



**HAL**  
open science

# Biosenseurs fluorescents appliqués à l'étude de la fonction du réticulum sarcoplasmique dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique

Colline Sanchez

► **To cite this version:**

Colline Sanchez. Biosenseurs fluorescents appliqués à l'étude de la fonction du réticulum sarcoplasmique dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1164 . tel-03356340

**HAL Id: tel-03356340**

**<https://theses.hal.science/tel-03356340v1>**

Submitted on 28 Sep 2021

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

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



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1164

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**  
**Ecole Doctorale 205**  
**(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)**

**Spécialité de doctorat** : Biologie  
**Discipline** : Physiologie

Soutenue publiquement le 27/09/2019, par :  
**Colline Sanchez**

---

**Biosenseurs fluorescents  
appliqués à l'étude de la fonction du  
réticulum sarcoplasmique dans le  
couplage excitation-contraction du  
muscle squelettique**

---

Devant le jury composé de :

Lacampagne, Alain  
Vincent, Pierre  
Berthier, Christine  
Gieseler, Kathrin  
Weiss, Norbert

Directeur de Recherche CNRS  
Directeur de Recherche CNRS  
Maître de Conférences  
Professeure des Universités  
*Assistant Professor*

**Président.e**

Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examinatrice  
Examinateur

Jacquemond, Vincent

Directeur de Recherche CNRS

Directeur de Thèse

## Résumé

### **Biosenseurs fluorescents appliqués à l'étude de la fonction du réticulum sarcoplasmique dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique**

La cascade d'évènements permettant la contraction de la fibre musculaire striée squelettique en réponse à l'activité électrique de sa membrane plasmique est regroupée sous le terme de couplage excitation-contraction (EC). Le couplage EC a lieu au niveau des triades, domaines nanoscopiques au niveau desquels les invaginations transversales de la membrane plasmique (tubules-T) sont en contact étroit avec deux citernes terminales adjacentes de réticulum sarcoplasmique (RS).

Plus précisément, lors de l'excitation d'une fibre musculaire, un potentiel d'action se propage dans toute la surface de la membrane plasmique et en profondeur de la cellule via les tubules-T. Cette dépolarisation y est détectée par les protéines membranaires sensibles au potentiel  $Ca_v1.1$  qui en retour, par couplage mécanique, déclenchent l'ouverture des canaux calciques du RS que sont les récepteurs de la ryanodine de type 1 (RYR1). Ceci est à l'origine de l'augmentation massive de  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui déclenche l'activation des myofilaments et donc la contraction.

La compréhension des mécanismes de contrôle et de régulation des canaux RYR1 reste encore aujourd'hui limitée. En particulier, la mesure de l'activité physiologique de ces canaux dans la fibre musculaire intacte est toujours réalisée de manière très indirecte. Par ailleurs, le rôle éventuel de variations de potentiel de la membrane du RS pendant l'activité musculaire n'a jamais été révélé. Une connaissance approfondie de ces phénomènes est pourtant essentielle à la compréhension de la fonction musculaire squelettique normale et pathologique.

Dans ce contexte, l'objectif général de mon projet de thèse a été de mettre au point et utiliser des biosenseurs fluorescents localisés spécifiquement à la membrane des citernes terminales du RS de fibres musculaires différenciées – par leur fusion à une séquence d'adressage appropriée. Grâce à la combinaison des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie de la fluorescence des biosenseurs sur fibres musculaires isolées, nous avons pu étudier l'activité du RS au cours de la fonction musculaire. Plus particulièrement, mon travail de thèse aborde deux problèmes biologiques principaux : le potentiel de membrane du RS et la signalisation calcique du RS au cours du couplage EC.

Le premier objectif a visé à caractériser les changements de potentiel de la membrane du RS pendant l'activation du couplage EC. Pour cela, nous avons utilisé des biosenseurs de FRET de la famille *Mermaid*. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de changement substantiel du potentiel transmembranaire du RS pendant l'activation du couplage EC. Ces données confirment – pour la

première fois en condition physiologique – que le flux de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les canaux RYR1 est équilibré par des contre-flux ioniques compensatoires qui permettent le maintien du potentiel de membrane du RS. Ceci assure la pérennité du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  et contribue à l'efficacité du couplage EC.

Le deuxième objectif a visé à détecter les variations de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  à proximité immédiate des canaux RYR1. Pour cela, nous avons utilisé le biosenseur fluorescent sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  *GCaMP6f*. Le biosenseur adressé à la membrane du RS fournit un accès unique à l'activité individuelle de populations distinctes de canaux RYR1 au sein de différentes triades d'une même fibre musculaire. Au-delà de la caractérisation détaillée des propriétés des sondes *GCaMP6f* dans cette préparation, nos résultats montrent la stupéfiante synchronisation de l'activité de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  des triades d'une même fibre musculaire au cours du couplage EC. Les résultats ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes pour les études de situations pathologiques d'altération de l'activité des canaux RYR1.

MOTS-CLES : muscle squelettique ; couplage excitation-contraction ; réticulum sarcoplasmique ; récepteur de la ryanodine ; biosenseurs fluorescents ; potentiel de membrane ; calcium intracellulaire.

Institut NeuroMyoGène

CNRS UMR 5310 – INSERM U1217 – Université Claude Bernard Lyon 1

8 avenue Rockefeller

69008 Lyon

## Abstract

### **Investigating sarcoplasmic reticulum function during skeletal muscle excitation-contraction coupling using fluorescent biosensors**

Excitation-contraction (EC) coupling in skeletal muscle corresponds to the sequence of events through which muscle fiber contraction is triggered in response to plasma membrane electrical activity. EC coupling takes place at the triads; these are nanoscopic domains in which the transverse invaginations (t-tubules) of the surface membrane are in close apposition with two adjacent terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane.

More precisely, EC coupling starts with action potentials fired at the endplate, propagating throughout the surface membrane and in depth into the muscle fiber through the t-tubules network. When reaching the triadic region, action potentials activate the voltage-sensing protein  $Ca_v1.1$ . In turns,  $Ca_v1.1$  directly opens up the type 1 ryanodine receptor (RYR1) in the immediately adjacent SR membrane, through intermolecular conformational coupling. This triggers RYR1-mediated SR  $Ca^{2+}$  release which produces an increase in cytosolic  $Ca^{2+}$  triggering contraction.

Current understanding of the mechanisms involved in the control and regulation of RYR1 channels function is still limited. One reason is related to the fact that detection of RYR1 channel activity in intact muscle fibers is only achieved with indirect methods. Also, whether SR the membrane voltage experiences changes during muscle activity has so far never been experimentally assessed. Yet, deeper knowledge of these processes is essential for our understanding of muscle function in normal and disease conditions.

In this context, the general aim of my PhD project was to design and use fluorescent protein biosensors specifically localized at the SR membrane of differentiated muscle fibers, by fusing them to an appropriate targeting sequence. Thanks to a combination of single cell physiology and biophysics techniques based on electrophysiology and biosensor fluorescence detection, we were able to study the SR activity during muscle fiber function. Specifically, my PhD work focused on two major issues: SR membrane voltage and SR calcium signaling during EC coupling.

The first aim of my work was to characterize SR membrane voltage changes during muscle fiber activity. For this, we used voltage sensitive FRET-biosensors of the *Mermaid family*. Results show that the SR trans-membrane voltage experiences no substantial change during EC coupling. This provides the first experimental evidence, in physiological conditions, for the existence of ion counter-fluxes that balance the charge deficit associated with RYR1-mediated SR  $Ca^{2+}$  release. Indeed, this process is

essential for maintaining the SR Ca<sup>2+</sup> flux upon RYR1 channels opening and thus critically important for EC coupling efficiency.

The second objective of my work aimed at detecting the changes in Ca<sup>2+</sup> concentration occurring in the immediate vicinity of the RYR1 Ca<sup>2+</sup> release channels during muscle fiber activation. For this, we took advantage of one member of the recent generation of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> biosensor: *GCaMP6f*. The SR-targeted biosensor provides a unique access to the individual activity of RYR1 channels populations within distinct triads of a same muscle fiber. Beyond allowing a detailed characterization of the biosensor properties in this preparation, results highlight the remarkable uniformity of SR Ca<sup>2+</sup> release activation from one triad to another, during EC coupling. These results open up stimulating perspectives for the investigation of disease conditions associated with defective behavior of RYR1 channels.

KEYWORDS: skeletal muscle; excitation-contraction coupling; sarcoplasmic reticulum; ryanodine receptor; fluorescent biosensors; membrane voltage; intracellular calcium.

Institut NeuroMyoGène

CNRS UMR 5310 – INSERM U1217 – Université Claude Bernard Lyon 1

8 avenue Rockefeller

69008 Lyon

## Préambule

Mon travail de Thèse s'est déroulé sous la direction du Dr Vincent Jacquemond au sein de l'Institut NeuroMyoGène. Ce laboratoire est affilié au CNRS et à l'INSERM et est dirigé par Laurent Schaeffer. L'équipe que j'ai intégrée s'intéresse aux mécanismes de régulation de l'excitabilité et de la signalisation calcique dans le muscle normal et pathologique, et se compose, à la période de rédaction de ce présent document, de Vincent Jacquemond (Directeur de Recherche CNRS), Bruno Allard (Professeur des Universités), Christine Berthier (Maître de Conférences), Francisco Jaque (Doctorant), Romane Idoux (Doctorante) et Laloé Monteiro (Assistante ingénieure). Parallèlement à ma Thèse, j'ai effectué une activité complémentaire d'enseignement à l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Mes travaux de Thèse, présentés dans ce manuscrit, ont ou vont faire l'objet de publications et ont été présentés à l'occasion de congrès et de journées scientifiques.

### **Publications scientifiques**

**Sanchez, C.**, Berthier, C., Tourneur, Y., Allard, B., Csernoch, L. and Jacquemond, V. Triadic Ca<sup>2+</sup> transients during muscle excitation-contraction coupling. *(en préparation)*

Ghasemizadeh, A., Christin, E., Guiraud, A., Couturier, N., Rissaon, V., Girard, E., Jagla, C., Soler C., Laddada L., **Sanchez, C.**, Jaque, F., Garcia, A., Lanfranchi, M., Jacquemond, V., Gondien, J., Courchet, J., Schaeffer and Gache, V. Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities. *(soumis)*

**Sanchez, C.**, Berthier, C., Allard, B., Perrot, J., Bouvard, C., Tsutsui, H., Okamura, Y. and Jacquemond, V. (2018). Tracking the sarcoplasmic reticulum membrane in muscle with a FRET biosensor. *J Gen Physiol.* 150, 1163-1177.

Huntoon, V., Widrick, J.J., **Sanchez, C.**, Rosen, S.M., Kutchukian, C., Cao, S., Pierson, C.R., Liu, X., Perrella, M.A., Beggs, A.H., Jacquemond, V., and Agrawal, P. (2018). SPEG-deficient skeletal muscles exhibit abnormal triad and defective calcium handling. *Hum Mol Genet.* 27, 1608-1617.

## Publications de congrès

### **63<sup>rd</sup> Annual Meeting of Biophysical Society – Baltimore (USA)**

**Sanchez, C.,** Berthier, C., Tourneur, Y., Allard, B., Csernoch, L. and Jacquemond, V. (2019). Measurements of triadic calcium in differentiated muscle fibers using a GCaMP probe targeted to the junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *Biophysical Journal* 116 p522a.

### **45<sup>th</sup> European Muscle Conference – Montpellier (France)**

**Sanchez, C.,** Berthier, C., Allard, B., Perrot, J., Bouvard, C., Tsutsui, H., Okamura, Y. and Jacquemond, V. (2016). Targeting a voltage-sensitive fluorescence biosensor to the sarcoplasmic reticulum membrane of skeletal muscle fibers. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, S13.P8-211

## Communications de congrès

### **6<sup>th</sup> International Congress of Myology – Bordeaux (France)**

**Sanchez, C.,** Berthier, C., Tourneur, Y., Allard, B. and Jacquemond, V. (2019). Use of a GCaMP probe targeted to the junctional sarcoplasmic reticulum membrane to detect triadic Ca<sup>2+</sup>.

### **63<sup>rd</sup> Annual Meeting of Biophysical Society – Baltimore (USA)**

**Sanchez, C.,** Berthier, C., Tourneur, Y., Allard, B. and Jacquemond, V. (2019). Measurements of triadic calcium in differentiated muscle fibers using a GCaMP probe targeted to the junctional sarcoplasmic reticulum membrane.

### **Colloque des jeunes chercheurs 2017 (AFM-Téléthon) – Paris (France)**

**Sanchez, C.,** Berthier, C., Allard, B., Perrot, J., Bouvard, C., Tsutsui, H., Okamura, Y. and Jacquemond, V. (2016). Détection de la signalisation électrique et calcique de la membrane du réticulum sarcoplasmique à l'aide d'une sonde fluorescente dans la fibre musculaire intacte.

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

**Sanchez, C.,** Berthier, C., Allard, B., Perrot, J., Bouvard, C., Tsutsui, H., Okamura, Y. and Jacquemond, V. (2016). Voltage-sensitive fluorescent biosensors targeted to the sarcoplasmic reticulum membrane of skeletal muscle fibers.



**Club Neuromusculaire Auvergne/Rhône-Alpes 2017 – Lyon (France)**

**Sanchez C** (2017), Mesure de l'activité électrique du reticulum sarcoplasmique à l'aide des sondes fluorescentes de type Mermaid

**45<sup>th</sup> European Muscle Conference – Montpellier (France)**

**Sanchez, C.**, Berthier, C., Allard, B., Perrot, J., Bouvard, C., Tsutsui, H., Okamura, Y. and Jacquemond, V. (2016). Targeting a voltage-sensitive fluorescence biosensor to the sarcoplasmic reticulum membrane of skeletal muscle fibers.

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Vincent Jacquemond, mon directeur de thèse, pour son soutien, sa présence, sa patience ainsi que pour toutes les heures consacrées à ma formation et à la relecture de mon manuscrit. Je te suis extrêmement reconnaissante de m'avoir confié ce beau projet (fluorescent) et de m'avoir transmis l'art de l'électrophysiologie avec tant de générosité.

Je tiens également à remercier Christine Berthier qui m'a permis de faire mes premiers pas dans le monde de la physiologie musculaire dès mon stage de Master 1 et d'avoir poursuivi mon encadrement au cours de ma thèse : sa rigueur scientifique, sa confiance et ses conseils m'ont été d'un grand soutien durant mon doctorat.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des membres de mon jury pour leur disponibilité et d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit. Je suis très honorée que M. Alain Lacampagne et M. Pierre Vincent aient accepté la lourde tâche de rapporteurs, mais également que Mme Katrin Gieseler et M. Norbert Weiss fassent partie de ce jury.

Je remercie également Mme Jennifer Rieusset et M. Julien Fauré pour leur bienveillance et leurs remarques constructives lors de mes deux comités de suivi de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Bruno Allard pour ses enseignements de qualité en Master qui ont révélé mon goût pour l'électrophysiologie ainsi que pour ses précieux conseils scientifiques au cours de ma thèse.

Je remercie chaleureusement les doctorants (passés et présents) de l'équipe « Excitabilité et signalisation calcique dans le muscle normal et pathologique » pour ces belles années de thèse partagées : Clarisse Fuster pour son franc-parler, Romane Idoux pour sa douceur ainsi que Francisco Ignacio Jaque Fernandez pour ses conseils et son humour (chilien). Mais également Laloé Monteiro pour sa bonne humeur (très) communicative.

Je tiens spécialement à remercier Candice Kutchukian sans qui mes trois années de thèse n'auraient pas été les mêmes. Merci Candice pour ta générosité et ton amitié. J'espère te revoir très vite (ici ou ailleurs !).

J'adresse également mes remerciements à tout le personnel de l'Institut NeuroMyoGène ainsi que son directeur Laurent Schaeffer. J'adresse une pensée particulière à l'ensemble des doctorants pour tous ces moments de partage et de détente dans le cadre de l'association YRIN.

Bien sûr, je remercie tous les membres de ma famille (Sanchez, Bellepeau et Jarry), et en particulier je tiens à exprimer tout mon amour et toute ma gratitude envers mes parents, Jöelle, Alex, Mamie, tata Bélinda et tonton Bernard. Mais surtout, je ne remercierai jamais assez Mona, ma petite sœur, pour sa présence, son soutien et son amour inconditionnel.

Enfin, je remercie mes copains (les anciens comme les nouveaux) qui font de ma vie un vrai bonheur : Sarah, Camille, Alexia, Hichem, Benjamin, Edouard, Yon, Lucie, Maixent, Joséphine, Chloé, Nicolas, Barnabé et Clémentine.

Un grand merci à Charles pour nos jolis souvenirs et nos beaux projets à venir...

## Liste des abréviations

<b>Ach</b>	<u>A</u> cétyl <u>ch</u> oline
<b>AchR</b>	Récepteur de l'acétylcholine ( <u>A</u> cetyl <u>ch</u> oline <u>r</u> ceptor)
<b>ADP/ATP</b>	<u>A</u> dénosine <u>d</u> i/ <u>t</u> ri <u>p</u> hosphate
<b>AMPC</b>	<u>A</u> dénosine <u>m</u> onophosphate <u>c</u> yclique
<b>Biosenseur-FP</b>	<u>B</u> iosenseur composé d'une seule <u>p</u> rotéine <u>f</u> luorescente
<b>Biosenseur-FRET</b>	<u>B</u> iosenseur composé de deux protéines fluorescentes capables du mécanisme de <u>FRET</u>
<b>CaM</b>	<u>C</u> almoduline
<b>CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> - <u>c</u> almoduline-dependant protein <u>k</u> inase <u>I</u> I
<b>CFP</b>	<u>C</u> yan <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
<b>CICR</b>	<u>C</u> alcium- <u>i</u> nduced <u>c</u> alcium <u>r</u> elease
<b>Ci-VSP</b>	<u>C</u> iona <u>i</u> ntestinalis- <u>v</u> oltage <u>s</u> ensitive <u>p</u> hophatase
<b>Couplage EC</b>	<u>C</u> ouplage <u>e</u> xcitation- <u>c</u> ontraction
<b>cp</b>	Permuté circulairement ( <u>c</u> ircularly <u>p</u> ermuted)
<b>cpFP</b>	<u>P</u> rotéine <u>f</u> luorescentes <u>c</u> ircularment <u>p</u> ermutée
<b>Cryo-EM</b>	Microscopie cryo-électronique ( <u>C</u> ryo- <u>e</u> lectron <u>m</u> icroscopy)
<b>DHPR</b>	<u>D</u> i <u>h</u> dropyridine <u>r</u> ceptor
<b>ECE</b>	<u>E</u> vènement <u>c</u> alcique <u>é</u> lémentaire
<b>E<sub>FRET</sub></b>	<u>E</u> fficacité du <u>FRET</u>
<b>ER</b>	Réticulum endoplasmique ( <u>e</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum)
<b>F</b>	Fluorescence
<b>FDB</b>	<u>F</u> lexor <u>d</u> igitorum <u>b</u> revis
<b>FP</b>	<u>P</u> rotéine <u>f</u> luorescente
<b>FRET</b>	<u>F</u> örster <u>r</u> esonance <u>e</u> nergy <u>t</u> ransfer
<b>FWHM</b>	Largeur à mi-hauteur ( <u>f</u> ull <u>w</u> idth at <u>h</u> alf <u>m</u> aximum)
<b>FDHM</b>	Durée à mi hauteur ( <u>f</u> ull <u>d</u> uration at <u>h</u> alf <u>m</u> aximum)

