12654>

Percival, J.M., Froehner, S.C., 2007. Golgi complex organization in skeletal muscle: a role for Golgi-mediated glycosylation in muscular dystrophies? *Traffic* 8, 184–94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00523.x>

Percival, J.M., Gregorevic, P., Odom, G.L., Banks, G.B., Chamberlain, J.S., Froehner, S.C., 2007. rAAV6-microdystrophin rescues aberrant Golgi complex organization in mdx skeletal muscles. *Traffic* 8, 1424–1439. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00622.x>

Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R., Kreis, T.E., 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* 96, 517–27.

- Perez-Reyes, E., Wei, X.Y., Castellano, A., Birnbaumer, L., 1990. Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem* 265, 20430–6.
- Perni, S., Close, M., Franzini-Armstrong, C., 2013. Novel details of calsequestrin gel conformation in situ. *J Biol Chem* 288, 31358–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507749>
- Peterson, B.Z., DeMaria, C.D., Adelman, J.P., Yue, D.T., 1999. Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549–558.
- Phillips, M.J., Voeltz, G.K., 2016. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 69–82. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.8>
- Phimister, A.J., Lango, J., Lee, E.H., Ernst-Russell, M.A., Takeshima, H., Ma, J., Allen, P.D., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609936200>
- Pirollet, F., Job, D., Fischer, E.H., Margolis, R.L., 1983. Purification and characterization of sheep brain cold-stable microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1560–4.
- Pisaniello, A., Serra, C., Rossi, D., Vivarelli, E., Sorrentino, V., Molinaro, M., Bouché, M., 2003. The block of ryanodine receptors selectively inhibits fetal myoblast differentiation. *J. Cell. Sci.* 116, 1589–1597.
- Pizon, V., Gerbal, F., Diaz, C.C., Karsenti, E., 2005. Microtubule-dependent transport and organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J* 24, 3781–92. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600842>
- Polster, A., Perni, S., Bichraoui, H., Beam, K.G., 2015. Stac adaptor proteins regulate trafficking and function of muscle and neuronal L-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 602–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423113112>
- Polster, A., Perni, S., Filipova, D., Moua, O., Ohrtman, J.D., Bichraoui, H., Beam, K.G., Papadopoulos, S., 2018. Junctional trafficking and restoration of retrograde signaling by the cytoplasmic RyR1 domain. *J Gen Physiol* 150, 293–306. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711879>
- Porter, K.R., Palade, G.E., 1957. Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol* 3, 269–300.
- Potter, J.D., 1982. Preparation of troponin and its subunits. *Methods Enzymol* 85 Pt B, 241–63.
- Pouliquin, P., Dulhunty, A.F., 2009. Homer and the ryanodine receptor. *Eur Biophys J* 39, 91–102. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0494-1>
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J., Lippincott-Schwartz, J., 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81–85. <https://doi.org/10.1038/38001>

Priori, S.G., Napolitano, C., 2005. Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca²⁺ release channels. *J. Clin. Invest.* 115, 2033–2038. <https://doi.org/10.1172/JCI25664>

Prokic, I., Cowling, B.S., Laporte, J., 2014. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J. Mol. Med.* 92, 453–463. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1138-1>

Prosser, B.L., Ward, C.W., Lederer, W.J., 2011. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 333, 1440–5. <https://doi.org/10.1126/science.1202768>

Protasi, F., Franzini-Armstrong, C., Allen, P.D., 1998. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J Cell Biol* 140, 831–42.

Protasi, F., Paolini, C., Dainese, M., 2009. Calsequestrin-1: a new candidate gene for malignant hyperthermia and exertional/environmental heat stroke. *J Physiol* 587, 3095–100. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171967>

Protasi, F., Takekura, H., Wang, Y., Chen, S.R., Meissner, G., Allen, P.D., Franzini-Armstrong, C., 2000. RYR1 and RYR3 have different roles in the assembly of calcium release units of skeletal muscle. *Biophys J* 79, 2494–508. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76491-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76491-5)

Ptáček, L.J., Tawil, R., Griggs, R.C., Engel, A.G., Layzer, R.B., Kwieceński, H., McManis, P.G., Santiago, L., Moore, M., Fouad, G., 1994. Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 77, 863–868.

- Q, R -

Qi, Y., Ogunbunmi, E.M., Freund, E.A., Timerman, A.P., Fleischer, S., 1998. FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *J Biol Chem* 273, 34813–9.

Qiang, L., Yu, W., Andreadis, A., Luo, M., Baas, P.W., 2006. Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J. Neurosci.* 26, 3120–3129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5392-05.2006>

Quintyne, N.J., Gill, S.R., Eckley, D.M., Crego, C.L., Compton, D.A., Schroer, T.A., 1999. Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J. Cell Biol.* 147, 321–334. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.321>

Rahkila, P., Alakangas, A., Väänänen, K., Metsikkö, K., 1996. Transport pathway, maturation, and targetting of the vesicular stomatitis virus glycoprotein in skeletal muscle fibers. *J. Cell. Sci.* 109 (Pt 6), 1585–1596.