<b>GECI</b>	Biosenseur fluorescent sensible au Ca <sup>2+</sup> ( <u>G</u> enetically <u>e</u> ncoded <u>c</u> alcium <u>i</u> ndicator)
<b>GEVI</b>	Biosenseur fluorescent sensible au potentiel ( <u>G</u> enetically <u>e</u> ncoded <u>v</u> oltage <u>i</u> ndicator)
<b>GCaMP</b>	<u>G</u> FP- <u>C</u> almoduline- <u>M</u> 13 <u>P</u> rotein
<b>GFP</b>	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
<b>HEPES</b>	4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>E</u> thyl)-1- <u>P</u> iperazine <u>E</u> thane <u>S</u> ulfonic acid
<b>IP3R</b>	<u>I</u> nositol 1,4,5( <u>3</u> )-triphosphate- <u>r</u> eceptor (ou IP3-gated Ca <sup>2+</sup> channel)
<b>JNM</b>	<u>J</u> onction <u>n</u> eurom <u>u</u> sculaire
<b>mKOκ</b>	<u>m</u> onomeric <u>K</u> usabira <u>O</u> range
<b>mUKG</b>	<u>m</u> onomeric <u>U</u> mi- <u>K</u> inoko <u>G</u> reen
<b>Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup></b>	Sonde protéique <u>M</u> ermaid mutée en positions <u>129</u> et <u>235</u>
<b>Mermaid2<sup>D129E</sup></b>	Sonde protéique <u>M</u> ermaid2 mutée en position <u>129</u>
<b>PA</b>	<u>P</u> otentiel d' <u>a</u> ction
<b>PKA</b>	<u>P</u> rotéine <u>k</u> inase <u>A</u> MPc-dépendante
<b>RE</b>	<u>R</u> éticulum <u>e</u> ndoplasmique
<b>RS</b>	<u>R</u> éticulum <u>s</u> arcoplasmique
<b>Rv-Mermaid</b>	<u>R</u> everse- <u>M</u> ermaid (couple de FRET en position N-terminale de la sonde protéique Mermaid)
<b>RYR</b>	Récepteur de la ryanodine ( <u>R</u> yanodine <u>r</u> eceptor)
<b>SERCA</b>	<u>S</u> arco( <u>e</u> ndo)plasmic <u>r</u> eticulum <u>C</u> a <sup>2+</sup> - <u>A</u> TPase
<b>SOCE</b>	<u>S</u> to <u>r</u> e <u>o</u> perated <u>C</u> a <sup>2+</sup> <u>e</u> ntry (ou voie d'influx Ca <sup>2+</sup> activée par la déplétion des stocks intracellulaires)
<b>TEA</b>	<u>T</u> étraéthylammonium
<b>TnC</b>	<u>T</u> roponine C
<b>TRIC</b>	<u>T</u> rimeric <u>i</u> ntracellular <u>c</u> ation
<b>TTX</b>	<u>T</u> éto <u>d</u> o <u>x</u> ine
<b>Tubule-T</b>	<u>T</u> ubule- <u>t</u> ransverse
<b>T306</b>	Les <u>306</u> premiers acides aminés de la <u>t</u> riadine
<b>VD</b>	<u>V</u> oltage- <u>d</u> épendant
<b>VSD</b>	Domaine sensible au potentiel ( <u>V</u> oltage <u>s</u> ensor <u>d</u> omain)

$V_{1/2}$

Potentiel de demi-activation

$\lambda$

Longueur d'onde

## Liste des figures

- Figure 1** Schéma de l'anatomie générale du muscle strié squelettique
- Figure 2** Structure contractile de la fibre musculaire squelettique
- Figure 3** Cycle moléculaire contractile
- Figure 4** Organisation membranaire et profil d'expression triadique dans la fibre musculaire squelettique
- Figure 5** La jonction neuromusculaire (JNM)
- Figure 6** Structure du récepteur aux dihydropyridines (DHPR)
- Figure 7** Comportement des segments S4 du détecteur de potentiel  $Ca_v1.1$
- Figure 8**  $Ca_v1.1$  : canal calcique de type L et détecteur de potentiel du couplage EC
- Figure 9** Structure du récepteur de la ryanodine de type 1 (RYR1)
- Figure 10** Etudes *in vitro* de l'activité unitaire de RYR1 et effet du  $Ca^{2+}$  cytosolique
- Figure 11** Position des mutations du gène *ryr1* associées à l'hyperthermie maligne (MH) et à la myopathie à cores centraux (CCD)
- Figure 12** Interaction  $Ca_v1.1$ -RYR1
- Figure 13** Isoformes de TRISK et portion de TRISK 95 nécessaire à la bonne morphologie des triades
- Figure 14** Les principaux acteurs du complexe de libération du  $Ca^{2+}$
- Figure 15** Représentation schématique des protéines triadiques du muscle strié squelettique
- Figure 16** Changements de conformation  $Ca^{2+}$ -dépendants de la calséquestrine
- Figure 17** Mécanismes de capture et d'extrusion du  $Ca^{2+}$  par la mitochondrie
- Figure 18** Combinaison des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie  $Ca^{2+}$  pour la caractérisation fonctionnelle du couplage excitation-contraction
- Figure 19** Transitoires  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants et flux de libération de  $Ca^{2+}$
- Figure 20** Flux de libération de  $Ca^{2+}$  et inactivation partielle de la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS
- Figure 21** Courant ionique macroscopique et courants unitaires
- Figure 22** Evènements calciques élémentaires spontanés dans la fibre musculaire d'amphibien
- Figure 23** Organisation des canaux RYR1 et RYR3 dans la fibre musculaire squelettique de grenouille et changement de phénotype des fibres musculaires squelettiques de souris exprimant l'isoforme RYR3 exogène

<b>Figure 24</b>	Hétérogénéité d'ouverture voltage-dépendante des canaux RYR1 dans la fibre musculaire squelettique de souris
<b>Figure 25</b>	Structure et fonction des canaux TRIC
<b>Figure 26</b>	Le réseau intracellulaire de contre-courants en cascade
<b>Figure 27</b>	Propriétés physiques des principales protéines fluorescentes (FPs)
<b>Figure 28</b>	La protéine fluorescente verte (GFP) et ses premiers variants mutés
<b>Figure 29</b>	Le principe de Förster resonance energy transfer (FRET) (1/2)
<b>Figure 30</b>	Le principe de Förster resonance energy transfer (FRET) (2/2)
<b>Figure 31</b>	Les biosenseurs basés sur une seule protéine fluorescente (FP)
<b>Figure 32</b>	Structure de la calmoduline (CaM) et de la troponine C (TnC), protéines de liaison au Ca <sup>2+</sup>
<b>Figure 33</b>	Les protéines Caméléons : biosenseurs-FRET Ca <sup>2+</sup> -dépendant basés sur la CaM
<b>Figure 34</b>	Les protéines Camgaroos et Péricams : biosenseurs-FP Ca <sup>2+</sup> -dépendants basés sur la CaM
<b>Figure 35</b>	Les protéines GCaMPs : biosenseurs-cpFP Ca <sup>2+</sup> -dépendants basés sur la CaM
<b>Figure 36</b>	Les biosenseurs-FRET Ca <sup>2+</sup> -dépendants basés sur la TnC
<b>Figure 37</b>	Le biosenseur Ca <sup>2+</sup> GCaMP6f adressé à la membrane du RS de cardiomyocytes
<b>Figure 38</b>	Les biosenseurs fluorescents voltage-dépendants (VD) basés sur les canaux ioniques VD
<b>Figure 39</b>	Les biosenseurs fluorescents voltage-dépendants basés sur la Ci-VSP
<b>Figure 40</b>	Propriétés du biosenseur-FRET voltage-dépendant Mermaid
<b>Figure 41</b>	Propriétés du biosenseur-FRET voltage-dépendant Mermaid2
<b>Figure 42</b>	Les biosenseurs fluorescents voltage-dépendants basés sur la rhodopsine microbienne
<b>Figure 43</b>	Protocole d'électroporation <i>in vivo</i>
<b>Figure 44</b>	Montage expérimental et dispositif d'enregistrement
<b>Figure 45</b>	Principe de la microscopie confocale à balayage laser
<b>Figure 46</b>	Les différentes configuration de fluorescence
<b>Tableau I</b>	Différentes applications pour les biosenseurs-FRET et les biosenseurs-FP
<b>Tableau II</b>	Caractéristiques <i>in vitro</i> des principaux biosenseurs fluorescents Ca <sup>2+</sup> -dépendants
<b>Tableau III</b>	Caractéristiques des principaux biosenseurs fluorescents voltage-dépendants

## Sommaire

HISTORIQUE.....	20
Chapitre 1. Anatomie fonctionnelle du muscle strié squelettique .....	21
1. Le système musculaire squelettique .....	21
1.1. Propriétés générales.....	21
1.1.1. Anatomie générale .....	21
1.1.2. Myogénèse et régénération musculaire .....	22
1.2. Typologie et notion d'unité motrice.....	22
2. Ultrastructure de la fibre musculaire striée squelettique.....	23
2.1. Sarcomère et machinerie contractile .....	23
2.1.1. Organisation générale .....	23
2.1.2. Protéines contractiles.....	24
2.1.2.1. Myofilaments épais de myosine.....	24
2.1.2.2. Myofilaments fins d'actine.....	25
2.2. Mécanismes moléculaires de la contraction .....	26
3. Un réseau membranaire spécifique .....	27
3.1. Le système tubulaire transverse .....	27
3.2. Le réticulum sarcoplasmique (RS) .....	28
3.3. La triade.....	29
Chapitre 2. Déterminants moléculaires et fonctionnels du couplage excitation-contraction et de l'homéostasie calcique .....	31
1. Le couplage excitation-contraction (EC).....	31
1.1. Jonction neuromusculaire et génèse d'un potentiel d'action.....	32
1.2. Déterminants moléculaires .....	32
1.2.1. Le récepteur aux dihydropyridines (DHPR) .....	33
1.2.1.1. Structure moléculaire.....	33
1.2.1.2. Caractéristiques fonctionnelles.....	35
1.2.1.3. Pharmacologie.....	37
1.2.1.4. Pathologies associées .....	38
1.2.2. Canal calcique réticulaire, le récepteur de la ryanodine de type 1 (RYR1) .....	39
1.2.2.1. Structure moléculaire.....	39
1.2.2.2. Caractéristiques biophysiques .....	40
1.2.2.3. Libération de Ca <sup>2+</sup> et régulations .....	42
1.2.2.4. Pathologies associées .....	47



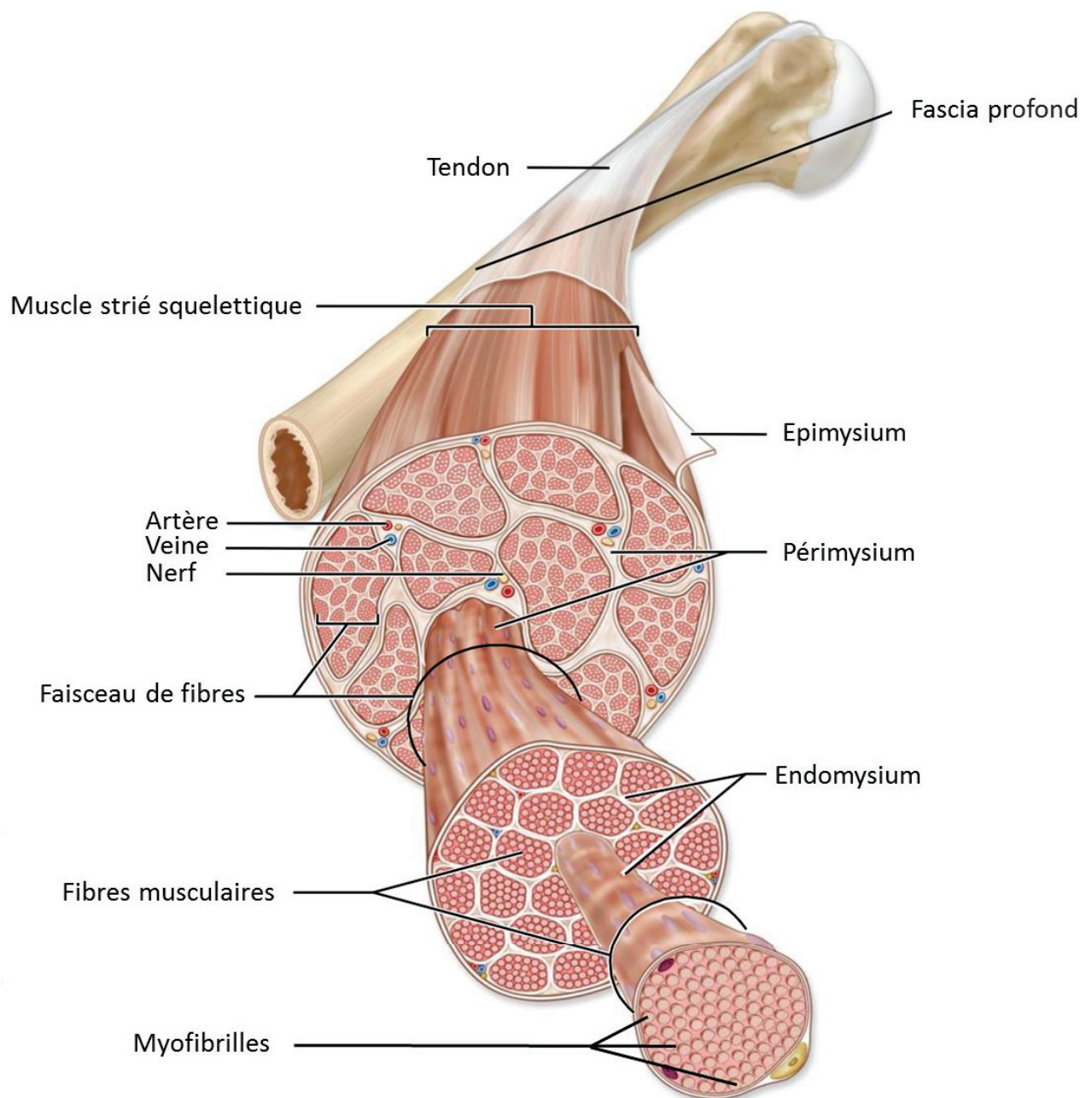
1.3.	Ca <sub>v</sub> 1.1-RYR1 : interaction moléculaire et fonctionnelle .....	48
1.4.	Protéines associées .....	49
2.	Autres régulateurs de l'homéostasie calcique .....	54
2.1.	Régulateurs réticulaires.....	54
2.1.1.	La pompe Ca <sup>2+</sup> -ATPase (SERCA).....	54
2.1.2.	Les systèmes tampon du RS .....	56
2.2.	Régulateurs sarcolemmaux .....	57
2.2.1.	Canaux calciques .....	57
2.2.2.	Systèmes d'extrusion.....	59
2.3.	Tampons calciques cytoplasmiques .....	60
2.4.	Autres .....	62
2.4.1.	La mitochondrie.....	62
2.4.2.	Le récepteur à l'IP3 (IP3R) .....	62
Chapitre 3. Propriétés électrochimiques de la membrane du RS .....		64
1.	Flux de libération calcique.....	64
1.1.	Caractérisation fonctionnelle du couplage EC .....	64
1.1.1.	Transitoires calciques voltage-dépendants.....	64
1.1.2.	Flux de libération calcique.....	65
1.1.3.	Inactivation voltage-dépendante du couplage EC et mouvements de charge .....	68
1.2.	Evènements calciques élémentaires (ECE).....	70
1.2.1.	Caractérisation et propriétés.....	70
1.2.2.	Structures impliquées.....	72
1.2.3.	Hétérogénéité d'ouverture voltage-dépendante.....	73
2.	La question du potentiel de membrane du RS.....	74
2.1.	Libération de Ca <sup>2+</sup> et contre-courants ioniques associés .....	75
2.2.	Identification et caractérisation des canaux impliqués.....	77
2.2.1.	Les canaux potassiques .....	77
2.2.1.1.	Les canaux RYR .....	77
2.2.1.2.	Les canaux TRIC .....	77
2.2.1.3.	Autres .....	79
2.2.2.	Les canaux chlores.....	79
2.2.3.	Les canaux protons.....	80
2.3.	« Le réseau intracellulaire de contre-courants en cascade ».....	80

Chapitre 4. Biosenseurs fluorescents, principes et applications.....	81
1. Propriétés générales.....	82
1.1. Principes généraux de la fluorescence .....	82
1.2. Les biosenseurs de type FRET.....	84
1.2.1. Le Förster Resonance Energy Transfer (FRET).....	84
1.2.2. Stratégies de conception et optimisation .....	85
1.3. Les biosenseurs composés d'une seule FP .....	86
1.4. Autres types de biosenseurs .....	87
1.5. Types de cibles et applications.....	87
2. Les biosenseurs fluorescents sensibles au Ca <sup>2+</sup> (ou GECIs) .....	88
2.1. Caractéristiques des GECIs et stratégies d'optimisation.....	89
2.1.1. Capacité à complexer le Ca <sup>2+</sup> .....	89
2.1.2. Affinité et cinétiques de réponse .....	89
2.1.3. Rendement .....	90
2.1.4. Sélectivité .....	91
2.1.5. Niveau d'expression .....	91
2.2. Les différents types de GECIs .....	92
2.2.1. GECIs basés sur la calmoduline (CaM).....	92
2.2.1.1. Les biosenseurs-FRET .....	92
2.2.1.2. Les biosenseurs-FP .....	93
2.2.2. GECIs basés sur la troponine C (TnC).....	96
2.2.3. Autre type de GECI .....	96
2.3. Applications .....	97
2.3.1. Adressage subcellulaire .....	97
2.3.2. Expression tissu-spécifique.....	98
3. Les biosenseurs fluorescents sensibles au potentiel (ou GEVIs).....	98
3.1. Caractéristiques des GEVIs et stratégies d'optimisation.....	98
3.1.1. Capacité à détecter des changements de potentiel.....	99
3.1.2. Localisation à la membrane plasmique .....	99
3.1.3. Rendement .....	100
3.1.4. Rapport signal/bruit .....	100
3.1.5. Cinétiques de réponse.....	101
3.1.6. Sensibilité (ou dépendance) au potentiel .....	101
3.2. Les différents types de GEVIs .....	101

3.2.1.	Les GEVIs basés sur les canaux ioniques voltage-dépendants .....	101
3.2.2.	Les GEVIs basés sur la <i>Ci-VSP</i> .....	102
3.2.3.	Les GEVIs basés sur la rhodopsine microbienne .....	105
3.3.	Applications .....	106
SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE .....		107
MATERIEL ET METHODES .....		110
1.	Constructions plasmidiques .....	111
1.1.	La sonde Mermaid et ses variants.....	111
1.1.1.	Mermaid .....	111
1.1.2.	Reverse-Mermaid .....	111
1.1.3.	Reverse-Mermaid <sup>D129E/Y235R</sup> .....	111
1.1.4.	T306-Reverse-Mermaid <sup>D129E/Y235R</sup> .....	112
1.1.5.	T306-Reverse-Mermaid .....	112
1.1.6.	ER-Mermaid2 <sup>D129E</sup> .....	112
1.2.	La sonde GCaMP et ses variants.....	112
1.2.1.	GCaMP6f.....	112
1.2.2.	T306-GCaMP6f.....	113
1.3.	Amplification et purification.....	113
2.	Transfert de gènes <i>in vivo</i> .....	113
2.1.	Modèles animaux et muscles utilisés .....	113
2.2.	Electroporation plasmidique .....	114
3.	Electrophysiologie .....	114
3.1.	Digestion enzymatique .....	114
3.2.	Principe de la technique de silicone-clamp.....	114
3.3.	Montage expérimental et dispositif d'enregistrement.....	115
4.	Microscopie confocale à balayage laser.....	116
4.1.	Principe.....	116
4.2.	Dispositifs d'enregistrement et réglages.....	117
4.2.1.	Biosenseurs Mermaid .....	117
4.2.2.	Biosenseurs GCaMP6f .....	118
4.2.3.	Autres sondes fluorescentes .....	118
5.	Analyses des images de fluorescence .....	119
5.1.	Biosenseurs Mermaid .....	119

5.2. Biosenseurs GCaMP6f .....	119
6. Solutions .....	120
6.1. Conditions de potentiel-imposé .....	120
6.2. Perméabilisation et calibration .....	120
7. Analyses statistiques .....	121
8. Culture cellulaire et immunomarquage .....	122
9. Modélisation des variations de $Ca^{2+}$ le long du sarcomère .....	122
RESULTATS.....	124
Section 1.....	125
Section 2.....	129
Section 3.....	133
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	147

# HISTORIQUE



**Figure 1. Schéma de l'anatomie générale du muscle strié squelettique**

D'après Exercise Physiology : Theory and Application to Fitness and Performance, 10<sup>th</sup> ed. by Scott K. Powers and Edward T. Howley, McGraw-Hill Education

# CHAPITRE 1 : ANATOMIE FONCTIONNELLE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

L'organisme des mammifères comporte trois types de tissu musculaire : cardiaque, lisse et squelettique.

Le système musculaire lisse est essentiellement représenté par les muscles des viscères (autres que le cœur) dont la contraction involontaire est placée sous la commande du système nerveux autonome.

Le muscle cardiaque ou myocarde tapisse la paroi du cœur. C'est un muscle strié dont la commande involontaire est sous contrôle d'un système intrinsèque régulé par le système nerveux autonome.

Enfin, le système squelettique est composé de l'ensemble des muscles striés qui recouvrent le squelette osseux et s'y attachent. Le corps humain en compte plus de 500, représentant 30 à 38% de la masse corporelle (Janssen et al. 2000), placés sous le contrôle de la commande volontaire du système nerveux central. Ces muscles remplissent 3 fonctions principales: le mouvement, la posture et la production de chaleur.

Ce premier chapitre se consacre à la description des propriétés anatomiques et fonctionnelles du muscle squelettique car c'est sur l'étude du fonctionnement des cellules musculaires de ce système que s'est basé mon travail de Thèse.

## 1. Le système musculaire squelettique

### 1.1. Propriétés générales

#### 1.1.1. Anatomie générale

Le muscle squelettique est principalement constitué de matériel contractile dont la structure hautement organisée confère aux cellules leur apparence striée caractéristique.