Rahkila, P., Luukela, V., Väänänen, K., Metsikkö, K., 1998. Differential targeting of vesicular stomatitis virus G protein and influenza virus hemagglutinin appears during myogenesis of L6 muscle cells. *J. Cell Biol.* 140, 1101–1111.

Rahkila, P., Vaananen, K., Saraste, J., Metsikko, K., 1997. Endoplasmic reticulum to Golgi trafficking in multinucleated skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 234, 452–64. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3633>

- Ralston, E., 1993. Changes in architecture of the Golgi complex and other subcellular organelles during myogenesis. *J Cell Biol* 120, 399–409.
- Ralston, E., Lu, Z., Ploug, T., 1999. The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J. Neurosci.* 19, 10694–10705.
- Ralston, E., Ploug, T., Kalhovde, J., Lomo, T., 2001. *giacom.* *J Neurosci* 21, 875–83.
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B., Kutay, U., 1996a. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 271–303. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001415>
- Rapoport, T.A., Rolls, M.M., Jungnickel, B., 1996b. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol* 8, 499–504.
- Razzaq, A., Robinson, I.M., McMahon, H.T., Skepper, J.N., Su, Y., Zehlf, A.C., Jackson, A.P., Gay, N.J., O’Kane, C.J., 2001. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 15, 2967–79. <https://doi.org/10.1101/gad.207801>
- Realini, C., Rogers, S.W., Rechsteiner, M., 1994. KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett.* 348, 109–113.
- Reck-Peterson, S.L., Redwine, W.B., Vale, R.D., Carter, A.P., 2018. The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 382–398. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0004-3>
- Reck-Peterson, S.L., Yildiz, A., Carter, A.P., Gennerich, A., Zhang, N., Vale, R.D., 2006. Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* 126, 335–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.046>
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., Verhey, K.J., 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16, 2166–72. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.014>
- Relaix, F., Zammit, P.S., 2012. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* 139, 2845–2856. <https://doi.org/10.1242/dev.069088>
- Rezgui, S.S., Vassilopoulos, S., Brocard, J., Platel, J.C., Bouron, A., Arnoult, C., Oddoux, S., Garcia, L., De Waard, M., Marty, I., 2005. Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* 280, 39302–39308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506566200>
- Rhee, D., Sanger, J.M., Sanger, J.W., 1994. The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 28, 1–24. <https://doi.org/10.1002/cm.970280102>
- Rios, E., Brum, G., 1987. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325, 717–20. <https://doi.org/10.1038/325717a0>

- Ríos, E., Gillespie, D., Franzini-Armstrong, C., 2019. The binding interactions that maintain excitation-contraction coupling junctions in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 151, 593–605. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812268>
- Rios, E., Pizarro, G., 1988. Voltage Sensors and Calcium Channels of Excitation-Contraction Coupling. *Physiology* 3, 223–227. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1988.3.6.223>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.000545>
- Rodionov, V.I., Borisy, G.G., 1997. Microtubule treadmilling in vivo. *Science* 275, 215–218.
- Rodney, G.G., Williams, B.Y., Strasburg, G.M., Beckingham, K., Hamilton, S.L., 2000. Regulation of RYR1 activity by Ca(2+) and calmodulin. *Biochemistry* 39, 7807–12.
- Roghi, C., Allan, V.J., 1999. Dynamic association of cytoplasmic dynein heavy chain 1a with the Golgi apparatus and intermediate compartment. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 24), 4673–4685.
- Ronchi, P., Tischer, C., Acehan, D., Pepperkok, R., 2014. Positive feedback between Golgi membranes, microtubules and ER exit sites directs de novo biogenesis of the Golgi. *J. Cell. Sci.* 127, 4620–4633. <https://doi.org/10.1242/jcs.150474>
- Roseblatt, M., Hidalgo, C., Vergara, C., Ikemoto, N., 1981. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 256, 8140–8.
- Rosenberg, H., Pollock, N., Schiemann, A., Bulger, T., Stowell, K., 2015. Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 10, 93. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0310-1>
- Rossi, D., Barone, V., Giacomello, E., Cusimano, V., Sorrentino, V., 2008. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic* 9, 1044–1049. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00717.x>
- Rossi, D., Bencini, C., Maritati, M., Benini, F., Lorenzini, S., Pierantozzi, E., Scarcella, A.M., Paolini, C., Protasi, F., Sorrentino, V., 2014. Distinct regions of triadin are required for targeting and retention at the junctional domain of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 458, 407–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20130719>
- Rossi, D., Scarcella, A.M., Liguori, E., Lorenzini, S., Pierantozzi, E., Kutchukian, C., Jacquemond, V., Messa, M., De Camilli, P., Sorrentino, V., 2019. Molecular determinants of homo- and heteromeric interactions of Junctophilin-1 at triads in adult skeletal muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1820980116>
- Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q.Y., 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. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90010-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90010-0)
- Rout, M.P., Wenthe, S.R., 1994. Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4, 357–365.

Roux-Buisson, N., Cacheux, M., Fourest-Lieuvain, A., Fauconnier, J., Brocard, J., Denjoy, I., Durand, P., Guicheney, P., Kyndt, F., Leenhardt, A., Le Marec, H., Lucet, V., Mabo, P., Probst, V., Monnier, N., Ray, P.F., Santoni, E., Trémeaux, P., Lacampagne, A., Fauré, J., Lunardi, J., Marty, I., 2012. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2759–2767. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds104>

- S -

Saitoh, O., Arai, T., Obinata, T., 1988. Distribution of microtubules and other cytoskeletal filaments during myotube elongation as revealed by fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res* 252, 263–73.

Salanova, M., Priori, G., Barone, V., Intravaia, E., Flucher, B., Ciruela, F., McIlhinney, R.A., Parys, J.B., Mikoshiba, K., Sorrentino, V., 2002. Homer proteins and InsP(3) receptors co-localise in the longitudinal sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibres. *Cell Calcium* 32, 193–200.

Sammak, P.J., Borisy, G.G., 1988. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* 332, 724–6. <https://doi.org/10.1038/332724a0>

Samsó, M., 2017. A guide to the 3D structure of the ryanodine receptor type 1 by cryoEM. *Protein Sci.* 26, 52–68. <https://doi.org/10.1002/pro.3052>

Samsó, M., Radermacher, M., Frank, J., Koonce, M.P., 1998. Structural characterization of a dynein motor domain. *J Mol Biol* 276, 927–37. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1584>

Samsó, M., Wagenknecht, T., 2002. Apocalmodulin and Ca²⁺-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 277, 1349–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109196200>

Sanchez, C., Berthier, C., Allard, B., Perrot, J., Bouvard, C., Tsutsui, H., Okamura, Y., Jacquemond, V., 2018. Tracking the sarcoplasmic reticulum membrane voltage in muscle with a FRET biosensor. *J. Gen. Physiol.* <https://doi.org/10.1085/jgp.201812035>

Sanchez, E.J., Lewis, K.M., Munske, G.R., Nissen, M.S., Kang, C., 2012. Glycosylation of skeletal calsequestrin: implications for its function. *J Biol Chem* 287, 3042–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.326363>

Sanchez, E.J., Munske, G.R., Criswell, A., Milting, H., Dunker, A.K., Kang, C., 2011. Phosphorylation of human calsequestrin: implications for calcium regulation. *Mol Cell Biochem* 353, 195–204. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0787-4>

Sanes, J.R., Lichtman, J.W., 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 791–805. <https://doi.org/10.1038/35097557>

Sanger, J.M., Mittal, B., Pochapin, M.B., Sanger, J.W., 1986. Myofibrillogenesis in living cells microinjected with fluorescently labeled alpha-actinin. *J Cell Biol* 102, 2053–66.

- Santulli, G., Lewis, D., des Georges, A., Marks, A.R., Frank, J., 2018. Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Subcell. Biochem.* 87, 329–352. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_11
- Saraste, J., Kuismanen, E., 1992. Pathways of protein sorting and membrane traffic between the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Semin. Cell Biol.* 3, 343–355.
- Saraste, J., Marie, M., 2018. Intermediate compartment (IC): from pre-Golgi vacuoles to a semi-autonomous membrane system. *Histochem. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1717-2>
- Sato, K., Nishikawa, S., Nakano, A., 1995. Membrane protein retrieval from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER): characterization of the RER1 gene product as a component involved in ER localization of Sec12p. *Mol. Biol. Cell* 6, 1459–1477. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.11.1459>
- Sato, K., Sato, M., Nakano, A., 2003. Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol. Biol. Cell* 14, 3605–3616. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-12-0777>
- Sato, K., Sato, M., Nakano, A., 2001. Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer. *J. Cell Biol.* 152, 935–944. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.5.935>
- Scales, S.J., Pepperkok, R., Kreis, T.E., 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* 90, 1137–1148. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80379-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80379-7)
- Schneider, M.F., 1994. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 463–484. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002335>
- Schredelseker, J., Shrivastav, M., Dayal, A., Grabner, M., 2010. Non-Ca²⁺-conducting Ca²⁺ channels in fish skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5658–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912153107>
- Schwarz, D.S., Blower, M.D., 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Schweizer, A., Fransen, J.A., Bächli, T., Ginsel, L., Hauri, H.P., 1988. Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 107, 1643–1653. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.5.1643>
- Schweizer, A., Rohrer, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., Kornfeld, S., 1995. Reassessment of the subcellular localization of p63. *J Cell Sci* 108 (Pt 6), 2477–85.
- Senda, T., Yoshinaga-Hirabayashi, T., 1998. Intermembrane bridges within membrane organelles revealed by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Anat. Rec.* 251, 339–345. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199807\)251:3<339::AID-AR9>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199807)251:3<339::AID-AR9>3.0.CO;2-Q)