Outre son contenu riche en matériel contractile, le muscle squelettique est composé de différentes gaines de tissu conjonctif assurant cohésion cellulaire et force tissulaire. Chaque cellule (ou fibre) musculaire est séparée des autres et isolée électriquement grâce à la fine couche de tissu conjonctif qui l'enveloppe: l'endomysium. Les cellules recouvertes de leur endomysium sont regroupées en faisceaux et chaque faisceau est entouré d'une gaine conjonctive appelé péri-mysium. L'ensemble des faisceaux de fibres forme le muscle squelettique qui est lui-même enveloppé dans un revêtement de tissu conjonctif appelé épimysium (Figure 1). Toutes ces gaines conjonctives constituent un ensemble continu incluant les vaisseaux sanguins, les ramifications nerveuses mais également les tendons, lien entre les muscles et les os (pour revues, voir Gillies et Lieber 2011; Turrina et al. 2013). Ainsi lorsque les fibres se contractent, elles tirent sur leurs différentes enveloppes conjonctives lesquelles, à leur tour, transmettent la force à l'os. De plus, les vaisseaux sanguins permettent l'apport de nutriments essentiels au fonctionnement musculaire.

Les propriétés fonctionnelles du muscle squelettique sont donc dues à l'effet combiné des fibres musculaires, des motoneurones, des vaisseaux sanguins et de la matrice extracellulaire.

### 1.1.2. Myogénèse et régénération musculaire

Au cours du développement, la couche embryonnaire mésodermique se subdivise et donne naissance aux somites, qui constituent la source principale de cellules musculaires chez les vertébrés. Au commencement, les progéniteurs mésodermiques donnent naissance aux précurseurs myogéniques, les myoblastes, qui synthétisent déjà des protéines musculaires contractiles. Ensuite les myoblastes prolifèrent et se différencient en cellules musculaires mononucléées. Ces dernières, appelées myocytes, sont capables de fusionner les unes avec les autres pour former les myotubes immatures, longues cellules aux noyaux multiples périphériques. La dernière étape de maturation du myotube conduit à la formation de la fibre musculaire striée squelettique, cellule allongée d'un diamètre compris entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  et d'une longueur allant de quelques millimètres (muscle *stapedius* de l'oreille interne) à 20 cm (muscle *sartorius* de la cuisse) chez l'Homme. La fibre musculaire mature, recouverte de son endomysium, possède des milliers de noyaux périphériques (de l'ordre de  $10^4/\text{mm}^3$  de fibre); elle présente des systèmes membranaires spécifiques et exprime ses protéines contractiles selon un profil strié caractéristique (pour revue, voir Engel et Franzini-Armstrong 1994).

Toutes ces étapes de formation du muscle squelettique sont conditionnées et guidées par des facteurs de croissance et/ou l'expression différentielle de familles de gènes appelés facteurs de détermination myogénique (pour revue, voir Arnold et Braun 1999).

Chez l'adulte, le muscle squelettique est un tissu relativement stable dans des conditions normales. Par contre, il possède un potentiel réparateur remarquable en cas de blessure. Les cellules satellites, qui sont les cellules souches du muscle squelettique, jouent un rôle indispensable dans ce processus de régénération. Ce sont des myoblastes en quiescence qui se logent sous la membrane plasmique des fibres musculaires striées squelettiques. Leurs capacités d'autorenouveau, de prolifération, de différenciation et de fusion mènent à la formation et à la reconstitution d'un appareil contractile fonctionnel (pour revue, voir Dumont et al. 2015).

### 1.2. Typologie et notion d'unité motrice

La contraction du muscle strié squelettique est sous contrôle nerveux volontaire, c'est-à-dire que chaque fibre musculaire est dotée d'une ramification nerveuse qui régit son activité contractile. Un même motoneurone va venir innover plusieurs fibres musculaires, on parle d'unité motrice ; ainsi, l'excitation du motoneurone engendre la contraction de toutes les fibres de l'unité motrice. Pour former un muscle, de nombreuses unités motrices sont rassemblées (par dizaines voire par centaines), et chacune apporte sa propre contribution. Sur un plan global, la régulation de l'amplitude de la



contraction musculaire s'effectue par le nombre d'unités motrices recrutées. Ce recrutement sélectif des unités motrices permet au muscle d'adapter son activité en fonction de la demande (contraction plus ou moins rapide, plus ou moins prolongée).

Au sein d'une même unité motrice, les fibres musculaires sont de même type, c'est-à-dire qu'elles ont les mêmes propriétés structurales et fonctionnelles. La caractéristique unique du muscle squelettique est sa diversité dans le nombre mais également dans le type de fibres qui le composent. En effet, chez un même animal, aucun muscle squelettique n'est identique à un autre. Cette hétérogénéité reflète son haut degré de spécialisation fonctionnelle ainsi que les bases de sa plasticité (pour revues, voir Schiaffino et Reggiani 2011; Bottinelli et Reggiani 2000).

Que les classifications se basent sur la couleur du muscle (rouge ou blanche), la prédominance du métabolisme énergétique (oxydatif ou glycolytique) ou les propriétés ATPasiques du complexe actomyosine (*section 1.2.2. Mécanisme moléculaire de la contraction*); elles s'accordent toutes sur la distinction entre fibres rapides et fibres lentes. On identifie aujourd'hui quatre grands types de fibres dans le muscle strié (pour revue, voir Bacou et Vigneron 1988; Schiaffino et Reggiani 2011).

**Les fibres à contraction lente**, ou fibres de type 1, ou fibres rouges, puisent principalement leur énergie du métabolisme oxydatif (situation favorisée par leur abondante vascularisation). Elles sont riches en mitochondries et en enzymes du cycle de Krebs et peuvent se contracter pendant de longues périodes.

**Les fibres à contraction rapide**, ou fibres de type 2, ou fibres blanches, sont généralement de plus gros diamètre et pauvres en mitochondries ; il en existe trois types. Les fibres 2A ont un métabolisme glycolytique aérobie et interviennent dans les activités phasiques, elles sont dites « résistantes à la fatigue ». Les fibres 2B assurent leur apport énergétique à partir des voies de glycolyse anaérobie et sont rapidement fatigables ; elles sont recrutées pour les mouvements brefs et rapides. Les fibres 2X ont un métabolisme aérobie variable et une résistance à la fatigue intermédiaire à celles des fibres 2A et 2B.

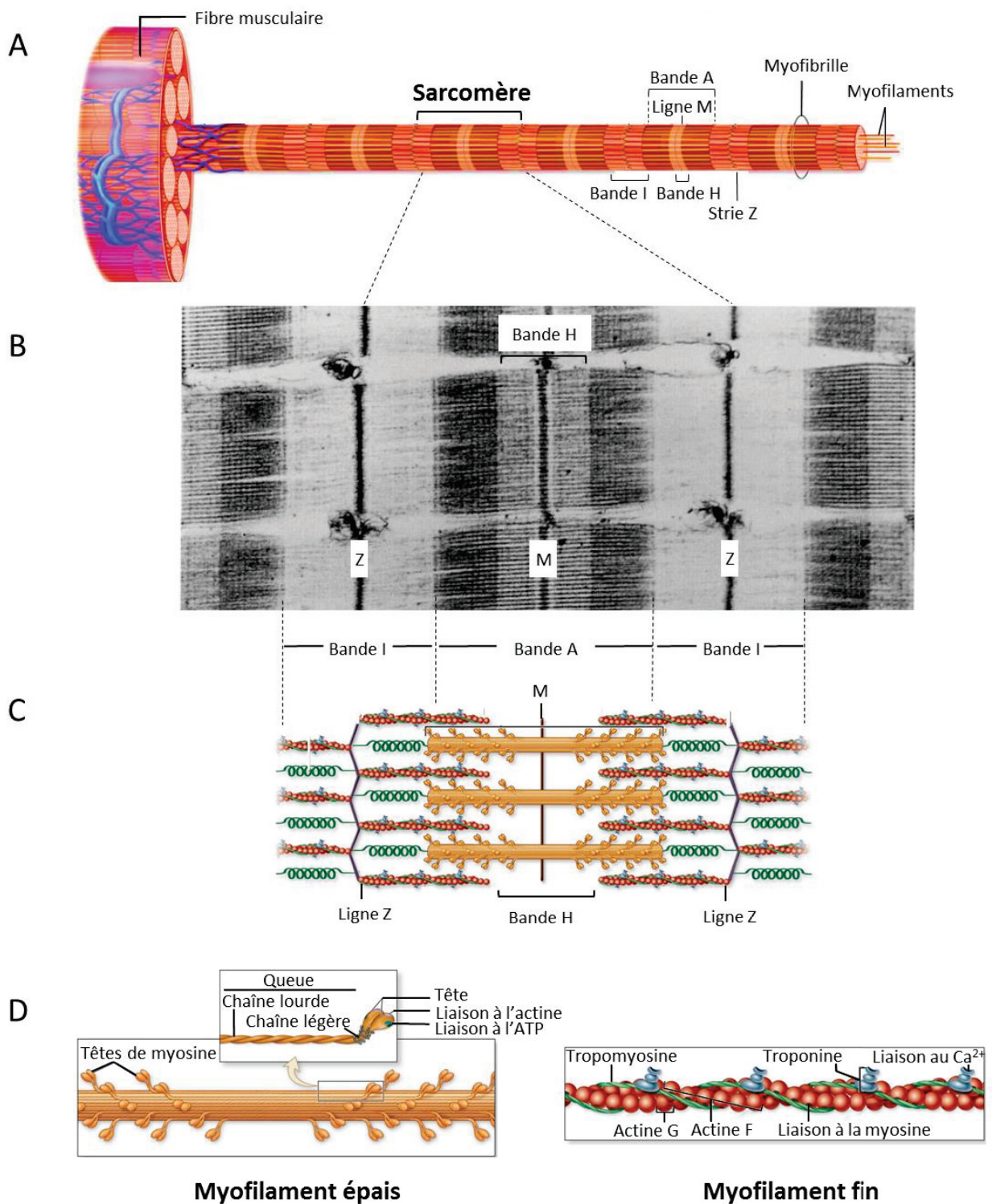
## 2. Ultrastructure de la fibre musculaire striée squelettique

Dans les muscles striés (squelettiques et cardiaque), le cytoplasme des cellules est chargé en protéines contractiles (ou myofilaments) regroupées en structures cylindriques appelées myofibrilles. Il existe deux types de myofilaments (fins et épais) qui se chevauchent et qui en glissant les uns contre les autres entraînent un raccourcissement des fibres musculaires et mènent ainsi à la contraction du muscle strié (Figure 2).

### 2.1. Sarcomère et machinerie contractile

#### 2.1.1. Organisation générale

Les myofibrilles occupent 80 % du volume cellulaire et affichent sur toute leur longueur une alternance de bandes claires et de bandes sombres presque parfaitement alignées, ce qui confère à la fibre



**Figure 2. Structure contractile de la fibre musculaire squelettique**

- Schéma du contenu myofibrillaire de la fibre musculaire striée squelettique. D'après Junqueira's Basic Histology, 12<sup>th</sup> ed. by Anthony L. Mescher, McGraw-Hill Education
- Organisation sarcomérique de la fibre musculaire de grenouille observée en microscopie électronique. D'après Engel et Franzini-Armstrong 1994
- Schéma illustrant l'organisation des filaments épais et des filaments fins au sein d'un sarcomère. D'après Junqueira's Basic Histology, 12<sup>th</sup> ed. by Anthony L. Mescher, McGraw-Hill Education
- Schéma illustrant la composition et l'organisation des protéines contractiles. D'après Junqueira's Basic Histology, 12<sup>th</sup> Edition by Anthony L. Mescher, McGraw-Hill Education

musculaire toute entière son apparence striée caractéristique. Ce pattern de striation myofibrillaire se répète avec une périodicité de 2  $\mu\text{m}$  environ. Cette unité de répétition, connue sous le nom de sarcomère, est considérée comme l'unité contractile fondamentale des muscles striés. La force pouvant être générée par le muscle squelettique apparaît dépendante de la taille de ses sarcomères qui est variable en fonction des espèces (1.98  $\mu\text{m}$  chez le colibri vs 2.64  $\mu\text{m}$  chez l'Homme) et des muscles considérés (chez l'Homme, 1.09  $\mu\text{m}$  dans le muscle *tibialis anterior* vs 2.84  $\mu\text{m}$  dans le muscle *flexor carpi ulnaris*) (Burkholder et Lieber 2001).

Le sarcomère est délimité par deux lignes Z, bordures étroites et sombres (0.1  $\mu\text{m}$  de long) dont le composant moléculaire principal est l' $\alpha$  actinine. Chaque ligne Z se situe au milieu d'une bande I (pour isotrope) plus claire (longueur : 1  $\mu\text{m}$ ) partagée par deux sarcomères adjacents. Au centre du sarcomère, on trouve une bande A (pour anisotrope) sombre (longueur : 1.6  $\mu\text{m}$ ) elle-même séparée en deux par une ligne H moins dense. Cette dernière est divisée en son milieu par une région de plus haute densité appelée ligne M (pour revue, voir Engel et Franzini-Armstrong 1994) (Figure 2 A-C).

C'est l'arrangement précis et organisé des myofilaments à l'intérieur de la myofibrille qui explique ce modèle en bandes répétées. La bande A contient un ensemble de myofilaments épais arrangés selon l'axe parallèle de la myofibrille. Chaque demie-bande I contient un ensemble de myofilaments fins qui s'étendent de leur point d'attache à la strie Z jusqu'à la bande A, où ils se chevauchent avec les myofilaments épais. La zone H est la partie moins dense de la zone A car elle ne contient que des myofilaments épais (pour revue, voir Squire 1997).

### 2.1.2. Protéines contractiles

Les myofilaments fins et épais sont des polymères de protéines associées de manière non covalente (pour revue, voir Clark et al. 2002).

#### 2.1.2.1. Myofilaments épais de myosine

- **Structure de la molécule de myosine**

Le myofilament épais (10 nm de diamètre, 1.6  $\mu\text{m}$  de long) est principalement composé d'un polymère d'environ 300 molécules de myosine II. Molécule allongée à deux têtes, la myosine II est composée de deux chaînes lourdes identiques et de deux paires de chaînes légères (pour revue, voir Craig et Woodhead 2006) (Figure 2 D).

La portion C-terminale de chaque chaîne lourde se replie en hélice  $\alpha$  et forme une queue super enroulée. Les extrémités N-terminales se replient pour former deux têtes globulaires qui constituent le domaine moteur des myofilaments épais : lieu de l'hydrolyse de l'ATP et de la fixation aux filaments fins d'actine. Le cou, zone de jonction entre les têtes et la queue de myosine, contient une chaîne légère régulatrice et une chaîne légère essentielle. Les molécules de myosine sont disposées en deux

groupes (« tête-bêche ») et la partie centrale du myofilament est dépourvue de tête globulaire (ligne M du sarcomère).

- **Les autres protéines des myofilaments épais**

Outre la myosine, les myofilaments épais des muscles striés des vertébrés contiennent d'autres protéines aux rôles structuraux et régulateurs (pour revue, voir Craig et Woodhead 2006).

**Les protéines C** se lient, à intervalle régulier, à onze sites sur chaque moitié de filament épais (de la ligne M à la strie Z).

**La titine** est une protéine géante (~3MDa) qui s'étend du centre des myofilaments épais (ligne M) à la ligne Z. Chaque moitié de filament épais est associée à six molécules de titine. Elles servent de base à l'assemblage du sarcomère au cours du développement et elles établissent un lien entre myofilaments épais et stries Z. De plus, leur comportement de ressort moléculaire est essentiel à l'activité mécanique du muscle.

#### 2.1.2.2. Myofilaments fins d'actine

- **La polymérisation de l'actine**

Le composé majoritaire des myofilaments fins est une protéine globulaire, l' $\alpha$  actine (ou actine G pour globulaire). Dans le muscle des vertébrés, elle est présente sous forme de polymère, l'actine F (pour fibrillaire) qui contient approximativement 360 molécules d'actine G. Le myofilament fin (5 nm de diamètre, 1  $\mu$ m de long) est constitué de deux brins d'actine F qui s'entrecroisent pour former une double hélice (Figure 2 D).

- **Protéines régulatrices**

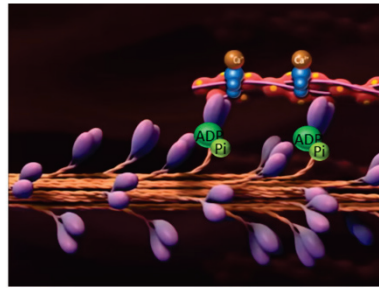
La contraction des muscles striés des vertébrés est régulée par deux protéines des myofilaments fins : la troponine et la tropomyosine qui permettent ou empêchent l'interaction actine-myosine.

**La tropomyosine** est composée de deux chaînes enroulées en hélices  $\alpha$  qui s'attachent au squelette formé par l'actine F.

**La troponine** se fixe à un site spécifique de la tropomyosine ; ce complexe de trois sous-unités (I, C et T) est donc présent à intervalle régulier sur toute la longueur des filaments fins. Chaque sous-unité a une fonction physiologique bien distincte. Liée à l'actine, la sous unité I (pour inhibitrice) empêche l'interaction entre l'actine et la myosine. La troponine C (pour calcium) est la sous-unité de fixation au  $Ca^{2+}$  (pour plus de détails, section II.2.3. *Protéines cytoplasmiques et tampons calciques*). Enfin, la sous-unité T (pour tropomyosine) est celle qui interagit avec la tropomyosine.

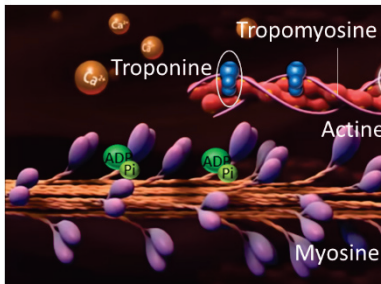
Si le complexe actine-troponine-tropomyosine constitue le squelette principal du filament fin, **la nébuline** est également une protéine de ce myofilament. C'est une protéine géante qui s'étend d'une

②



Fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  à la troponine C et interaction actine-myosine.

③

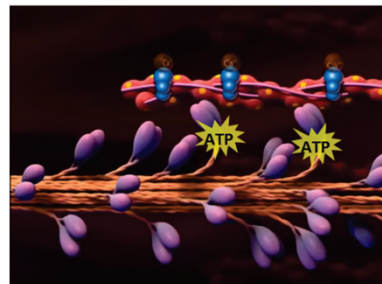


Fixation des têtes de myosine à l'ADP + Pi qui forment un angle de  $45^\circ$  avec les filaments d'actine.



Glissement des myofilaments fins d'actine le long des myofilaments épais de myosine. Les têtes de myosine forment un angle de  $90^\circ$  avec les filaments fins.

①



Fixation des têtes de myosine à l'ATP et détachement des têtes de myosine.

④

### Figure 3 : Cycle moléculaire contractile

- ① Les têtes de myosine hydrolysent l'ATP en ADP + Pi, changent de conformation et adoptent une position de haute énergie.
- ② L'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique permet la fixation d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  à la troponine C, ce qui entraîne le changement de conformation du complexe de la troponine. Les sites de liaison de l'actine pour la myosine deviennent accessibles.
- ③ L'interaction actine-myosine libère l'ADP + Pi permettant un fouetté du cou de la tête de myosine vers le centre du sarcomère et donc le glissement des filaments fins.
- ④ La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP entraîne le détachement de la myosine à l'actine. Les têtes de myosine adoptent une position de basse énergie.

Modifié d'après la vidéo <https://www.youtube.com/watch?v=HPcoot65QG4>

extrémité à l'autre du myofilament fin et qui interagit à la fois avec l'actine F et avec la tropomyosine. Chaque filament fin possède deux molécules de nébuline. Il semblerait qu'elle participe au bon assemblage des protéines des myofilaments fins en constituant un support moléculaire inextensible (pour revue, voir Engel et Franzini-Armstrong 1994).

## 2.2. Mécanismes moléculaires de la contraction

Les protéines myofibrillaires sont responsables de la transduction d'énergie chimique en travail mécanique.

- **Interaction actine-myosine-ATP : moteur de la contraction**

La contraction est le résultat du glissement des myofilaments fins le long des myofilaments épais sans modification de la longueur de l'un ou de l'autre (pour revue, voir Geeves et Holmes 1999).

Au niveau de la zone de chevauchement, la myosine envoie des projections (ou ponts) sur l'actine fournissant le lien mécanique entre les myofilaments et la force nécessaire à leur enchevêtrement. Les ponts de myosine se forment de manière cyclique : attachement à l'actine, changement de conformation, détachement puis attachement plus loin le long du filament d'actine. La rotation des têtes de myosine encore fixées à l'actine fournit la force de propulsion entre myofilaments et permet le glissement des uns par rapport aux autres. Finalement, c'est la répétition de ce cycle qui est à l'origine du mouvement.

Chaque cycle puise son énergie de l'hydrolyse de l'ATP et peut être décomposé en quatre étapes (pour revue, voir Spudich 2001) (Figure 3). Au repos, la tête de myosine est couplée à l'ADP et au phosphate inorganique (Pi) et forme un angle de 45° par rapport à l'axe des myofilaments (1). En présence de Ca<sup>2+</sup>, le site de fixation de l'actine pour la myosine devient accessible, le pont se forme (2). Le changement de conformation des ponts de myosine est induit par le décrochage de l'ADP et du Pi des têtes de myosine qui forment désormais un angle de 90° avec la queue (3). La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP sur les têtes de myosine entraîne leur décrochage de l'actine (4) ; finalement réactivées par l'ATP, les têtes de myosine peuvent de nouveau l'hydrolyser en ADP + Pi ce qui entraîne un changement de conformation de la myosine : l'angle formé par la tête et la queue revient à sa valeur initiale de 45° (1).

- **Régulation de l'interaction actine-myosine**

La contraction des muscles striés des vertébrés est régulée par la troponine et la tropomyosine qui répondent aux changements de concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire induits par la stimulation nerveuse.

A de faibles niveaux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (<10<sup>-8</sup> M), l'interaction actine-myosine est inhibée par le complexe troponine-tropomyosine ; l'activité ATPase est donc faible et le muscle est relâché.

Quand le muscle est stimulé, le cytoplasme des fibres musculaires voit son contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  augmenter ( $10^{-5}$  M). La troponine C fixe alors le  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui entraîne une levée de l'inhibition de l'interaction actine-myosine par le complexe troponine-tropomyosine. Le cycle des « ponts de myosine » s'enclenche (avec pour conséquence l'augmentation de l'activité ATPase) et le muscle se contracte.

### 3. Un réseau membranaire spécifique

La stimulation nerveuse d'une fibre musculaire squelettique est à l'origine de la conduction d'un signal électrique membranaire qui induit l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire nécessaire à la contraction. C'est grâce à l'existence d'un système membranaire spécifique que ces événements sont rendus possibles.

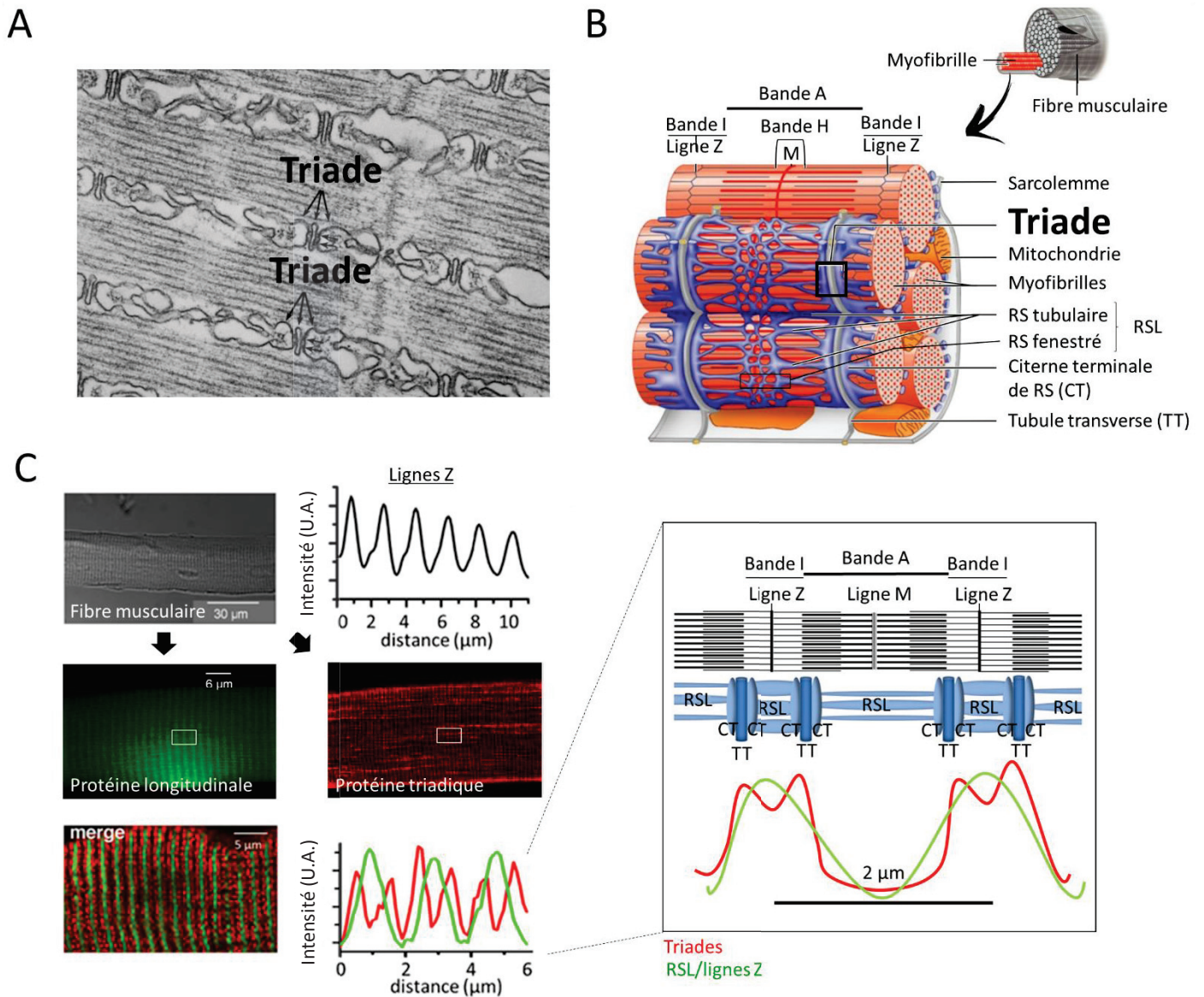
#### 3.1. Le système tubulaire transverse

La membrane plasmique de la fibre musculaire striée squelettique (ou sarcolemme) sépare les milieux extracellulaire et intracellulaire. Sa particularité est qu'elle s'invagine régulièrement à l'intérieur de la cellule musculaire pour former les tubules-transverses (-T) (~15-20 nm de diamètre ; Franzini-Armstrong et al. 1975) en contact étroit avec les myofibrilles (Figure 4).

Dans les phases précoces du développement musculaire, les tubules-T sont absents. Chez la souris, ce n'est qu'à partir de E15 que les prémices de tubule-T apparaissent dans les myotubes sous forme de petites invaginations de la membrane de surface. A E16, ces invaginations (ou tubules) sont plus fréquentes et plus longues c'est-à-dire qu'elles pénètrent plus profondément dans la cellule en développement. La plupart des tubules présente une orientation longitudinale et est connectée à la surface par de courts segments transversaux. A ce stade, seules de courtes portions du système tubulaire forment des liaisons avec le RS. Au moment de la transition myotube-myofibre (~E16-E17), les striations sont bien visibles en microscopie électronique ; cependant, la majorité des tubules conserve une orientation longitudinale. C'est finalement dans les trois premières semaines post-natales (E19 +3 semaines) qu'apparaît le système tubulaire-T mature (Takekura et al. 2001) avec :

- son orientation transversale caractéristique,
- sa localisation restreinte et systématique à la jonction bande A/bande I des sarcomères,
- ses connexions avec le RS.

De manière intéressante, le développement des cellules musculaires en culture n'atteint jamais complètement cette structure tubulaire-T caractéristique du muscle adulte, suggérant que l'innervation et/ou le profil d'activité jouent un rôle essentiel dans les processus de maturation musculaire.



**Figure 4. Organisation membranaire et profil d'expression triadiques dans la fibre musculaire squelettique**

- A.** Cliché de microscopie électronique d'une fibre musculaire de poisson en coupe longitudinale. Les trois flèches désignent une triade avec le tubule transverse (TT) au centre encadré par deux citernes terminales (CT) de réticulum sarcoplasmique (RS). Les deux flèches horizontales montrent les « pieds jonctionnels ». D'après Franzini-armstrong et Peachey (1981)
- B.** Schéma de l'organisation générale du RS, des TT et des myofibrilles dans la fibre musculaire de mammifère. D'après Marieb, Pearson Education (2007)
- C.** Clichés de microscopie confocale d'une fibre musculaire squelettique de souris exprimant :
- **une protéine longitudinale** (images et tracés verts), c'est-à-dire insérée soit dans la ligne Z, soit dans le RS longitudinal (RSL). Au vu de son profil d'expression (tracés verts) en forme de simples pics répétés espacés de 2  $\mu\text{m}$ , cette protéine est concentrée aux alentours des lignes Z des sarcomères (tracé noir à gauche et schéma à droite).
  - **une protéine triadique** (images et tracés rouges), c'est-à-dire insérée dans la membrane des TT et/ou dans la membrane des CT de RS. Elle affiche un profil d'expression caractéristique en forme de doubles bandes transversales répétées tous les 2  $\mu\text{m}$  (tracés rouges). Les pics de fluorescence correspondent aux jonctions bande A-bande I des sarcomères (schéma à gauche). Modifié d'après Berbey et al. (2009) ; Sorrentino (2011)



Chez l'amphibien, ces structures sont moins nombreuses et plus éloignées des zones de recouvrement entre les protéines contractiles. En effet, on compte un tubule-T par sarcomère positionné au niveau de chaque ligne Z (pour revue, voir Smith 1966). Il a été postulé que cette différence morphologique soit à l'origine d'une différence fonctionnelle essentielle entre les amphibiens et les mammifères (pour revue, voir Ríos 2018) qui sera traitée plus tard dans la *section III.1.2. Evènements calciques élémentaires*.

L'efficacité de la progression du signal électrique de la surface vers la profondeur de la fibre musculaire est garantie par ce réseau membranaire tubulaire-T hautement développé (~4-5 fois plus dense que le sarcolemme ; Roseblatt et al. 1981) et spécialisé qui possède des propriétés électriques qui lui sont propres (Wallinga et al. 1999). Par exemple, la propagation du PA à son niveau (3-6 cm.s<sup>-1</sup>) est environ 30 fois plus lente qu'au niveau de la membrane de surface (100-200 cm.s<sup>-1</sup>) (Adrian et Peachey 1973).

### 3.2. Le réticulum sarcoplasmique (RS)

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est un compartiment intracellulaire hautement spécialisé de la fibre musculaire striée qui joue un rôle clé dans la mécanique contractile puisqu'il stocke le Ca<sup>2+</sup> au repos et le libère lors de la contraction. Sa lumière contient 0.5 mM de Ca<sup>2+</sup> libre contre 100 nM dans le cytoplasme, soit une concentration 5000 fois plus élevée.

Ce compartiment s'étend sur toute la longueur de la fibre musculaire et occupe 10 % de son volume total. C'est un système membranaire interne en étroite interaction avec les tubules-T mais sans continuité physique ou électrique avec la membrane de surface (Nakajima et Bastian 1975; LeFurgey et al. 1992). De plus, il est étroitement associé aux myofibrilles et protéines contractiles qu'il enveloppe (Figure 4).

Le RS se forme progressivement au cours de la myogénèse, de manière simultanée et coordonnée à la maturation des tubules-T (Schiaffino et Margreth 1969; Franzini-Armstrong 1991). Dans la fibre musculaire mature, le RS est la combinaison continue de régions fenestrées, tubulaires et jonctionnelles qui présentent des morphologies, des structures et des fonctions différentes (pour revue, voir Sorrentino 2011).

Le RS fenestré représente plus de la moitié de la surface totale du RS (> 50 %) (Roseblatt et al. 1981). Il est perforé par de petites ouvertures arrondies permettant la communication des deux compartiments cytoplasmiques qui sont situés de part et d'autre. Les propriétés de cette portion du RS sont semblables à celles du réticulum endoplasmique des cellules non musculaires. C'est-à-dire qu'elle participe notamment aux modifications post-traductionnelles des protéines (glycosylation et repliement) (pour revue, voir Lippincott-Schwartz et al. 2000). Une fois matures, les protéines sont

exportées du RS vers le compartiment auquel elles sont destinées via des mécanismes moléculaires spécifiques (pour revues, voir Barlowe 2003; Moremen et al. 2012). En d'autres termes, le RS fenestré constitue une voie de passage obligée des protéines en cours de maturation (Wei et Hendershot 1996; Cusimano et al. 2009).

Le RS tubulaire constitue le tiers de la surface totale du RS (> 30 %) (Roseblatt et al. 1981) et forme des tubules individuels parallèles et longitudinaux qui connectent les deux régions fenestrées.

Les portions fenestrées et tubulaires du RS sont regroupées sous le terme de **RS longitudinal**. En microscopie de fluorescence, les protéines spécifiquement insérées dans cette portion du RS apparaissent « concentrées à la ligne Z » et affichent un profil d'expression composé de simples bandes espacées de 2  $\mu\text{m}$  (Figure 4 C) (pour revue, voir Sorrentino 2011).

Enfin, le **RS jonctionnel** (ou RS transversal ou **citerne terminale de RS**) constitue les extrémités latérales de ce compartiment qui font face aux tubules-T à la jonction bande A-bande I du sarcomère chez le mammifère. Il représente seulement 10 % de la surface totale du RS mais constitue la portion la plus dense en protéines. Le RS jonctionnel est impliqué dans la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de la contraction tandis que le RS longitudinal recapture le  $\text{Ca}^{2+}$  lors de la relaxation musculaire (Meissner 1975; Saito et al. 1984; Watras et Katz 1984).

### 3.3. La triade

Les triades sont des structures présentes sur toute la longueur de la fibre musculaire squelettique, elles sont constituées de l'apposition entre un tubule-T et deux citernes terminales adjacentes de RS (Kelly 1969; Somlyo 1979; Eisenberg 1982). Dans la fibre musculaire striée cardiaque, ces deux membranes sont arrangées différemment, on parle de dyades où une citerne terminale de RS forme une jonction avec le tubule-T ou avec la membrane de surface (Sun et al. 1995).

La triade met donc en contact les systèmes membranaires extra- et intracellulaires qui sont séparés par un espace jonctionnel de 10 nm environ occupé par de petites densités appelées « pieds jonctionnels » (Franzini-Armstrong et Nunzi 1983).

Les triades sont le lieu de la fibre musculaire squelettique où les variations de potentiel membranaire de surface ont un effet sur le système membranaire intracellulaire pour contrôler la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et donc la contraction. C'est d'ailleurs la région de la cellule musculaire où s'accumule un très grand nombre de protéines dites « triadiques » (tubules-T et citernes terminales de RS) formant un complexe indispensable à l'activité musculaire (*pour plus de détails, voir section II.1. Le couplage EC*).

Les triades sont retrouvées à intervalle régulier dans le cytoplasme de la fibre musculaire et sont en contact étroit avec les myofibrilles (jonction bande A-bande I chez les mammifères). Cette parfaite régularité de structure est essentielle à la fonctionnalité du système contractile. De plus, c'est une

spécificité qui confère aux protéines triadiques un profil d'expression caractéristique en doublets de bandes transversales espacée de 2  $\mu\text{m}$  (Figure 4) (pour revue, voir Sorrentino 2011).

Les membranes des tubules-T et du RS jonctionnel sont des systèmes fonctionnellement associés mais indépendants qui jouent des rôles bien distincts et indispensables dans le cycle contractile.

## CHAPITRE 2 : DETERMINANTS MOLECULAIRES ET FONCTIONNELS DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION ET DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE

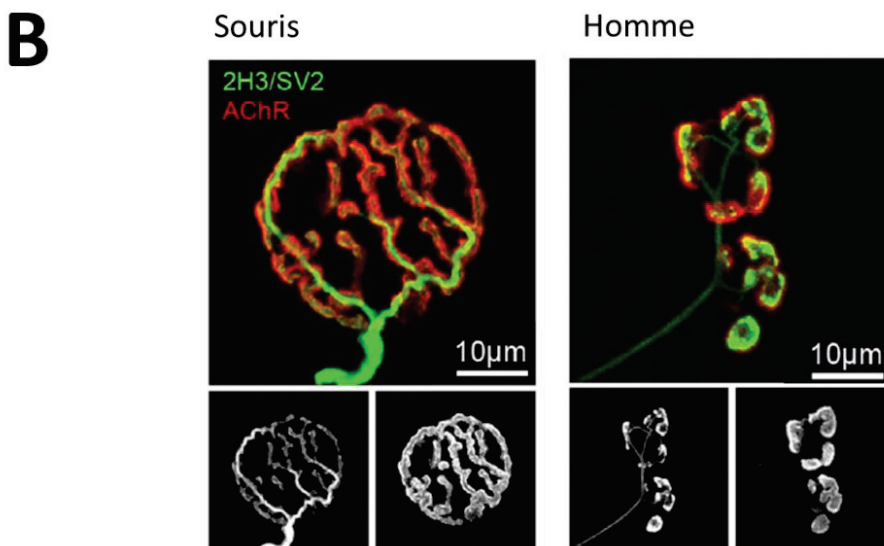
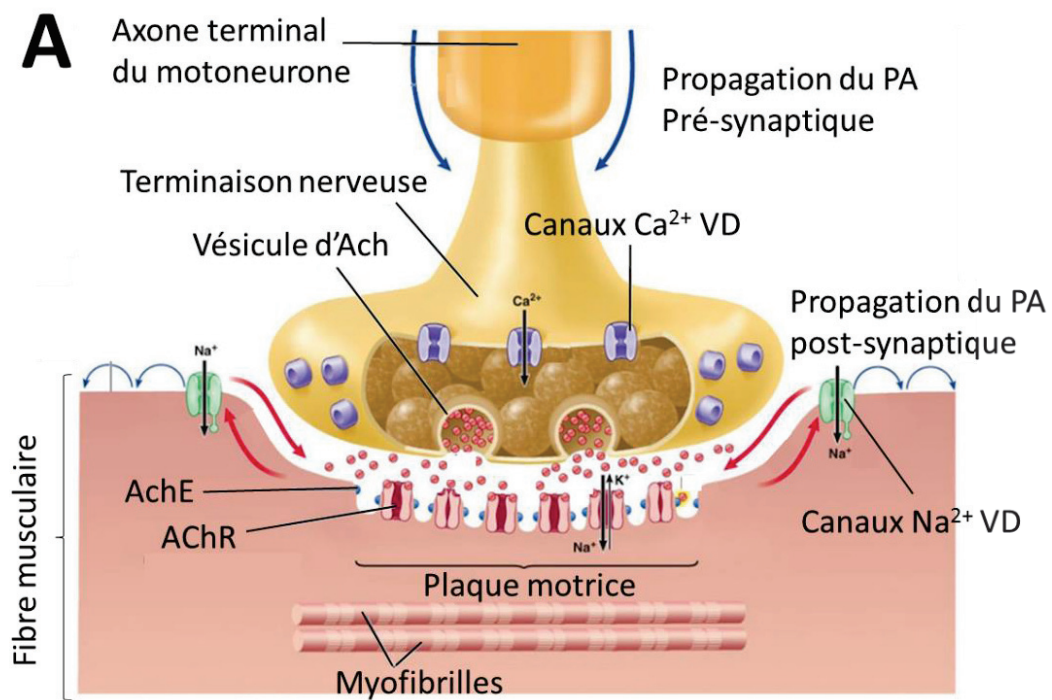
### 1. Le couplage excitation-contraction (EC)

Dans le cadre de leurs travaux sur la fibre isolée de grenouille, Hodgkin et Horowitz (1960) ont mesuré la tension produite par une fibre musculaire en réponse à la dépolarisation membranaire induite par des changements de concentration de  $K^+$  externe. Ils ont ainsi mis en évidence la relation entre les changements de potentiel de la membrane d'une cellule musculaire et sa réponse contractile.

De nombreuses études ont démontré en parallèle que le  $Ca^{2+}$  était le messager chimique responsable de ce lien entre dépolarisation membranaire et contraction (voir par exemple, Sandow 1952). Cependant, c'est seulement une dizaine d'années plus tard que le RS a pu être identifié comme étant le réservoir d'ions calcium responsable de leur libération et de leur ré-accumulation. C'est d'abord l'architecture hautement spécialisée du RS et son contact étroit avec les protéines myofibrillaires, mis en évidence par microscopie électronique, qui ont éveillé les soupçons quant au rôle évident que semblait jouer ce compartiment dans l'activité contractile de la fibre musculaire (pour revue, voir Porter 1961). Finalement, cette hypothèse a été confirmée grâce à l'utilisation de la caféine sur RS isolé (Herz et Weber 1965). Par ailleurs, le rôle du  $Ca^{2+}$  extracellulaire dans la contraction musculaire a également été très débattu jusqu'à ce que les travaux d'Armstrong et al. (1972) démontrent finalement qu'il n'intervient ni dans l'activité électrique de la membrane plasmique ni dans l'augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire nécessaire à la contraction.

Les tubules-T représentent le lien nécessaire entre la dépolarisation membranaire de surface et la libération de  $Ca^{2+}$  intracellulaire par les citernes terminales de RS (Andersson-Cedergren 1959). En effet, c'est grâce à ce réseau tubulaire-T que le changement de potentiel membranaire est rapidement transmis à l'intérieur de la cellule musculaire.