- Serysheva, I., Ludtke, S.J., Baker, M.R., Chiu, W., Hamilton, S.L., 2002. Structure of the voltage-gated L-type Ca²⁺ channel by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10370–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.162363499>
- Serysheva, I.I., 2004. Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry Mosc.* 69, 1226–1232. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0068-5>
- 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., Allen, P.D., Perez, C.F., 2007. Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 282, 37864–37874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705702200>
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., Rapoport, T.A., 2010. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* 143, 774–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.007>
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., Rapoport, T.A., 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 126, 435–9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.019>
- Shin, D.W., Pan, Z., Kim, E.K., Lee, J.M., Bhat, M.B., Parness, J., Kim, D.H., Ma, J., 2003. A retrograde signal from calsequestrin for the regulation of store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *J Biol Chem* 278, 3286–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209045200>
- Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M.J., Mathews, L.M., Schneider, M.D., Hamilton, S.L., Matzuk, M.M., 1998. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391, 489–92. <https://doi.org/10.1038/35146>
- Sirajuddin, M., Rice, L.M., Vale, R.D., 2014. Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 16, 335–44. <https://doi.org/10.1038/ncb2920>
- Sitia, R., Meldolesi, J., 1992. Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell* 3, 1067–72.
- Sleiman, N.H., McFarland, T.P., Jones, L.R., Cala, S.E., 2015. Transitions of protein traffic from cardiac ER to junctional SR. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 81, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.12.025>
- Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T., Lisanti, M.P., 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19, 7289–304.
- Song, Y., Brady, S.T., 2015. Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* 25, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.004>
- Sorrentino, V., 2011. Sarcoplasmic reticulum: structural determinants and protein dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1075–1078. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.04.004>

Sorrentino, V., Volpe, P., 1993. Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 98–103.

Spencer, J.A., Eliazar, S., Ilaria, R.L., Jr., Richardson, J.A., Olson, E.N., 2000. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol* 150, 771–84.

Squire, J.M., 2016. Muscle contraction: Sliding filament history, sarcomere dynamics and the two Huxleys. *Glob Cardiol Sci Pract* 2016, e201611. <https://doi.org/10.21542/gcsp.2016.11>

Stagg, S.M., Gürkan, C., Fowler, D.M., LaPointe, P., Foss, T.R., Potter, C.S., Carragher, B., Balch, W.E., 2006. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 439, 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature04339>

Stagg, S.M., LaPointe, P., Razvi, A., Gürkan, C., Potter, C.S., Carragher, B., Balch, W.E., 2008. Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* 134, 474–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.024>

Stammers, A.N., Susser, S.E., Hamm, N.C., Hlynsky, M.W., Kimber, D.E., Kehler, D.S., Duhamel, T.A., 2015. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol* 93, 843–54. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0463>

Straube, A., Merdes, A., 2007. zhang. *Curr Biol* 17, 1318–25. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.058>

Su, X., Ohi, R., Pellman, D., 2012. Move in for the kill: motile microtubule regulators. *Trends Cell Biol.* 22, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.003>

Suda, Y., Kurokawa, K., Nakano, A., 2017. Regulation of ER-Golgi Transport Dynamics by GTPases in Budding Yeast. *Front Cell Dev Biol* 5, 122. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00122>

Sun, J., Xin, C., Eu, J.P., Stamler, J.S., Meissner, G., 2001. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11158–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.201289098>

- T -

Takekura, H., Bennett, L., Tanabe, T., Beam, K.G., Franzini-Armstrong, C., 1994a. Restoration of junctional tetrads in dysgenic myotubes by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys J* 67, 793–803. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80539-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80539-9)

Takekura, H., Flucher, B.E., Franzini-Armstrong, C., 2001. Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol* 239, 204–14. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0437>

Takekura, H., Nishi, M., Noda, T., Takeshima, H., Franzini-Armstrong, C., 1995. Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3381–5.

- Takekura, H., Sun, X., Franzini-Armstrong, C., 1994b. Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: peripheral and internal calcium release units are formed sequentially. *J Muscle Res Cell Motil* 15, 102–18.
- Takekura, H., Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H., Noda, T., 1994. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369, 556–559. <https://doi.org/10.1038/369556a0>
- Takekura, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T., Iino, M., 1998. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J.* 17, 3309–3316. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3309>
- Takekura, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., Kangawa, K., 2000. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell* 6, 11–22.
- Takekura, H., Yamazawa, T., Ikemoto, T., Takekura, H., Nishi, M., Noda, T., Iino, M., 1995. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *EMBO J.* 14, 2999–3006.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Adams, B.A., Niidome, T., Numa, S., 1990a. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346, 567–9. <https://doi.org/10.1038/346567a0>
- Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A., Numa, S., 1988. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336, 134–9. <https://doi.org/10.1038/336134a0>
- Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S., Beam, K.G., 1990b. Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* 344, 451–453. <https://doi.org/10.1038/344451a0>
- Tanabe, T., Takekura, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., Numa, S., 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313–318. <https://doi.org/10.1038/328313a0>
- Tang, B.L., Wong, S.H., Qi, X.L., Low, S.H., Hong, W., 1993. Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J. Cell Biol.* 120, 325–338. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.2.325>
- Tang, W., Sencer, S., Hamilton, S.L., 2002. Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front Biosci* 7, d1583-9.
- Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F., Lisanti, M.P., 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271, 2255–61.
- Tarroni, P., Rossi, D., Conti, A., Sorrentino, V., 1997. Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 19808–19813. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19808>