Pour définir cette cascade d'évènements impliquée dans la transduction du signal électrique membranaire de surface en activation mécanique des protéines contractiles, on parle de couplage excitation-contraction (EC). Au cours de ce couplage EC, la transmission de l'excitation des tubules-T au RS est associée à un changement de conformation moléculaire à la triade qui entraîne une modification de la conductance des canaux ioniques qui y sont localisés. Ce chapitre traite des déterminants moléculaires triadiques impliqués dans ce processus de couplage entre l'excitation et la contraction du muscle strié squelettique.



**Figure 5. La jonction neuromusculaire (JNM)**

**A.** Schéma de la transmission nerveuse à la JNM. La propagation d'un PA neuronal entraîne l'activation de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants (VD). L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la terminaison nerveuse permet la fusion des vésicules avec la membrane pré-synaptique et la libération de l'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique. La fixation de l'ACh sur ses récepteurs (AChR) déclenche leur ouverture et l'apparition d'un potentiel de plaque motrice excitateur qui active les canaux  $\text{Na}^+$  VD à l'origine du PA post-synaptique. L'ACh est progressivement hydrolysée par l'acétylcholinestérase en choline + acétate. D'après *Muscular Tissue*, John Wiley & Sons, Inc, 2009

**B.** Cliché de microscope confocal de cryo-sections longitudinales de fibres musculaires squelettiques (muscle *peroneus brevis*) de souris et d'Homme marquées avec des anticorps anti-AChR et anti-2H3/SV2 (protéines des vésicules synaptiques). Chez l'Homme, les plaques motrices sont plus petites, l'axone terminal est plus fin et les ramifications nerveuses sont moins complexes que chez la souris. D'après Jones et al. (2017)

### 1.1. Jonction neuromusculaire et génèse d'un potentiel d'action

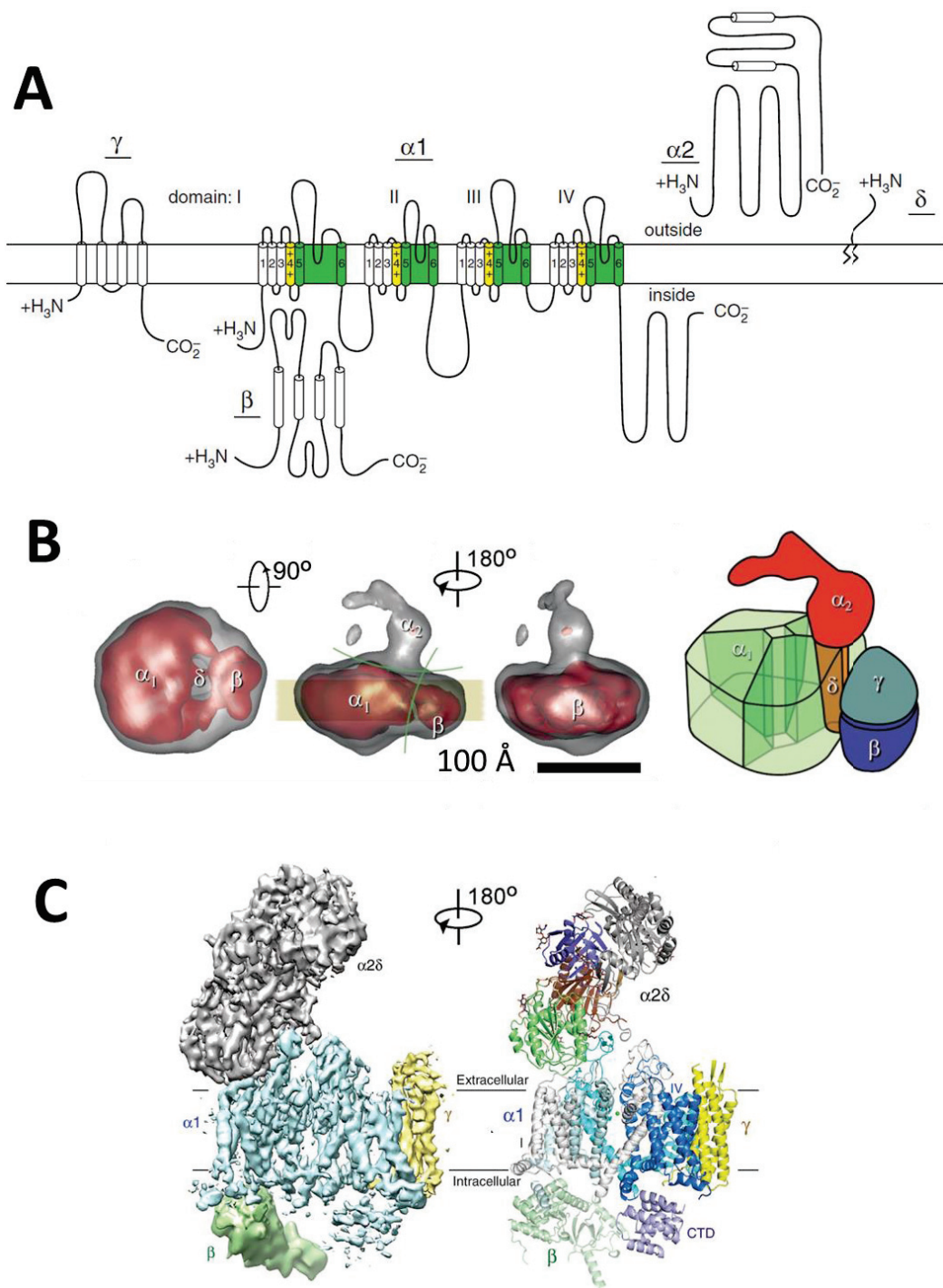
La jonction neuromusculaire (JNM) est la synapse permettant la transmission du signal entre la terminaison nerveuse motrice pré-synaptique et la membrane musculaire post-synaptique (ou plaque motrice) (pour revue, voir Tintignac et al. 2015) (Figure 5).

Chez les mammifères, la transmission neuromusculaire est médiée par l'Acétylcholine (Ach), neurotransmetteur contenu dans des vésicules pré-synaptiques, qui est libéré par exocytose dans la fente synaptique (~ 50 nm-100 nm de largeur). La plaque motrice est bien délimitée (~0.02  $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-2}$  de fibre chez l'Homme, 0.05  $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-2}$  chez la souris), elle se positionne au centre de la cellule musculaire mature et elle est extrêmement repliée (Jones et al. 2017; et pour revue, voir Sanes 2003). En périphérie, les replis membranaires post-synaptiques présentent une forte densité en récepteurs à l'Ach (AchR) (Marques et al. 2000; Gan et Lichtman 1998; Jones et al. 2017) qui sont attachés au cytosquelette par le complexe des protéines associées à la dystrophine (pour revue, voir Ehmsen et al. 2002). En profondeur, les replis jonctionnels sont riches en canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants, qui sont avec les AchRs, les canaux ioniques dont le rôle est critique pour la conversion du message chimique provenant de la terminaison nerveuse en potentiel d'action (PA) musculaire.

Plus précisément, lors de l'excitation nerveuse, l'Ach est libéré dans la fente synaptique par fusion  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante des vésicules d'exocytose avec la membrane pré-synaptique (Schweizer et al. 1995). Puis, l'Ach diffuse vers la membrane musculaire post-synaptique et se fixe à ses récepteurs, canaux ioniques perm rables aux ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ouverture des AchRs entraîne principalement une entrée de  $\text{Na}^+$  qui, en dépolarisant la membrane post-synaptique, conduit à l'apparition d'un potentiel de plaque motrice. L'atteinte de la valeur seuil de dépolarisation (~-50mV; Hodgkin et Horowicz 1960), par le potentiel de plaque motrice entraîne l'ouverture des canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants menant à une augmentation rapide du courant sodique entrant. Le PA généré se propage alors dans les deux directions, de proche en proche, sur toute la longueur du sarcolemme de la fibre musculaire et en profondeur via les tubules-T. L'Ach est ensuite hydrolys e par l'acétylcholinestérase en choline et en acétate dans la fente synaptique. La choline est alors recaptur e en partie par la terminaison nerveuse via des transporteurs spécifiques.

### 1.2. Déterminants moléculaires

Les deux partenaires moléculaires principaux impliqués dans le couplage EC sont le récepteur aux dihydropyridines (DHPR) – inséré dans la membrane tubulaire-T – et le récepteur de la ryanodine (RYR) – localisé à la membrane des citernes terminales de RS. Le DHPR transduit le signal électrique en ouverture mécanique du RYR via un couplage physique entre les deux protéines.



**Figure 6. Structure du récepteur aux dihydropyridines (DHPR)**

- Schéma représentant les 5 sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2$  et  $\delta$  du DHPR. Les segments S4 chargés positivement de chaque domaine de  $\alpha_1$  (en jaune) forment le domaine détecteur de potentiel. Les boucles intra-membranaire S5-S6 (en vert) de chaque domaine (I, II, III, IV) de  $\alpha_1$  forment le domaine pore sélectif aux ions Ca<sup>2+</sup>. D'après Catterall (2011)
- Trois vues orthogonales de la structure 3D du DHPR (côté extracellulaire et dans le plan de la membrane tubulaire-transverse) avec une résolution de 23 Å. Le schéma de droite illustre les interactions entre les différentes sous-unités du DHPR ainsi que le canal formé par les 4 domaines de la sous unité  $\alpha_1$ . D'après Wolf et al. (2003)
- Structure générale du DHPR modélisé en 3D à partir d'images de microscopie cryo-électronique avec une résolution de 3.6 Å. Chaque sous-unité est représentée avec une couleur différente et les quatre domaines homologues de  $\alpha_1$  sont représentés en nuances de bleu. D'après Wu et al. (2015)

### 1.2.1. Le récepteur aux dihydropyridines (DHPR)

Dans les fibres musculaires squelettiques, les DHPRs sont regroupés par quatre (tétrade) à la membrane tubulaire-T où ils jouent le rôle de détecteur de potentiel pour la transmission de la stimulation excitatrice au RS.

#### 1.2.1.1. Structure moléculaire

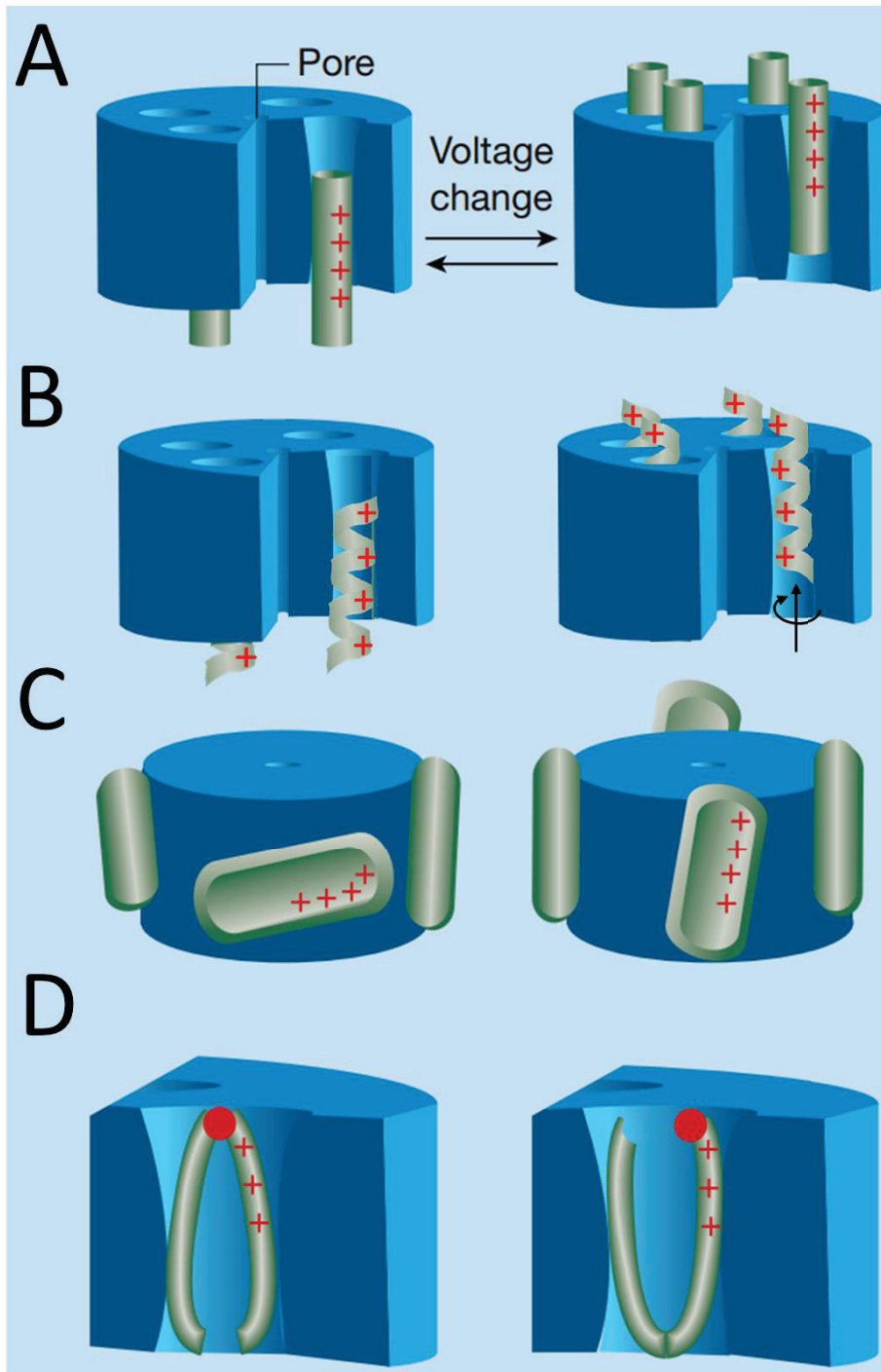
Le DHPR est un hétéropentamère de 550 kDa qui tire son nom de sa sensibilité aux 1,4-dihydropyridines (Almers et al. Palade 1981). Il est constitué des sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\beta_{1a}$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2$  et  $\delta$  (Takahashi et al. 1987) dont la sous-unité canal  $\alpha_1$  (ou  $Ca_v1$ ) est la sous-unité principale (Figure 6). Dans les fibres musculaires squelettiques, la sous-unité principale du DHPR est  $\alpha_{1s}$  (ou  $Ca_v1.1$ ). Dans les cellules musculaires cardiaques, la sous-unité principale du DHPR est  $\alpha_{1c}$  (ou  $Ca_v1.2$ ) (pour revue, voir Catterall 2000). Très récemment, le DHPR du muscle squelettique de lapin a été étudié par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) ce qui a permis de fournir un modèle atomique 3D de haute résolution (de 3.6 Å, Wu et al. 2015) et ainsi de révéler l'architecture détaillée de  $Ca_v1.1$  et de son interaction avec les sous unités auxiliaires  $\beta_{1a}$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2$  et  $\delta$  (Figure 6 C).

- **La sous unité principale  $\alpha_{1s}$  (ou  $Ca_v1.1$ )**

La sous-unité  $\alpha_{1s}$  du DHPR (ou  $Ca_v1.1$ ) est codée par le gène *cacna1s* (pour *calcium channel alpha 1 skeletal muscle*) constitué de 44 exons. Elle est composée de 2000 acides aminés répartis en 4 domaines homologues (I-IV) – chacun constitué de 6 segments transmembranaires repliés en hélices  $\alpha$  (S1-S6) – et ses extrémités N-terminale, C-terminale ainsi que ses boucles intra-segments sont présentées du côté cytosolique de la membrane (Tanabe et al. 1987). A l'origine, c'est la grande similarité de sa structure primaire avec le canal  $Na^+$  voltage-dépendant qui a permis d'identifier cette sous-unité  $\alpha_{1s}$  comme canal  $Ca^{2+}$  voltage-dépendant :  $Ca_v1.1$  (Beam et al. 1986; Rios et Brum 1987; Brum et al. 1988; Tanabe et al. 1990). Plus précisément, on sait aujourd'hui que  $Ca_v1.1$  est un canal calcique voltage-dépendant de type L (pour *long lasting*) qui s'active en réponse à de fortes valeurs de potentiel et s'inactive lentement (constante de temps de déclin de l'ordre de plusieurs centaines de ms). De plus, il présente une conductance macroscopique maximale de l'ordre de 150 à 200  $S.F^{-1}$  en présence de 2.5 mM de  $Ca^{2+}$  extracellulaire (Collet et al. 2003; Pouvreau et al. 2004).

Les segments S4 de  $Ca_v1.1$  sont riches en résidus Arginine et/ou Lysine (un acide aminé sur trois, soit quatre acides aminés par S4) qui sont chargés positivement à pH physiologique et qui représentent le détecteur de potentiel de la protéine. Ainsi, une seule molécule de  $Ca_v1.1$  contient quatre segments sensibles au potentiel (un par domaine transmembranaire : I-S4, II-S4, III-S4 et IV-S4) (Figure 6 A).





**Figure 7. Comportement des segments S4 du détecteur de potentiel  $Ca_v1.1$**

**A.** Modèle à « hélice glissante » (ou « sliding helix » model)

**B.** Modèle à « vis hélicoïdale » (ou « helical screw » model)

**C.** Modèle à « pagaie » (ou « paddle voltage-sensor » model)

**D.** Modèle « semblable au transporteur » (ou « transporter-like » model)

Modifié d'après Blaustein et Miller (2004)

L'étroit pore externe du canal voltage-dépendant est tapissé par la boucle intramembranaire (S5-S6) qui contient une paire de résidus glutamate dans chaque domaine, requise pour sa sélectivité au  $\text{Ca}^{2+}$ . Le pore interne est formé par les segments S6 qui constituent également les sites récepteurs des drogues antagonistes (ex.: nifédipine) agissant sur le canal  $\text{Ca}^{2+}$  de type L.

Les segments S4 de chaque domaine homologue sont donc les détecteurs de potentiel nécessaires à l'activation de la protéine  $\text{Ca}_v1.1$ . Plus précisément, sous l'influence du champ électrique, les charges positives portées par les segments S4 se déplacent à l'intérieur de la membrane, ce qui conduit au changement conformationnel de la protéine à l'origine de l'ouverture du pore.

Le mouvement des charges positives des S4 des canaux voltage-dépendants a été l'objet de controverses et quatre modèles ont été proposés ces trente dernières années (Figure7) :

- Le modèle à « hélice glissante » (ou « *sliding helix* » *model*) propose que, sous l'effet de la dépolarisation membranaire, les segments S4 se déplacent du feuillet interne vers le feuillet externe ( $\sim 5 \text{ \AA}$ ) en glissant comme une tige rigide (Catterall 1986).

- Le modèle à « vis hélicoïdale » (ou « *helical screw* » *model*) propose que les segments S4 subissent un mouvement semblable à celui d'une vis (rotation d'environ  $60^\circ$ ) soit un déplacement vers le feuillet externe d'environ  $4.5 \text{ \AA}$  (Guy et Seetharamulu 1986).

- Le modèle à « pagaie » (ou « *paddle voltage-sensor* » *model*) propose que les segments S4 soient bloqués contre les S3 quand le canal est fermé (feuillet interne de la membrane) et qu'ils pivotent ou basculent vers le feuillet externe lorsque le canal s'ouvre (Jiang et al. 2003).

- Le modèle « semblable au transporteur » (ou « *transporter-like* » *model*) propose un subtil réarrangement par lequel la protéine se déplacerait autour du S4 fixe (Starace et Bezanilla 2004).

Finalement, les segments S4 se déplaceraient dans la membrane selon un modèle beaucoup plus complexe qui serait en réalité une combinaison des modèles précédemment proposés (Delemotte et al. 2011).

- **Les sous-unités auxiliaires  $\beta_{1a}$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2$  et  $\delta$**

Les sous-unités auxiliaires du DHPR sont essentielles à l'activité de la protéine car elles jouent un rôle indispensable pour le trafic membranaire et les propriétés canal de  $\text{Ca}_v1.1$  (Perez-Reyes et al. 1989).

**La sous-unité  $\beta_{1a}$**  du DHPR est codée par le gène *cacnb1*. C'est une protéine soluble phosphorylée de 55 kDa qui interagit avec la sous-unité  $\alpha_{1s}$ . Les travaux du groupe de R. Coronado, sur fibres musculaires de souris, ont permis de démontrer que l'absence de la sous-unité  $\beta_{1a}$  compromet l'adressage de  $\text{Ca}_v1.1$  à la membrane tubulaire et élimine le couplage EC (Gregg et al. 1996; Strube et al. 1996). Il existe par ailleurs un modèle de poisson-zèbre (*Danio rerio*) dits « mutants relâchés » (*red<sup>ts25</sup>*) qui présente un défaut d'expression de la sous-unité  $\beta_{1a}$ . Ces animaux ont été identifiés par leur incapacité

à se mouvoir en réponse à un stimulus. La découverte de cet organisme modèle a permis de confirmer que la sous-unité  $\beta_{1a}$  est indispensable à l'adressage du complexe du DHPR à la jonction Tubule-T/RS et de son arrangement spécifique en tétrade (Schredelseker et al. 2005).

**La sous-unité  $\gamma$**  du DHPR est codée par le gène *cacng1*. C'est une glycoprotéine de 33 kDa composée de quatre domaines transmembranaires qui interagit avec  $\alpha_{1s}$ . Les souris dont le gène *cacng1* est invalidé sont viables et ne semblent pas présenter d'anomalies morphologiques. En revanche, l'augmentation du courant  $Ca^{2+}$  et le ralentissement de son inactivation en l'absence de  $\gamma$  indiquent que cette sous-unité exerce un effet inhibiteur sur le courant calcique (Freise et al. 2000). Ce rôle endogène inhibiteur de  $\gamma$  sur le courant calcique protégerait la fibre musculaire d'une forte entrée de  $Ca^{2+}$  extracellulaire lors de conditions de stress telle qu'une activité musculaire prolongée (Andronache et al. 2007).

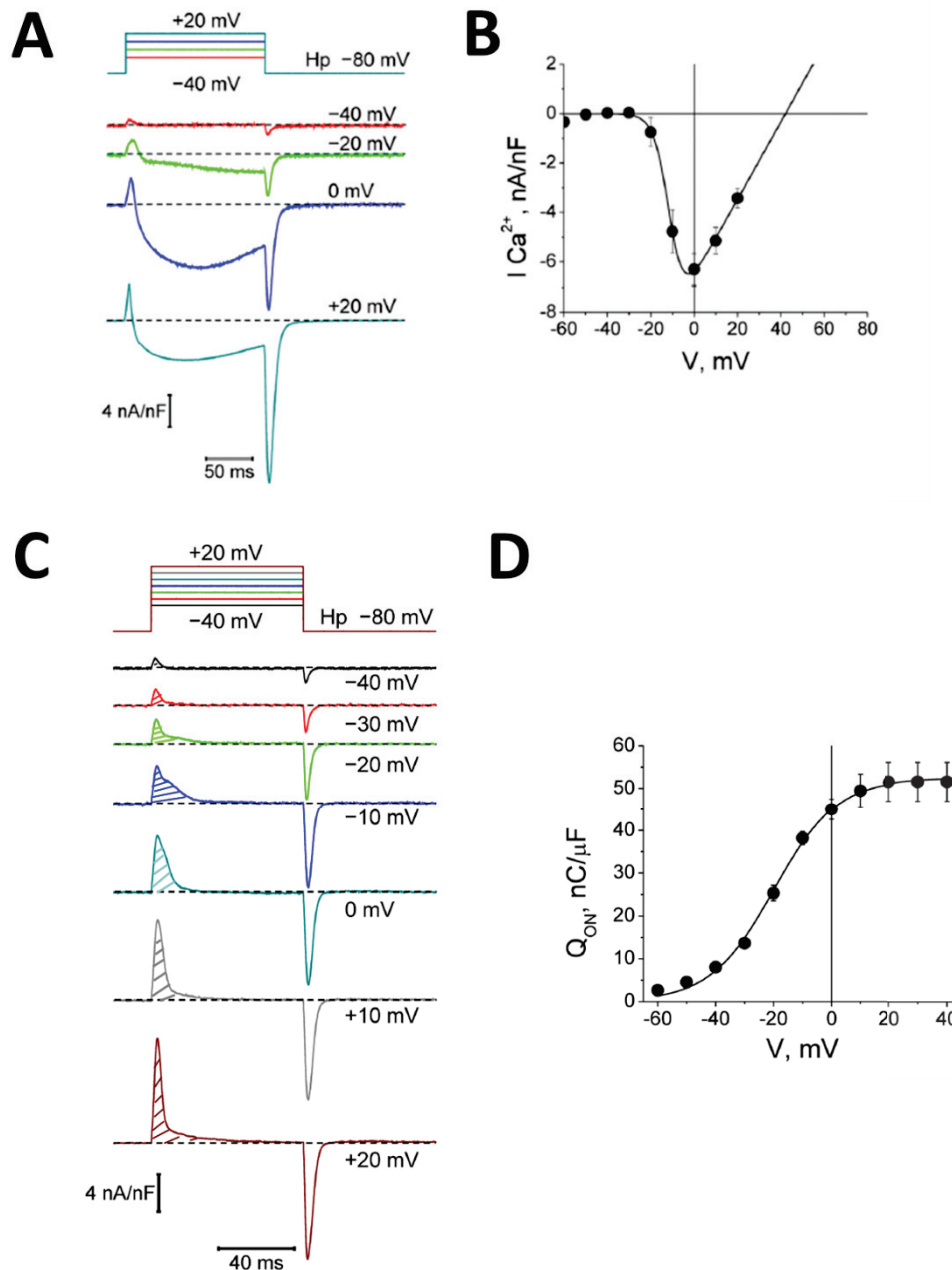
**Les sous-unités  $\alpha_2$  et  $\delta$**  du DHPR forment un dimère de 170 kDa et proviennent du même gène *cacna2d1*. La sous-unité  $\alpha_2$  est une protéine extracellulaire, attachée à la membrane via les ponts disulfures qu'elle forme avec la sous-unité transmembranaire  $\delta$ . Le dimère  $\alpha_2\delta$  présente une faible interaction avec la sous-unité principale  $\alpha_{1s}$ . Il joue un modeste rôle sur la densité de courant et exerce un léger effet sur les cinétiques d'activation (Obermair et al. 2005). En revanche, dans les myotubes en culture, les sous-unités  $\alpha_2$  et  $\delta$  semblent être nécessaires au maintien de la libération de  $Ca^{2+}$  en réponse à des dépolarisations prolongées ou à des trains de PA répétés (Gach et al. 2008).

#### 1.2.1.2. Caractéristiques fonctionnelles

La dysgénésie musculaire est due à une mutation récessive spontanée chez la souris qui entraîne un défaut d'expression de la sous-unité  $\alpha_{1s}$  du DHPR (Knudson et al. 1989; Flucher et al. Powell 1991). Cette mutation létale se caractérise par une dégénérescence progressive *in utero* du muscle squelettique (Pai 1965) et par un phénomène de découplage entre dépolarisation membranaire et contraction (Klaus et al. 1983). Alors que le sarcolemme peut toujours générer des PA et que le RS conserve sa capacité à séquestrer puis à relarguer le  $Ca^{2+}$ , l'incapacité de la dépolarisation tubulaire à induire la libération de  $Ca^{2+}$  entraîne une absence totale de contraction du muscle squelettique. Ainsi, cet organisme modèle a permis d'identifier  $Ca_v1.1$  comme – la sous-unité canal  $Ca^{2+}$  (Beam et al. 1986) sensible au potentiel (Tanabe et al. 1990) du DHPR et donc comme – le détecteur de potentiel du couplage EC jouant rôle un régulateur clé du  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans le muscle strié squelettique.

- **$Ca_v1.1$  : Canal calcique de type L**

L'influx de  $Ca^{2+}$  à travers  $Ca_v1.1$  (Figure 8 A, B) ne semble intervenir ni dans la propagation du PA ni dans le couplage EC du muscle strié squelettique (Armstrong et al. 1972). En effet, des études sur fibres musculaires squelettiques de grenouille ont initialement montré que l'influx  $Ca^{2+}$  voltage-dépendant



**Figure 8. Cav1.1 : canal calcique de type L et détecteur de potentiel du couplage EC**

- A.** Courants  $\text{Ca}^{2+}$  à travers le pore du canal formé par Cav1.1 (tracés du bas) enregistrés sur une fibre musculaire maintenue à un potentiel de maintien (Hp) de -80 mV en réponse à des dépolarisations membranaires d'une durée de 80 ms et d'amplitude croissante portant le potentiel à des valeurs comprises entre -40 et +20 mV.
- B.** Courbe courant-potentiel ( $I_{\text{Ca}}-V$ ) : Pic du courant mesuré sur les tracés de **A.** à chaque valeur de dépolarisation (de -40 mV à +20 mV).
- C.** Courants capacitifs non linéaires enregistrés dans une fibre musculaire en réponse à des dépolarisations de 80 ms de durée et d'amplitude croissante (valeurs indiquées à droite des signaux).
- D.** Relation entre les mouvements de charges intramembranaires et le potentiel ( $Q-V$ ). Les mouvements de charges sont calculés à partir de l'intégrale du courant mesuré ( $Q_{\text{on}}$ ) en réponse à chaque valeur de dépolarisation sur les tracés en **C.** (zone hachurée en C.).

D'après Hernández-Ochoa et Schneider (2012)

n'était ni suffisant (Sanchez et Stefani 1978) ni nécessaire (Gonzalez-Serratos et al. 1982) à l'activation de la réponse contractile. Par ailleurs, la comparaison quantitative entre l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers  $\text{Ca}_v1.1$  et l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS pendant une dépolarisation membranaire a permis d'éliminer toute contribution substantielle de  $\text{Ca}_v1.1$  à l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique nécessaire à la contraction que ce soit chez la grenouille (Brum et al. 1988) ou chez la souris (Ursu et al. 2005). De plus, dans le muscle squelettique de poisson-zèbre, les résidus glutamate de la boucle S5-S6 des sous-unités principales ( $\alpha_{1s}$ -a et  $\alpha_{1s}$ -b) sont substitués par des acides aminés neutres ce qui conduit à la perte de la conductance du canal sans que le couplage EC ne soit affecté (Schredelseker et al. 2010; Bannister et Beam 2013). Récemment, Dayal et al. (2017) ont créé un nouveau modèle de souris KI porteuses de  $\text{Ca}_v1.1$  non conducteurs sur la base de cette substitution de résidus observée chez le poisson-zèbre qui invalide le courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type L. Ce modèle a permis de confirmer que, lors de dépolarisations membranaires, l'absence de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers  $\text{Ca}_v1.1$  n'a d'effet ni sur les mouvements de charges de  $\text{Ca}_v1.1$ , ni sur l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, ni sur les performances musculaires (Dayal et al. 2017). Ces résultats apportent un argument supplémentaire à la théorie selon laquelle l'activité canal  $\text{Ca}^{2+}$  de  $\text{Ca}_v1.1$  est sans importance pour le couplage EC.

Cependant, des résultats conflictuels ont été obtenus par le groupe de S. Hamilton montrant que l'introduction chez la souris de la mutation E1014K dans  $\text{Ca}_v1.1$  – invalidant sa perméation et/ou sa fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  – aurait des conséquences sur la fatigabilité, la taille et le typage des fibres musculaires. En contradiction avec l'argumentaire ci-dessus, ces données suggèrent le rôle important de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la modulation de la performance musculaire (Lee et al. 2015). Enfin, il a également été suggéré que le courant de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers  $\text{Ca}_v1.1$  pourrait aider au maintien de la performance musculaire en condition de dépolarisation membranaire prolongée, et donc d'activité soutenue, en permettant de recharger directement le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS (Robin et Allard 2015).

- **$\text{Ca}_v1.1$  : Détecteur de potentiel**

En 1973, Schneider et Chandler enregistrent pour la première fois un courant généré par le déplacement de charges à l'intérieur de la membrane en réponse à la dépolarisation de la fibre musculaire de grenouille. Le blocage pharmacologique des courants membranaires potassiques (TEA) et sodiques (TTX) en condition de potentiel imposé (ou *voltage-clamp*) leur a permis d'identifier que la dépolarisation de la fibre musculaire squelettique était accompagnée d'un petit courant capacitif membranaire non linéaire traduisant le mouvement réversible d'un groupe de charges intramembranaires d'une position de repos vers une position activée (et son retour à sa position initiale de repos lors de la repolarisation). Les courants produits par ces mouvements de charge sont suffisamment petits pour ne pas interférer avec la propagation normale du PA.

Sur la fibre musculaire squelettique de grenouille, la voltage-dépendance du pic de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS est très similaire à la voltage dépendance de l'activation et de l'inactivation des mouvements de charges (Melzer et al. 1986; Ríos et al. 1993; Szentesi et al. 1997; Collet et al. 2003; Ferreira Gregorio et al. 2017) (Figure 8 C, D). Cette corrélation indique que les mouvements de charges représentent une étape clé du couplage EC (pour revue, voir Hernández-Ochoa et Schneider 2012).

L'identification définitive de  $\text{Ca}_v1.1$  comme support moléculaire des mouvements de charge et de la détection de potentiel pour le couplage EC a été réalisée grâce aux travaux du groupe de E. Rios sur la fibre musculaire de grenouille (Rios et Brum 1987; Brum et al. 1988) et du groupe de K. Beam sur le modèle de myotubes dysgénésiques en culture (Tanabe et al. 1990; Adams et Beam 1990) mentionné dans le paragraphe précédent. En résumé, ces travaux ont fourni la démonstration que le déplacement des charges de  $\text{Ca}_v1.1$  constitue le détecteur de potentiel dans le processus de couplage EC du muscle strié squelettique.

#### 1.2.1.3. Pharmacologie

De nombreux composés organiques sont connus pour moduler les flux d'ions à travers les canaux calciques de type L (pour revue, voir Reuter 1983). Ces composés ont rapidement été répertoriés car ils représentent des outils pharmacologiques précieux pour le traitement des maladies cardiovasculaires (Henry 1980; Bossert et Vater 1989; Triggle 2003; Striessnig et al. 2015). En particulier, les canaux calciques sont inhibés spécifiquement par des antagonistes calciques incluant certaines 1,4-dihydropyridines (nifédipine, nitrendipine), les phénylalkylamines (vérapamil et son dérivé le D600) et les benzothiazépines (diltiazem). Cependant, certaines 1,4-dihydropyridines agissent comme des agonistes  $\text{Ca}^{2+}$ , c'est notamment le cas du Bay K 8644 (voir par exemple Jacquemond et Rougier 1988). De plus, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , de nombreux cations divalents bloquent ces canaux tels que le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), le manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ), le nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), le cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) et le lanthane ( $\text{La}^{3+}$ ). En revanche, les canaux calciques de type L présentent une perméabilité plus importante pour le  $\text{Ba}^{2+}$  que pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (pour revue, voir Jones 1998).

Les mouvements de charges intramembranaires sont également influencés par les antagonistes  $\text{Ca}^{2+}$ . La quantité de charges qui se déplace dans la membrane lors d'une dépolarisation membranaire est réduite par la présence de nitrendipine tandis qu'elle est légèrement augmentée par le diltiazem (Walsh et al. 1987). Par ailleurs, la disparition des mouvements de charge induite par l'application de D600 (ou gallopamil, un dérivé du vérapamil) est voltage-dépendante et non corrélée à l'effet de cette drogue sur le courant  $\text{Ca}^{2+}$  (Hui et Milton 1987; Feldmeyer et al. 1990).

Finalement, les mêmes agents pharmacologiques ont un effet indépendant sur l'activité canal et sur les mouvements de charge de  $\text{Ca}_v1.1$ .

#### 1.2.1.4. Pathologies associées

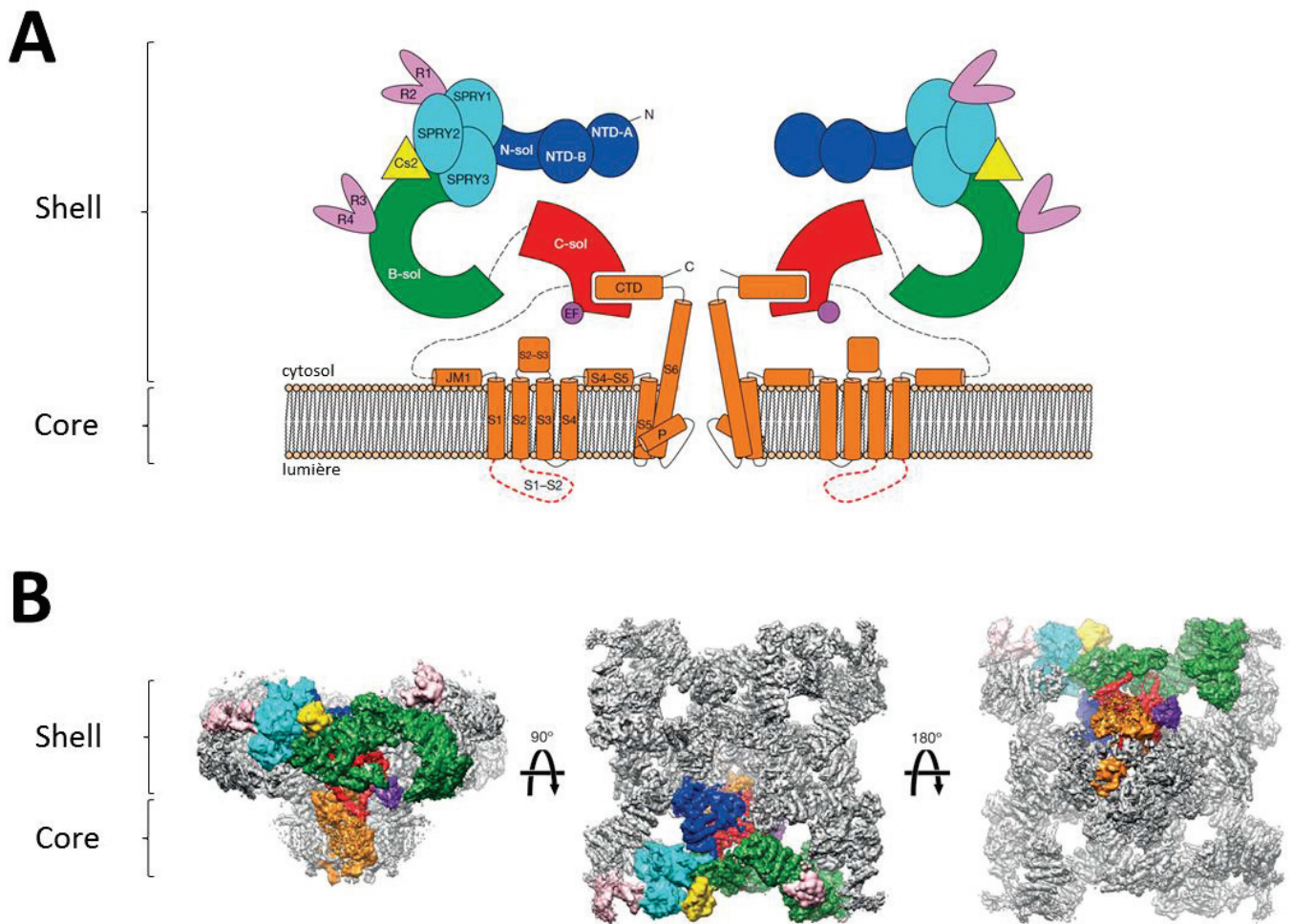
A ce jour, deux pathologies connues sont associées à des mutations du gène *cacna1s* codant pour Ca<sub>v</sub>1.1: la paralysie hypokaliémique de type 1 et l'hyperthermie maligne.

- **La paralysie périodique hypokaliémique de type 1 (ou hypoPP1)**

La paralysie hypokaliémie de type 1 est une canalopathie musculaire qui se caractérise chez l'Homme par des épisodes transitoires de paralysie flaccide associées à une hypokaliémie (baisse de la concentration plasmatique de K<sup>+</sup>). Généralement, ces crises font suite à un exercice intense, un stress ou à un régime riche en carbohydrates. Parmi les dix-huit mutations connues à l'origine de cette pathologie, la moitié de celles qui touchent le gène *cacna1s* consiste en la substitution d'un des résidus arginine du segment S4 (domaine II, III ou IV) en un acide aminé neutre (R528H, R897S, R900S et R1239H) (Cannon 2010; et pour revue, voir Allard et Fuster 2018). Des études de potentiel imposé sur fibres musculaires isolées exprimant la forme mutée R1239H ou R528H montrent une altération de la fonction canal Ca<sup>2+</sup> de Ca<sub>v</sub>1.1 qui se caractérise par une diminution de sa conductance ainsi qu'un décalage de sa voltage-dépendance par rapport à la forme sauvage (Fuster et al. 2017a). En revanche, ces altérations de la fonction canal de Ca<sub>v</sub>1.1 ne sont pas retrouvées lorsque la mutation se situe sur le segment S3 de  $\alpha_{1s}$  (V876E) (Fuster et al. 2017b), ce qui indique que la paralysie hypokaliémique ne serait pas liée à une altération de l'influx de Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendant. Par contre, l'entrée constitutive de cations dite « accessoire » ou « *gating pore current* » à travers Ca<sub>v</sub>1.1 (Fuster et al. 2017a; Fuster et al 2017b) pourrait expliquer que les fibres musculaires issues de biopsies de patients soient dépolarisées au repos lorsqu'elles baignent dans un milieu appauvri en K<sup>+</sup> (Rüdel et al. 1984; Cannon 2015). Ces résultats soutiennent les données électromyographiques qui montrent que lors de contractions volontaires répétées, l'amplitude des PA musculaires décroît anormalement chez les patients hypoPP1, ce qui témoigne d'une perte d'excitabilité membranaire en réponse à un exercice prolongé (Cannon 2010).