- Tassin, A.M., Maro, B., Bornens, M., 1985a. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J. Cell Biol.* 100, 35–46. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.1.35>
- Tassin, A.M., Paintrand, M., Berger, E.G., Bornens, M., 1985b. The Golgi apparatus remains associated with microtubule organizing centers during myogenesis. *J Cell Biol* 101, 630–8.
- Thevenon, D., Smida-Rezgui, S., Chevessier, F., Groh, S., Henry-Berger, J., Beatriz Romero, N., Villaz, M., DeWaard, M., Marty, I., 2003. Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 669–75.
- Thomas, K., Navarro, J., Benson, R.J., Campbell, K.P., Rotundo, R.L., Fine, R.E., 1989. Newly synthesized calsequestrin, destined for the sarcoplasmic reticulum, is contained in early/intermediate Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 264, 3140–3145.
- Tomás, M., Martínez-Alonso, E., Ballesta, J., Martínez-Menárguez, J.A., 2010. Regulation of ER-Golgi intermediate compartment tubulation and mobility by COPI coats, motor proteins and microtubules. *Traffic* 11, 616–625. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01047.x>
- Tomasi, M., Canato, M., Paolini, C., Dainese, M., Reggiani, C., Volpe, P., Protasi, F., Nori, A., 2012. Calsequestrin (CASQ1) rescues function and structure of calcium release units in skeletal muscles of CASQ1-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 302, C575-86. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00119.2011>
- Toussaint, A., Cowling, B.S., Hnia, K., Mohr, M., Oldfors, A., Schwab, Y., Yis, U., Maisonobe, T., Stojkovic, T., Wallgren-Pettersson, C., Laugel, V., Echaniz-Laguna, A., Mandel, J.L., Nishino, I., Laporte, J., 2011. Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol* 121, 253–66. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0754-2>
- Treves, S., Vukcevic, M., Maj, M., Thurnheer, R., Mosca, B., Zorzato, F., 2009. Minor sarcoplasmic reticulum membrane components that modulate excitation-contraction coupling in striated muscles. *J Physiol* 587, 3071–9. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171876>
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1995. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* 6, 1887–902.
- Tripathy, A., Xu, L., Mann, G., Meissner, G., 1995. Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* 69, 106–19. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)79880-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)79880-0)
- Tsujita, K., Itoh, T., Ijuin, T., Yamamoto, A., Shisheva, A., Laporte, J., Takenawa, T., 2004. Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J Biol Chem* 279, 13817–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312294200>
- Tuvia, S., Buhusi, M., Davis, L., Reedy, M., Bennett, V., 1999. Ankyrin-B is required for intracellular sorting of structurally diverse Ca²⁺ homeostasis proteins. *J Cell Biol* 147, 995–1008.

Tuvim, M.J., Adachi, R., Hoffenberg, S., Dickey, B.F., 2001. Traffic control: Rab GTPases and the regulation of interorganellar transport. *News Physiol Sci* 16, 56–61.

- U, V -

Ursu, D., Sebille, S., Dietze, B., Freise, D., Flockerzi, V., Melzer, W., 2001. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. *J. Physiol. (Lond.)* 533, 367–377. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0367a.x>

Vale, R.D., Fletterick, R.J., 1997. The design plan of kinesin motors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 745–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.745>

Valiron, O., Caudron, N., Job, D., 2001. Microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 2069–2084. <https://doi.org/10.1007/PL00000837>

Vassilopoulos, S., Oddoux, S., Groh, S., Cacheux, M., Faure, J., Brocard, J., Campbell, K.P., Marty, I., 2010. Caveolin 3 is associated with the calcium release complex and is modified via in vivo triadin modification. *Biochemistry* 49, 6130–5. <https://doi.org/10.1021/bi100796v>

Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Rezgui, S.S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., De Waard, M., Marty, I., 2005. Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280, 28601–28609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501484200>

Vaughan, P.S., Miura, P., Henderson, M., Byrne, B., Vaughan, K.T., 2002. A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *J Cell Biol* 158, 305–19. <https://doi.org/10.1083/jcb.200201029>

Vedrenne, C., Hauri, H.P., 2006. Morphogenesis of the endoplasmic reticulum: beyond active membrane expansion. *Traffic* 7, 639–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00419.x>