- **L'hyperthermie maligne**

L'hyperthermie maligne est une maladie génétique autosomique dominante potentiellement létale qui se caractérise par de la fièvre et par une rigidité du muscle squelettique induites par l'exposition à certains anesthésiques volatiles tels que l'halothane. Parmi la trentaine de mutations décrites, une seule touche le gène *cacna1s*. Cette mutation consiste en la substitution d'un des résidus arginine de la boucle interdomaine III-IV en un acide aminé neutre (R1086H/C/S) (Monnier et al. 1997; Carpenter et al. 2009; Toppin et al. 2010). La présence de la mutation R1086H augmente la sensibilité des canaux de libération de Ca<sup>2+</sup> réticulaire à la présence d'agonistes et induit un décalage de leur voltage-



**Figure 9. Structure du récepteur de la ryanodine de type 1 (RYR1)**

- A.** Représentation schématique des domaines principaux de RYR1 : le domaine N-terminal (NTD, bleu), les 3 domaines SPRY (cyan), la région clamp (R1-R2) et le domaine de phosphorylation (R3-R4) (rose), le domaine de liaison à la calstabile (ou FKBP12, jaune), le solénoïde périphérique (vert), le solénoïde central (rouge), les domaines transmembranaires et C-terminal (CTD) (orange) et le site de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  (main EF) (violet).
- B.** Structure du RYR1 modélisé en 3D selon trois vues orthogonales (dans le plan de la membrane du RS, du côté cytosolique et du côté luminal) avec une résolution de 4.8 Å.

D'après Zalk et al. (2015)



dépendance vers des potentiels plus négatifs (Weiss et al. 2004). Ces résultats révèlent l'influence de la boucle cytoplasmique III-IV sur le couplage EC du muscle strié squelettique.

### 1.2.2. Canal calcique réticulaire, le récepteur de la ryanodine de type 1 (RYR1)

Le récepteur de la ryanodine (RYR) est le plus gros canal ionique connu. Il est inséré dans la membrane jonctionnelle du RS et constitue la structure responsable de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours du couplage EC. Chez le mammifère, les canaux RYR sont retrouvés dans une large variété de types cellulaires sous trois isoformes RYR1, RYR2 et RYR3. RYR1 est la principale isoforme du muscle squelettique, RYR2 est majoritairement exprimée dans les myocytes cardiaques et lisses tandis que RYR3 est l'isoforme neuronale retrouvée également dans le diaphragme ainsi que dans les fibres lentes du muscle squelettique en développement (pour revue, voir Meissner 2017). Les gènes codant pour ces trois isoformes (*ryr1*, *ryr2* et *ryr3*) présentent 65% d'homologie de séquence (pour revue, voir Lanner et al. 2010).

#### 1.2.2.1. Structure moléculaire

Dans les années 1970, les premiers clichés de microscopie électronique de la fibre musculaire squelettique de grenouille indiquent la présence de structures de pontage, les « pieds jonctionnels », entre les deux membranes triadiques (tubule-T et RS) (Franzini-Armstrong 1970; Franzini-Armstrong et Nunzi 1983). Ces structures de liaison sont régulièrement espacées et s'organisent en deux rangées parallèles (en forme de damier). Elles sont disposées à la face cytosolique des tubules-T et recouvrent jusqu'à 80% de leur surface (Franzini-Armstrong et Nunzi 1983).

C'est seulement une vingtaine d'années plus tard, après des études de purification, que ces petites projections en forme de trèfle à quatre feuilles ont été identifiées comme correspondant aux RYR1s (Lai et al. 1988). Le RYR1 est un gros complexe homotétramérique de 2.2 MDa composé de près de 5000 acides aminés (~550 kDa) par monomère. C'est sa très forte affinité pour la ryanodine, un alcaloïde extrait de l'arbuste tropical *Ryania speciosa*, qui a initialement permis la purification et le clonage de cette protéine (Takeshima et al. 1989). Depuis, les progrès de la cryo-EM ont permis de déterminer la structure du RYR avec des niveaux de résolution de plus en plus importants. A l'heure actuelle, les reconstructions de plus haute qualité ont été obtenues à partir de l'isoforme squelettique de lapin et atteignent une précision « quasiment atomique » de 6.1 Å, 4.8 Å et 3.8 Å (respectivement, Efremov et al. 2015; Zalk et al. 2015; Yan et al. 2015) (Figure 9). Si ces récentes données structurales de haute résolution ont notamment permis d'identifier – via des simulations de dynamiques moléculaires – les mécanismes d'activation, de sélectivité et de conduction du canal  $\text{Ca}^{2+}$ , elles n'ont cependant apporté aucune information nouvelle sur les mécanismes impliqués dans l'interaction entre RYR1 et  $\text{Ca}_v1.1$ .

**La région « core »** de la protéine est ancrée dans la membrane du RS et contient les six domaines transmembranaires (S1-S6) de chaque monomère (Figure 9). C'est la combinaison des quatre domaines C-terminaux transmembranaires du complexe homotétramérique de la protéine qui forme le pore cationique du canal RYR1. De manière intéressante, les segments S1 à S6 s'organisent dans la membrane comme les canaux ioniques voltage-dépendants et forment un « domaine pseudo-voltage sensible » (pVSD) qui communique avec le domaine pore (Zalk et al. 2015). De nombreux travaux réalisés *in vitro* sur canal isolé rapportent d'ailleurs que l'activité canal du RYR1 serait dépendante du potentiel (voir par exemple, Smith et al. 1985; Smith et al. 1986; Anderson et al. 1989; Nagasaki et Fleischer 1988; Picher et al. 1997).

**La région « shell »** (ou chapeau ou « *bulk* » ou « *mushroom* ») représente 80% de la densité totale de la protéine avec des dimensions d'environ 270 Å x 270 Å x 160 Å (Yan et al. 2015). Elle est formée par les portions N-terminales de chaque monomère de RYR1 (~4000 acides aminés) et constitue les pieds jonctionnels cytosoliques visibles en microscopie électronique. Chaque monomère de RYR1 possède plusieurs domaines solénoïdes  $\alpha$  : un solénoïde central formant l'entrée cytosolique du canal et un solénoïde périphérique surmonté par deux domaines N-terminaux (NTD-A et NTD-B) (Figure 9 A). En particulier, ces régions périphériques sont mobiles et leur liaison à certaines molécules et protéines modulent l'état d'ouverture du canal via des changements de conformation (Tian et al. 2013) .

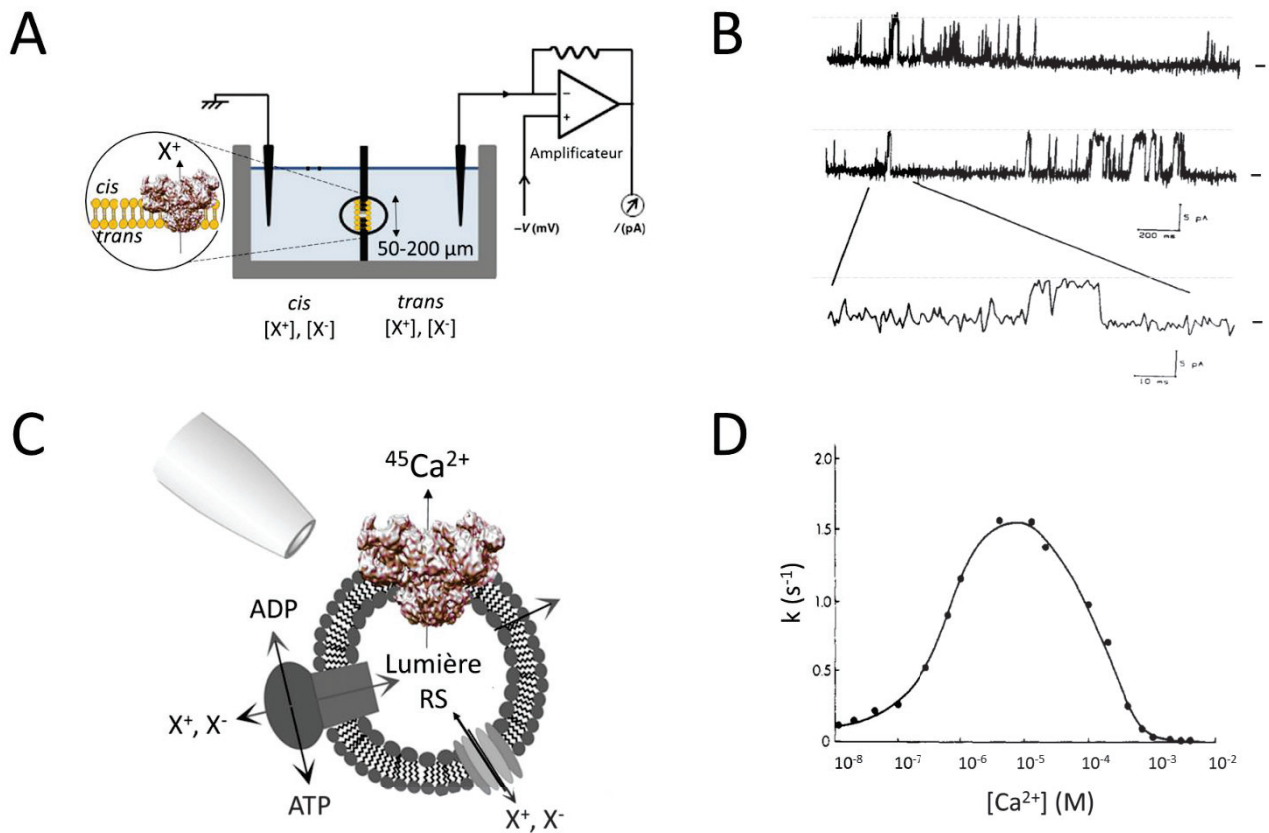
La souris dyspédique est un modèle transgénique dans lequel l'isoforme squelettique du RYR fait défaut (mutation invalidante du gène *ryr1*) et dont la forme homozygote est létale (Takehima et al. 1994). Ce modèle a notamment permis d'identifier le rôle essentiel de RYR1 dans la contraction du muscle strié squelettique et illustre également le fait que les trois isoformes de RYR ne peuvent se substituer les unes aux autres. En effet, cette mutation est associée non seulement à une absence de pieds jonctionnels (d'où le terme « dyspédique ») mais également à des anomalies de développement du système musculo-squelettique et à un défaut du couplage EC.

#### 1.2.2.2. Caractéristiques biophysiques

La caractérisation des propriétés unitaires des canaux RYR (amplitude de courant, perméabilité, conductance, probabilité d'ouverture et cinétiques) est fondamentale pour la compréhension du couplage EC ainsi que pour de nombreux phénomènes de signalisation  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

- **Méthodes d'étude *in vitro* et propriétés unitaires du canal RYR1**

Le RS n'étant pas directement accessible sur fibre musculaire intacte par des méthodes classiques d'électrophysiologie, différentes approches permettent cette caractérisation *ex-vivo* :



**Figure 10. Etudes *in vitro* de l'activité unitaire de RYR1 et effet du  $Ca^{2+}$  cytosolique**

- Schéma du dispositif de voltage-clamp après réincorporation de canaux dans une préparation de bicouche lipidique (50-200 μm de long). La bicouche sépare les milieux *cis* (côté cytosolique) et *trans* (côté luminal du RS) dont les compositions en électrolytes sont choisies par l'expérimentateur en fonction de ce qui est mesuré.
- Courant unitaire de RYR1s purifiés à partir de muscle squelettique de lapin et réincorporés en bicouche lipidique en présence de 50 mM de  $Ba^{2+}$  du côté *trans*. Les petits traits horizontaux à droite des signaux représentent l'état fermé du canal, les pointillés en gris représentent l'état ouvert. D'après Smith et al. (1986)
- Schéma de la mesure du flux de  $Ca^{2+}$  radiomarqué ( $^{45}Ca^{2+}$ ) à travers des vésicules de RS isolées de muscle squelettique.
- La dépendance de l'efflux de  $^{45}Ca^{2+}$  des vésicules de RS (isolées de muscle squelettique de lapin) aux variations de concentrations de  $Ca^{2+}$  cytosolique a la forme d'une courbe en cloche. D'après Meissner (1986)

- L'incorporation de canaux RYR en vésicules ou dans des bicouches lipidiques (surfaces planes qui séparent deux solutions) (Figure 10 A)
- La mesure du flux de  $\text{Ca}^{2+}$  radiomarqué à travers des vésicules isolées de RS (Figure 10C)

Les travaux menés sur RYR réincorporé en bicouche lipidique montrent que le canal possède une large conductance unitaire de 100 pS en présence de 53 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal (Ondrias et al. 1996) et de 170 pS en présence de 50 mM de  $\text{Ba}^{2+}$  luminal (Smith et al. 1985), soit environ dix fois la conductance unitaire de  $\text{Ca}_v1.1$  (Coronado et Affolter 1986) (Figure 10 B). De manière intéressante, RYR1 présente différents degrés d'ouverture ou états de sous-conductance (Lai et al. 1988; Buck et al. 1992) et il est très peu sélectif au  $\text{Ca}^{2+}$  par rapport aux autres cations mono- et divalents avec la sélectivité relative suivante :  $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ \approx \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ \text{ et } \text{Ba}^+ > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  (pour revue, voir Meissner 2017). De plus, le fait qu'il possède également une conductance significative pour la choline (26 pS) et le Tris (22 pS) témoigne de la largeur importante du pore (Smith et al. 1988). Par ailleurs, les propriétés d'ouverture du canal seraient très rapides (10 à 20 fois plus rapides que celles de  $\text{Ca}_v1.1$  ; Nagasaki et Kasai 1983; Affolter et Coronado 1985; Coronado et Affolter 1986; Meissner et al. 1986) et assurées par les résidus glycine des segments S6 (Gly4934 et Gly4941) de chaque monomère de RYR (Zalk et al. 2015).

A l'heure actuelle, la quasi-totalité des travaux sur les propriétés unitaires du RYR a été réalisée dans de simples conditions expérimentales qui ne reflètent pas la réalité physiologique de ces canaux et ne donnent qu'un aperçu très approximatif de leur activité. En effet, le milieu intracellulaire dans lequel opère un canal RYR est très élaboré et de nombreuses régulations endogènes viennent complexifier son environnement ce qui rend difficile sa reproduction *in vitro*. L'approche des vésicules de RS est intéressante car elle permet d'observer l'activité des canaux RYR dans leur membrane native, donc toujours étroitement associés à certains facteurs/protéines de régulation ; cependant, le contenu des vésicules n'est pas contrôlé et dépend de la préparation ce qui complique l'interprétation des résultats.

- **Méthodes d'étude *in vivo* et caractérisation du couplage EC**

L'alternative à la bicouche lipidique et aux vésicules de RS, largement utilisée aujourd'hui, est la mesure de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (cytosolique ou intra-RS) via l'utilisation d'indicateurs calciques optiques (en particulier fluorescents) sur fibre musculaire intacte en conditions ou non de potentiel contrôlé (voir par exemple Baylor et al. 1982; Palade et Vergara 1982; Kovács et al. 1983; Brum et al. 1988; Feldmeyer et al. 1990; Sárközi et al. 1996; Jacquemond 1997; Woods et al. 2005; Bellinger et al. 2009; Hollingworth et Baylor 2013; Braubach et al. 2014; Hernández-Ochoa et al. 2014; Manno et al. 2017), sur fibre pelée (voir par exemple Launikonis et al. 2009) ou sur fibre préalablement perméabilisée (Kirsch et al. 2001; Isaeva et al. 2005). Le développement de l'approche optique a constitué une étape

fondamentale pour la caractérisation des propriétés fonctionnelle du couplage EC (pour plus de détails, voir *section III.1. Flux de libération calcique*) car elle présente l'avantage de pouvoir étudier le comportement des canaux RYR en conditions physiologiques et pathologiques. Cependant, elle reste une mesure indirecte et ne rend pas compte de l'activité unitaire ni de l'étendue de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité de fonction dans la population globale des canaux RYR.

**Il est important de préciser que, dans ce manuscrit, le terme « *in vivo* » sera utilisé pour caractériser les études réalisées sur préparation cellulaire intacte, en opposition aux études réalisées « *in vitro* » sur préparation de canal isolé.**

#### 1.2.2.3. Libération de $\text{Ca}^{2+}$ et régulations

De nombreux travaux sur préparation de canal isolé ont permis d'identifier une grande variété de facteurs physiologiques, processus cellulaires et agents pharmacologiques (pour revues, voir Fleischer et Inui 1989; Fill et Copello 2002) qui serait impliquée dans la modulation de l'activité du RYR. Cependant, ces études *in vitro* nécessitent d'être confirmées en conditions physiologiques. Cette partie décrit les facteurs intracellulaires et pharmacologiques principaux suspectés intervenir (seulement des études *in vitro* disponibles) ou intervenant (données confirmées *in vivo*) dans la régulation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RYR.

- **Facteurs endogènes**

**Les ions  $\text{Ca}^{2+}$**  – représentent un important régulateur de l'activité canal du RYR et entretiennent avec lui une relation complexe : ils l'activent, l'inactivent et sont perméants à travers le pore.

**Le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique** : *In vitro*, en l'absence d'autres facteurs de régulation, la relation entre l'activité du canal et le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique a la forme d'une courbe en cloche (Figure 10 D). A faibles concentrations, le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique se fixe sur les sites de haute affinité et active le RYR (1-10  $\mu\text{M}$ ). A l'inverse à fortes concentrations, le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique se fixe sur les sites de faible affinité et inhibe le canal (1-10  $\text{mM}$ ) (Meissner et al. 1986; Meissner 1994; Meissner et al. 1997). Les trois isoformes du RYR sont activées par les mêmes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Par contre, RYR1 est presque complètement inhibé par 1  $\text{mM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique alors que RYR2 et RYR3 le sont par des niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  beaucoup plus élevés mais non physiologiques (2-10  $\text{mM}$ ) (Chu et al. 1993; Chen et al. 1997). Ces données indiquent que ces isoformes sont susceptibles d'être régulées par deux mécanismes différents.

L'effet de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique sur l'activité des canaux RYR fait l'objet de nombreuses études sur fibres musculaires intactes et sera caractérisé dans la *section III.1.2. Evènements calciques élémentaires*.

**Le Ca<sup>2+</sup> luminal** : semble également jouer un rôle dans la modulation de l'activité du RYR. A fortes concentrations, le Ca<sup>2+</sup> luminal augmente la probabilité d'ouverture du canal (Donoso et al. 1995) ainsi que sa sensibilité à certains agonistes cytosoliques (ex. : ATP et Mg<sup>2+</sup>) (Sitsapesan et Williams 1995; Györke et Györke 1998). En revanche, l'ensemble des données réalisées sur vésicules isolées de RS, concernant l'effet du Ca<sup>2+</sup> luminal sur l'activité du RYR, sont contradictoires ; sans doute en raison de la variabilité en contenu protéique des préparations. Il est donc fort probable qu'en conditions physiologiques, les effets du Ca<sup>2+</sup> luminal sur l'activité du canal soient en fait médiés par des protéines réticulaires (Györke et al. 2004). Il est également possible qu'une fois qu'il ait traversé le RYR, le Ca<sup>2+</sup> exerce un rétrocontrôle positif sur son activité en se fixant sur son site de régulation cytosolique (Tripathy et Meissner 1996).

**L'ATP et le Mg<sup>2+</sup> cytosoliques** – Le cytosol des cellules musculaires contient environ 300 µM d'ATP libre et 1 mM de Mg<sup>2+</sup> libre ; la majorité de l'ATP intracellulaire (~4 mM) étant sous sa forme liée au Mg<sup>2+</sup> (Mg-ATP). L'action antagoniste de ces deux agents physiologiques sur l'activité unitaire des canaux RYR a été largement étudiée, notamment sur bicouche lipidique.

L'ATP a ses propres sites de fixation sur le RYR (Des Georges et al. 2016) et il est un puissant activateur de son ouverture *in vitro* à des concentrations de l'ordre de 1 mM (Smith et al. 1985; Copello et al. 2002). La réalité physiologique de cette régulation reste cependant très peu documentée car il est difficile de contrôler les concentrations intracellulaires d'ATP libre et de définir si l'activité du RYR est régulée par la forme libre ou complexée de l'ATP. Par exemple, l'augmentation de Mg<sup>2+</sup> intracellulaire entraîne à la fois la formation du complexe Mg-ATP et la diminution de la concentration d'ATP libre.