Vega, A.L., Yuan, C., Votaw, V.S., Santana, L.F., 2011. Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum structure in ventricular myocytes. *J Biomed Biotechnol* 2011, 382586. <https://doi.org/10.1155/2011/382586>

Velazquez-Bernardino, P., Garcia-Sierra, F., Hernandez-Hernandez, O., Bermudez de Leon, M., Gourdon, G., Gomes-Pereira, M., Cisneros, B., 2012. Myotonic dystrophy type 1-associated CTG repeats disturb the expression and subcellular distribution of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP2, and MAP6/STOP in PC12 cells. *Mol Biol Rep* 39, 415–24. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0753-y>

Verhey, K.J., Gaertig, J., 2007. The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152–60. <https://doi.org/10.4161/cc.6.17.4633>

Villa, A., Podini, P., Nori, A., Panzeri, M.C., Martini, A., Meldolesi, J., Volpe, P., 1993. The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection. II. Postnatal differentiation of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Res.* 209, 140–148.

Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., Rapoport, T.A., 2006. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* 124, 573–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.047>

Volle, J., Brocard, J., Saoud, M., Gory-Faure, S., Brunelin, J., Andrieux, A., Suaud-Chagny, M.F., 2013. Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr Bull* 39, 969–78. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs113>

Volpe, P., Villa, A., Podini, P., Martini, A., Nori, A., Panzeri, M.C., Meldolesi, J., 1992. The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection: distribution of endoplasmic reticulum markers in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6142–6146.



Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., Salmon, E.D., 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* 107, 1437–48.

Wang, J., Sanger, J.M., Sanger, J.W., 2005. Differential effects of Latrunculin-A on myofibrils in cultures of skeletal muscle cells: Insights into mechanisms of myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 62, 35–47. <https://doi.org/10.1002/cm.20083>

Wang, L., Zhang, L., Li, S., Zheng, Y., Yan, X., Chen, M., Wang, H., Putney, J.W., Luo, D., 2015. Retrograde regulation of STIM1-Orai1 interaction and store-operated Ca²⁺ entry by calsequestrin. *Sci Rep* 5, 11349. <https://doi.org/10.1038/srep11349>

Wang, S., Trumble, W.R., Liao, H., Wesson, C.R., Dunker, A.K., Kang, C.H., 1998. Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol* 5, 476–83.

Wang, X., Xie, W., Zhang, Y., Lin, P., Han, L., Han, P., Wang, Y., Chen, Z., Ji, G., Zheng, M., Weisleder, N., Xiao, R.P., Takeshima, H., Ma, J., Cheng, H., 2010. Cardioprotection of ischemia/reperfusion injury by cholesterol-dependent MG53-mediated membrane repair. *Circ Res* 107, 76–83. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.215822>

Wang, Y., Li, X., Duan, H., Fulton, T.R., Eu, J.P., Meissner, G., 2009. Altered stored calcium release in skeletal myotubes deficient of triadin and junctin. *Cell Calcium* 45, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.05.006>

Wang, Z., Khan, S., Sheetz, M.P., 1995. Single cytoplasmic dynein molecule movements: characterization and comparison with kinesin. *Biophys J* 69, 2011–23. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80071-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80071-8)

Ward, T.H., Polishchuk, R.S., Caplan, S., Hirschberg, K., Lippincott-Schwartz, J., 2001. Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* 155, 557–570. <https://doi.org/10.1083/jcb.200107045>

Waterman-Storer, C.M., Salmon, E.D., 1998. Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol.* 8, 798–806.

Watson, P., Forster, R., Palmer, K.J., Pepperkok, R., Stephens, D.J., 2005. Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. *Nat Cell Biol* 7, 48–55. <https://doi.org/10.1038/ncb1206>

Watson, P., Stephens, D.J., 2005. ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.03.003>

Wei, L., Varsanyi, M., Dulhunty, A.F., Beard, N.A., 2006. The conformation of calsequestrin determines its ability to regulate skeletal ryanodine receptors. *Biophys J* 91, 1288–301. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.082610>

Wei, R., Wang, X., Zhang, Y., Mukherjee, S., Zhang, L., Chen, Q., Huang, X., Jing, S., Liu, C., Li, S., Wang, G., Xu, Y., Zhu, S., Williams, A.J., Sun, F., Yin, C.-C., 2016. Structural insights into Ca(2+)-activated long-range allosteric channel gating of RyR1. *Cell Res.* 26, 977–994. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.99>

Wilson, M.H., Holzbaur, E.L., 2015. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive nuclear distribution in muscle cells. *Development* 142, 218–28. <https://doi.org/10.1242/dev.114769>

Wilson, M.H., Holzbaur, E.L.F., 2012. Opposing microtubule motors drive robust nuclear dynamics in developing muscle cells. *J. Cell. Sci.* 125, 4158–4169. <https://doi.org/10.1242/jcs.108688>

Wloga, D., Gaertig, J., 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell. Sci.* 123, 3447–3455. <https://doi.org/10.1242/jcs.063727>

Wloga, D., Joachimiak, E., Fabczak, H., 2017. Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics. *Int J Mol Sci* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18102207>

Wozniak, M.J., Bola, B., Brownhill, K., Yang, Y.C., Levakova, V., Allan, V.J., 2009. Role of kinesin-1 and cytoplasmic dynein in endoplasmic reticulum movement in VERO cells. *J Cell Sci* 122, 1979–89. <https://doi.org/10.1242/jcs.041962>

- Y, Z -

Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D.A., Evans, K.E., Chen, S.R.W., Meissner, G., 2005. Calmodulin regulation and identification of calmodulin binding region of type-3 ryanodine receptor calcium release channel. *Biochemistry* 44, 15074–15081. <https://doi.org/10.1021/bi051251t>

Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D.A., Evans, K.E., Meissner, G., 2003. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* 278, 23480–23486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301125200>

Yan, Z., Bai, X.C., Yan, C., Wu, J., Li, Z., Xie, T., Peng, W., Yin, C.C., Li, X., Scheres, S.H., Shi, Y., Yan, N., 2015. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature* 517, 50–5. <https://doi.org/10.1038/nature14063>

Yanagisawa, T., Hasegawa, S., Mohri, H., 1968. The bound nucleotides of the isolated microtubules of sea-urchin sperm flagella and their possible role in flagellar movement. *Exp. Cell Res.* 52, 86–100.

Yang, D., Pan, Z., Takeshima, H., Wu, C., Nagaraj, R.Y., Ma, J., Cheng, H., 2001. RyR3 amplifies RyR1-mediated Ca(2+)-induced Ca(2+) release in neonatal mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 276, 40210–40214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106944200>

Yorimitsu, T., Sato, K., Takeuchi, M., 2014. Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Front Plant Sci* 5, 411. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00411>

Yuan, Q., Fan, G.C., Dong, M., Altschafli, B., Diwan, A., Ren, X., Hahn, H.H., Zhao, W., Waggoner, J.R., Jones, L.R., Jones, W.K., Bers, D.M., Dorn, G.W., 2nd, Wang, H.S., Valdivia, H.H., Chu, G., Kranias, E.G., 2007. Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation* 115, 300–9. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.654699>

Zaal, K.J., Reid, E., Mousavi, K., Zhang, T., Mehta, A., Bugnard, E., Sartorelli, V., Ralston, E., 2011. Who needs microtubules? Myogenic reorganization of MTOC, Golgi complex and ER exit sites persists despite lack of normal microtubule tracks. *PLoS One* 6, e29057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029057>

Zalk, R., Clarke, O.B., des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J., Marks, A.R., 2015. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* 517, 44–9. <https://doi.org/10.1038/nature13950>

Zalk, R., Marks, A.R., 2017. Ca²⁺ Release Channels Join the “Resolution Revolution.” *Trends Biochem. Sci.* 42, 543–555. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.04.005>

Zhang, D., Bidone, T.C., Vavylonis, D., 2016. ER-PM Contacts Define Actomyosin Kinetics for Proper Contractile Ring Assembly. *Curr Biol* 26, 647–53. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.070>

Zhang, L., Franzini-Armstrong, C., Ramesh, V., Jones, L.R., 2001. Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 233–247. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1295>

Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., Jones, L.R., 1997. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 23389–23397.

Zhang, T., Zaal, K.J., Sheridan, J., Mehta, A., Gundersen, G.G., Ralston, E., 2009. Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. *J Cell Sci* 122, 1401–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.039255>

Zhang, X., Tee, Y.H., Heng, J.K., Zhu, Y., Hu, X., Margadant, F., Ballestrem, C., Bershadsky, A., Griffiths, G., Yu, H., 2010. Kinectin-mediated endoplasmic reticulum dynamics supports focal adhesion growth in the cellular lamella. *J. Cell. Sci.* 123, 3901–3912. <https://doi.org/10.1242/jcs.069153>

Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., Mitchison, T., 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578–83. <https://doi.org/10.1038/378578a0>

Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N.M., Lai, F.A., Meissner, G., MacLennan, D.H., 1990. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 2244–2256.

Zorzato, F., Scutari, E., Tegazzin, V., Clementi, E., Treves, S., 1993. Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release. *Mol. Pharmacol.* 44, 1192–1201.

RESUME

Le muscle squelettique est un tissu complexe constitué de nombreuses cellules musculaires. Lorsqu'un motoneurone en contact avec ces cellules, émet un potentiel d'action, celui-ci se propage le long de la membrane plasmique où il permet l'activation du complexe de relâchement du calcium (CRC), la sortie massive de calcium des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (RS) dans le cytosol, et ainsi la contraction musculaire. Ce mécanisme, appelé couplage excitation-contraction, requiert un site de contact spécifique entre la membrane plasmique et le RS, appelé triade. Cette dernière est composée d'une invagination de la membrane plasmique, le tubule-t, flanquée de deux citernes terminales du RS. Au sein des triades, le CRC est centré autour de deux canaux calciques, le récepteur des Dihydropyridines (DHPR) et le récepteur de la Ryanodine (RyR1), très précisément localisés face à face dans leurs membranes respectives : la membrane du tubule-t et la membrane du RS. Ainsi, quand la membrane est dépolarisée, le DHPR subit un changement de conformation permettant l'ouverture du canal RyR1 et la sortie du calcium. Le CRC contient également d'autres protéines précisément localisées à la triade comme la calséquestrine ou la triadine, ayant des rôles clés pour moduler la libération du calcium. L'initiation de la contraction dépend ainsi du contact précis entre la membrane du RS et la membrane du tubule-t et également de la localisation exclusive des protéines du CRC au sein de la triade. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents à l'organisation précise des protéines du CRC à la triade, restent inconnus.

Durant cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la triadine protéine du CRC qui servirait d'ancre aux autres protéines du CRC grâce à ses différentes interactions. Nous avons étudié les mécanismes de trafic et de rétention de la triadine au cours de la différenciation musculaire. Pour ce faire, la dynamique de la triadine a été explorée par des techniques de microscopie et en réintroduisant, grâce à des lentivirus, des chimères fluorescentes de triadine au sein de cellules musculaires différenciées.

Dans un premier temps l'étude de l'adressage et de la rétention des protéines du CRC à la triade a révélé que la triadine emprunte une voie vésiculaire pour sortir du réticulum et atteindre les triades. Cette voie de trafic vésiculaire utilise le cytosquelette de microtubules et notamment les moteurs moléculaires et pourrait être une voie spécifique au muscle squelettique. Dans un deuxième temps et dans des étapes plus tardives de la différenciation, la triadine diffuse dans les membranes du RS suivie de son accumulation aux triades. Les deux mécanismes, diffusion et trafic vésiculaire, pourraient cependant coexister dans une cellule musculaire. Dans tous les cas, une fois la triade atteinte, la triadine y est retenue grâce à son domaine transmembranaire. Durant ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de prendre part à un projet portant sur l'implication de la protéine MAP6 dans la fonction musculaire. Ce projet a permis de montrer que MAP6 est bien présente dans le muscle squelettique et que son absence donne lieu à une faiblesse musculaire due en partie à une diminution des relâchements calciques, ainsi qu'à une altération du réseau de microtubules et de l'organisation du RS.

ABSTRACT

Skeletal muscle is a complex tissue made up of many muscle cells. When a motor neuron in contact with muscle cells, emits an action potential, it propagates along the plasma membrane where it allows the activation of the calcium release complex (CRC), the massive calcium release of terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum (SR) in the cytosol, and thus muscle contraction. This mechanism, called excitation-contraction coupling, requires a specific site of contact between the plasma membrane and the RS, called the triad. More precisely, a triad is composed of an invagination of the plasma membrane, the T-tubule, flanked by two terminal cisternae of the SR. At the triads, the CRC is centered on two calcium channels, the Dihydropyridine Receptor (DHPR) and the Ryanodine Receptor (RyR1), very precisely located face to face in their respective membranes: the T-tubule membrane and the membrane of the SR. Thus, when the membrane is depolarized, the DHPR undergoes a conformational change allowing the opening of RyR1 channel and the release of the calcium. CRC also contains other triad-specific proteins such as calsequestrin or triadin, which have key roles in modulating calcium release. Initiation of contraction thus depends on the precise contact between the SR membranes and the T-tubule membranes and also the exclusive localization of the CRC proteins at the triads. Nevertheless, the mechanisms underlying the precise organization of CRC proteins to the triad remain unknown.

During this work, we focused on triadin, a CRC protein that would anchor other CRC proteins through the different interactions it has with RyR1, with calsequestrin and also with microtubules. We studied the mechanisms of trafficking and retention of triadin during muscle differentiation. To do this, the dynamics of triadin was explored by microscopy techniques and by reintroducing, using lentivirus, fluorescent triadin chimeras into differentiated muscle cells.

Firstly, the study of CRC proteins targeting and retention in the triad revealed that triadin takes a vesicular pathway to exit the reticulum and reach the triads. This vesicular trafficking pathway uses the microtubule cytoskeleton and in particular the molecular motors and could be a pathway specific to skeletal muscle. In a second step and in later stages of differentiation, triadin diffuses into SR membranes followed by its accumulation at the triads. Both mechanisms, diffusion and vesicular trafficking, could, however, coexist in a muscle cell. In all cases, once the triad is reached, triadin is retained thanks to its transmembrane domain. Moreover, I also had the opportunity to take part in a project on the involvement of the MAP6 protein in muscle function. This project has shown that MAP6 is present in skeletal muscle and that its absence leads to muscle weakness associated with a decrease in calcium releases, as well as an impairment of the microtubule network and the organization of SR.