Le Mg<sup>2+</sup> (1 mM) inhibe le canal *in vitro* par compétition avec le Ca<sup>2+</sup>. Lorsqu'il se fixe sur ses sites de haute affinité, il diminue la sensibilité du canal pour le Ca<sup>2+</sup>. Tandis que, lorsqu'il se fixe sur ses sites de faible affinité, il diminue la probabilité d'ouverture du canal (Copello et al. 2002). De manière intéressante, les travaux de Lamb et Stephenson (1991) sur fibres pelées montrent que la diminution de la concentration de Mg<sup>2+</sup> intracellulaire (de 1 mM à 0.05 mM) induit la libération spontanée de Ca<sup>2+</sup> par le RS. Cet effet du Mg<sup>2+</sup> sur l'inhibition de l'activité des canaux RYR a été confirmé sur fibres musculaires squelettiques intactes grâce à la mesure du Ca<sup>2+</sup> libéré en conditions de potentiel-imposé (Jacquemond et Schneider 1992). En effet, les résultats montrent que de faibles niveaux de Mg<sup>2+</sup> intracellulaire (< 0.14 mM) permettent de potentialiser l'efficacité du couplage EC.

- **Processus cellulaires**

**Phosphorylation/Déphosphorylation** – Chaque sous-unité du RYR1 contient 15 sites de phosphorylation (35 par sous unité de RYR2) (Takeshima et al. 1989). De ce fait, les canaux RYR1 sont

la cible de nombreuses kinases, dont la PKA (pour protéine kinase AMPc-dépendante) et la CaMKII (pour Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline-dépendant protéine kinase II), ainsi que de nombreuses phosphatases.

L'importance de l'état de phosphorylation du RYR dans la modulation de la libération de Ca<sup>2+</sup> a d'abord été établie dans le cœur (Takasago et al. 1989) puis dans le muscle squelettique (Igami et al. 1999) grâce à des mesures réalisées sur vésicules de RS. L'augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux calciques du RS induite par leur phosphorylation *in vivo* serait impliquée dans certaines conditions pathologiques. En effet, l'insuffisance cardiaque est associée à l'hyperphosphorylation des RYR de type 1 et 2 (sur les Ser2843 et 2809, respectivement) ce qui conduit à leur dissociation de FKBP12 (pour plus de détails, voir section II.1.4. *Protéines associées*) et donc à l'augmentation de leur activité spontanée (« RYRs fuiteux ») probablement à l'origine des dysfonctionnements cardiaques et musculaires qui en résultent (Marx et al. 2000; Reiken et al. 2003).

**Oxydoréduction et nitrosylation** - Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives nitriques (RNS) sont continuellement synthétisées par le muscle et plus particulièrement au cours d'un exercice (pour revue Reid 1998; Silveira et al. 2003). Au repos, la cellule parvient à maintenir un environnement réducteur à l'aide de composantes réductrices des thiols comme le glutathion.

Le RYR est hautement sensible aux agents d'oxydoréduction (ou redox) car sa portion cytoplasmique est riche en cystéine (~100 résidus par monomère; Takeshima et al. 1989), résidus susceptibles d'être oxydés, nitrosylés ou glutathionylés sur leurs groupements thiols.

Dans des systèmes de bicouche lipidique, à pO<sub>2</sub> tissulaire (~10 mmHg), la S-nitrosylation de RYR1 par le NO augmente son activité de manière réversible. En revanche, dans des conditions de stress oxydants (pO<sub>2</sub> ~150 mmHg), l'oxydation plus importante du RYR conduit l'inactivation irréversible du canal (Sun et al. 2001). Les études sur vésicules de RS montrent que le statut redox est un modulateur des propriétés unitaires du RYR1 via son interaction avec certaines molécules régulatrices telles que la calmoduline (Eu et al. 2000) ou FKBP12 (Aracena et al. 2005) (et pour plus de détails, voir section II.1.4. *Protéines associées*).

Les mécanismes physiologiques de régulation de l'activité de RYR1 et donc de l'homéostasie calcique par le NO ont été étudiés dans la fibre musculaire intacte et révèlent qu'en excès, le NO active RYR1 en modifiant son état redox et maintient ainsi le canal ouvert (Pouvreau et al. 2004). La S-nitrosylation du RYR1 a aussi été détectée chez les souris *mdx*, un modèle de la dystrophie de Duchenne. Cette S-nitrosylation provoquerait une déplétion de la protéine FKBP12 à l'origine d'une augmentation de l'activité spontanée du RYR et donc d'une fuite de Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol (« RYRs fuiteux »). Le traitement des souris *in vivo* avec une petite molécule, nommée « S107 », permettrait de stabiliser l'interaction FKBP12/RYR hyper-S-nitrosylé et ainsi de retrouver la force générée par les souris sauvages (Bellinger et al. 2009).

Récemment, une étude a identifié que les RYR2s neuronaux de souris Alzheimer étaient hyperphosphorylés et hypernitrosylés et donc suractivés. Ces modifications post-traductionnelles des RYR2s hippocampiques seraient à l'origine des altérations de signalisation  $Ca^{2+}$  impliquées dans la perte de mémoire des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Lacampagne et al. 2017).

- **Pharmacologie**

Le RYR est la cible d'agents pharmacologiques permettant d'étudier son activité *in vitro* et *in vivo*.

**La ryanodine** a été découverte en raison des contractures irréversibles des muscles squelettiques et cardiaque qu'elle entraîne (Jenden et Fairhurst 1969). C'est un petit alcaloïde végétal de haute affinité pour le RYR qui a permis sa purification initiale (Rogers et al. 1948; Campbell et al. 1987). De nombreuses études menées *in vitro* sur vésicules de RS ou bicouches lipidiques montrent que la ryanodine a un effet dose-dépendant complexe sur l'activité canal du RYR:

- A faible concentration ( $\sim 10$  nM), la ryanodine augmente la fréquence d'ouverture du canal RYR et n'a pas d'effet sur sa conductance (Buck et al. 1992).
- A des concentrations intermédiaires (1-10  $\mu$ M), la ryanodine bloque le canal dans un état de sous-conductance (1/2 de la conductance maximale) associé à des temps d'ouverture plus longs, à une fuite de  $Ca^{2+}$  et à la vidange du RS (pour revue, voir Fill et Copello 2002).
- A forte concentration ( $> 50$   $\mu$ M), le canal est bloqué en configuration fermée (Zimányi et al. 1992).

La complexité de cette régulation est probablement liée à la présence de deux sites de fixation sur le RYR : l'un de faible affinité ( $K_D > 1$   $\mu$ M), l'autre de haute affinité ( $K_D = 10$  nM) (Wang et al. 1993). De manière intéressante, la fixation de la ryanodine sur les sites de haute affinité ne serait possible que lorsque le RYR est ouvert. Cette interaction préférentielle, entre ryanodine et canaux RYR activés, est une propriété dont les conséquences fonctionnelles sur la signalisation calcique ont été caractérisées *in vivo* par Collet et Jacquemond (2002).

**La caféine**, extrait bien connu de la graine de café, est une triméthylxanthine (pour revue, voir Herrmann-Frank et al. 1998). A faibles concentrations *in vitro* (0.5-2 mM), la caféine entraîne une augmentation de la sensibilité du RYR au  $Ca^{2+}$  et donc augmente sa probabilité d'ouverture. Lorsqu'elle est présente à fortes concentrations *in vitro* (5-10mM), le RYR devient hypersensible au  $Ca^{2+}$  (quelques pM) et sa durée d'ouverture est augmentée (Rousseau et al. 1988). De manière intéressante, les canaux activés par la caféine conservent leur sensibilité aux autres agents agonistes ou antagonistes tels que la ryanodine, l'ATP ou le  $Mg^{2+}$  (pour revue, voir Ogawa et al. 1999). *In vivo*, la caféine induit la

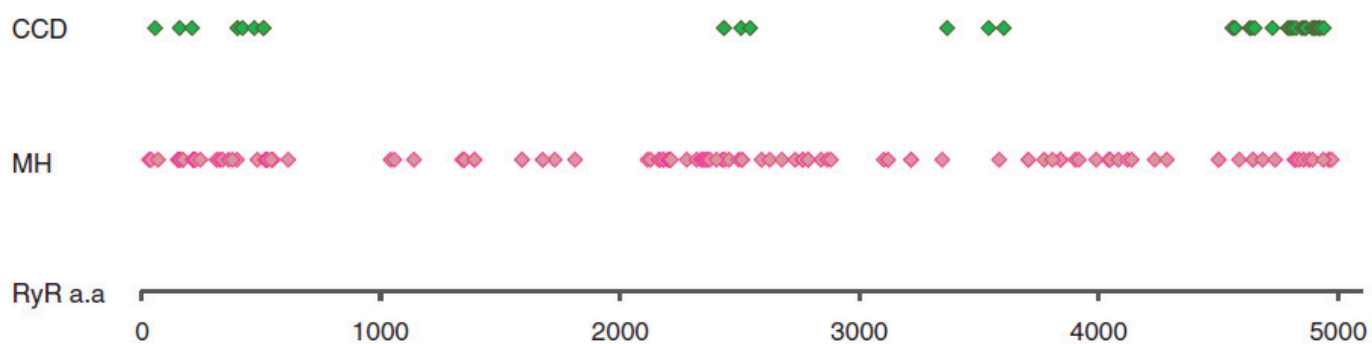


contraction des fibres musculaires (Koshita et Oba 1989) et diminue la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS (Sorenson et al. 1986).

**Le 4-chloro-m-crésol (4-CmC)** est un dérivé chloré du crésol, composé organique appartenant à la famille des méthylphénols. Comme la ryanodine et la caféine, le 4-CmC (50-500  $\mu\text{M}$ ) est un agoniste du RYR qui est à l'origine de son ouverture *in vitro* et de la contracture des fibres musculaires squelettiques (Herrmann-Frank et al. 1996). De plus, il présente l'avantage d'être seulement activateur de ces canaux, ses effets sont rapides et réversibles *in vivo* (voir par exemple, Allard et al. 2006). Et contrairement à la caféine, il n'a pas d'effet sur la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  (Westerblad et al. 1998). Toutes ces propriétés font du 4-CmC un agent pharmacologique idéal pour dépléter le RS de fibres musculaires perméabilisées et ainsi déterminer les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire (Ziman et al. 2010).

**Le dantrolène** est un dérivé de l'hydantoïne qui agit comme myorelaxant. A ce jour, son site d'action n'est pas clairement identifié. Szentesi et al. (2001) ont montré que la présence de dantrolène n'altère pas les propriétés unitaires du RYR1 *in vitro* mais que son application extracellulaire (0.5-50  $\mu\text{M}$ ) *in vivo* diminue de manière dose-dépendante la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la dépolarisation. De plus, les études réalisées sur vésicules de RS – dans lesquelles d'autres protéines réticulaires que le RYR sont également présentes – confirment l'effet inhibiteur du dantrolène sur la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  (Paul-Pletzer et al. 2002). Ces résultats suggèrent que l'effet du dantrolène s'effectuerait de manière indirecte via sa liaison à une autre cible moléculaire que le RYR1 lui-même (Szentesi et al. 2001). Plus récemment, les travaux de Choi et al. (2017) sur fibre musculaire pelée suggèrent que le dantrolène diminuerait l'activité du RYR1 en augmentant son affinité pour le  $\text{Mg}^{2+}$ .

**Le rouge de ruthénium** est un colorant de synthèse polycationique dont la structure contient trois atomes de ruthénium et inclue quatorze groupes aminés. C'est un des inhibiteurs les plus puissants de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS *in vitro* via sa fixation au niveau du segment S6 du RYR (Chen et MacLennan 1994). Par contre, dans les fibres musculaires squelettiques de grenouille, des concentrations de plus de 20  $\mu\text{M}$  sont nécessaires à son action inhibitrice sur la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  en raison de sa fixation non spécifique à des protéines cytoplasmiques (pour revue, voir Zucchi et Ronca-Testoni 1997; Xu et al. 1999). Le manque de spécificité du rouge de ruthénium pour le RYR explique qu'il ne soit pas utilisé comme outil pharmacologique *in vivo*.



**Figure 11. Position des mutations du gène *ryr1* associées à l'hyperthermie maligne (MH) et à la myopathie à cores centraux (CCD)**

La majorité de ces mutations est localisée entre les résidus C35 et R614 dans le domaine N-terminal, entre D2129 et R2458 dans la région centrale et entre I3916 et G4942 dans l'extrémité C-terminale de la protéine RYR1. On comptait déjà en 2010 151 mutations responsables de la MH et 63 pour la CCD.

D'après Lanner et al. (2010)

#### 1.2.2.4. Pathologies associées

Chez l'Homme, près de 300 mutations du gène *ryr1* sont responsables de pathologies chez l'Homme telles que l'hyperthermie maligne (HM) et la myopathie à cores centraux (MCC) (pour revues, voir Robinson et al. 2006 ; Lanner et al. 2010) (Figure 11). Cette partie décrit très brièvement ces deux myopathies associées à des anomalies structurales et/ou fonctionnelles du muscle strié squelettique mais n'entre pas dans les détails de l'ensemble des mécanismes impliqués.

- **L'hyperthermie maligne (MH)**

Evoquée précédemment dans le cadre des pathologies associées à  $Ca_v1.1$ , l'hyperthermie maligne (MH) a d'abord été identifiée chez le porc (pour revue, voir Mitchell et Heffron 1982). Le syndrome du stress porcin (SSP) se manifeste par une mortalité subite dans des conditions de stress intense chez les animaux porteurs d'une mutation ponctuelle au niveau du gène codant pour RYR1 (R615C; Fujii et al. 1991).

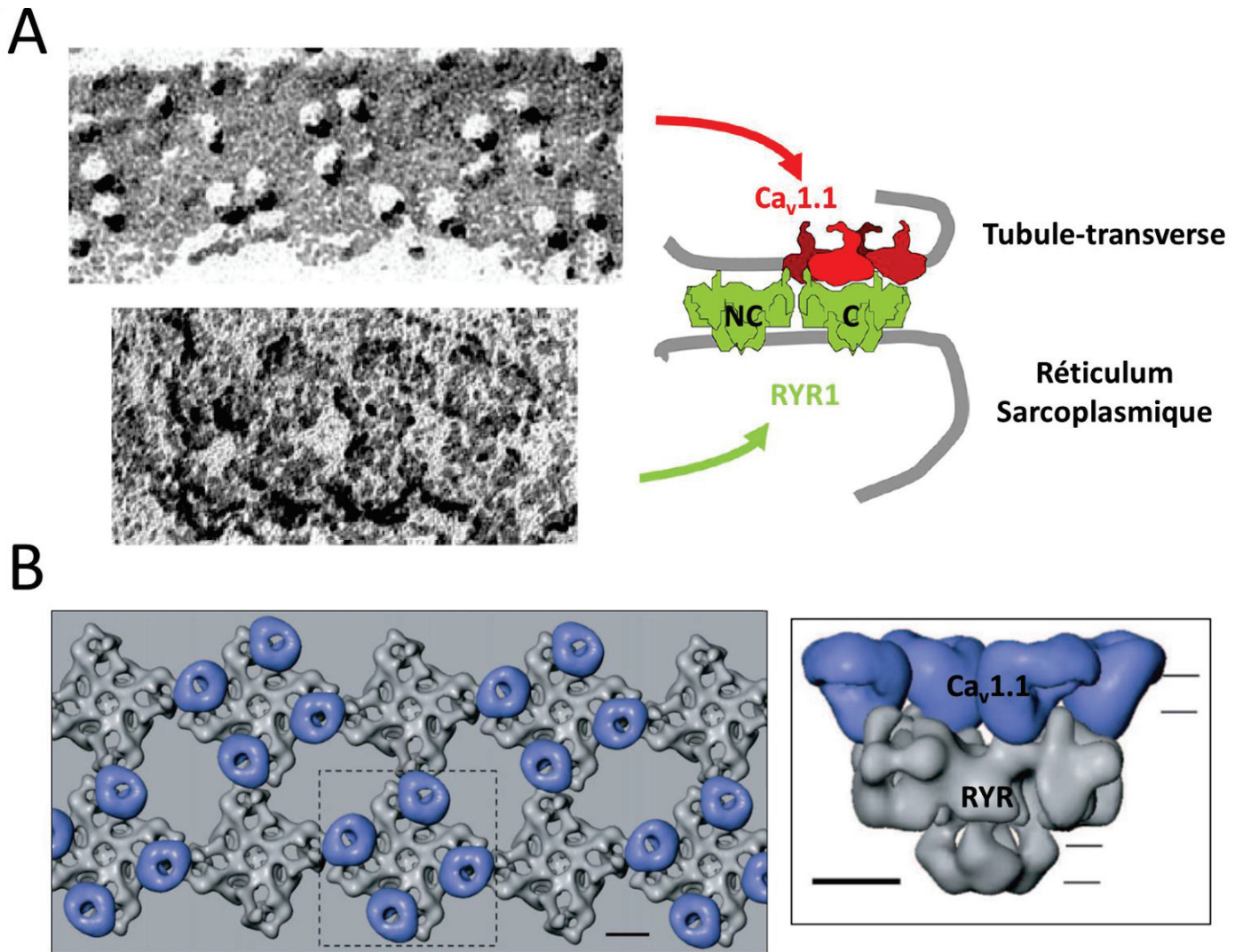
Chez l'Homme, la MH se caractérise par de la fièvre et une rigidité musculaire squelettique potentiellement létales induites par l'exposition à certains anesthésiques volatiles tels que l'halothane (pour revues, voir Rosenberg et al. 1993, 2015). Parmi la trentaine de mutations et la centaine de variants identifiées comme responsables de la pathologie, 70% touche le gène *ryr1* (Sambuughin et al. 2005).

Chez les souris transgéniques porteuses d'une mutation humaine de type MH sur *ryr1*, de nombreuses conditions environnementales peuvent accélérer la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS tels que la chaleur, le stress et l'exercice (Chelu et al. 2005; Yang et al. 2006; Durham et al. 2008). Cette hypersensibilité des canaux RYR1 à l'environnement est médiée par la production anormalement élevée de ROS et de RNS par le muscle dans ces conditions (voir par exemple, Durham et al. 2008).

L'halothane (~0.5 mM), la caféine (1-30 mM) et le 4-CmC (0.15-1 mM) sont utilisés en routine pour le diagnostic de l'HM sur biopsies musculaires de patient (Hermann-Frank et al. 1996; Sudo et al. 2010), car les mutations du gène *ryr1* à l'origine de la pathologie entraînent également une augmentation de la sensibilité des canaux à ces trois composés (Tong et al. 1997; Censier et al. 1998; Chelu et al. 2005). A l'heure actuelle, le dantrolène est le seul agent clinique disponible pour le traitement spécifique de l'hyperthermie maligne (pour revue, voir Krause et al. 2004)

- **La myopathie à cores centraux (CCD)**

La myopathie à cores centraux (CCD) est également une maladie autosomique dominante qui doit son nom à la présence de cores au centre des fibres musculaires. Un core est une petite zone de désorganisation de l'appareil contractile (Hayashi et al. 1989) et de diminution de l'activité oxydative



**Figure 12. Interaction  $Ca_v1.1$ -RYR1**

- A.** La photo du haut est un cliché de cryo-EM de la membrane tubulaire-transverse de crapaud. La photo du bas est un cliché de microscopie électronique à transmission (ombrage rotatif) – présenté avec la même orientation et le même grossissement que la photo du dessus – permettant d’observer les reliefs (pieds jonctionnels) présents à la surface de la membrane du RS jonctionnel de la fibre musculaire de cobaye. Le schéma (à gauche) représente un RYR1 couplé (vert, C) et un RYR1 non couplé (vert, NC) à  $Ca_v1.1$  (rouge). D’après Ríos et al. (2019)
- B.** Représentation de la modélisation physique du couplage  $Ca_v1.1$ -RYR1 dans le muscle squelettique. L’image de gauche montre les deux rangées de RYR (en gris) dans lesquelles un canal sur deux est superposé à une tétrade de  $Ca_v1.1$  (en bleu). L’image de droite montre l’interaction entre une tétrade de  $Ca_v1.1$  et un RYR1 vue de côté ; les lignes horizontales indiquent la position des membranes du RS (en haut) et du tubule transverse (en bas). D’après Serysheva (2004)

cellulaire en rapport avec la disparition des mitochondries (Dubowitz et Pearse 1960; Dubowitz et Roy 1970). La pathologie se caractérise par une hypotonie musculaire à la naissance s'accompagnant d'un retard de développement neurologique (pour revue, voir Jungbluth 2007). Dans près de 50 % des cas, la CCD est associée à une mutation faux sens du gène *ryr1*, dont certaines sont communes à la MH et/ou présentent un risque de MH. Le lien entre le RYR1 et la présence de cores n'est pas connu pour l'instant. Cependant, la désorganisation de l'appareil contractile et l'altération de la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS – observée dans le muscle squelettique de souris exprimant une des formes mutées CCD du RYR1 (Lefebvre et al. 2011; Loy et al. 2011; Lefebvre et al. 2013) – semblent être impliqués dans la faiblesse musculaire observée chez les patients CCD.

### 1.3. $Ca_v1.1$ -RYR1 : interaction moléculaire et fonctionnelle

Le couplage EC est un mécanisme qui permet la transduction de la dépolarisation membranaire de surface en libération de  $Ca^{2+}$  par le RS. La communication entre les membranes externe et interne est possible grâce à l'interaction entre  $Ca_v1.1$  et RYR1. C'est l'extrême proximité des deux molécules au niveau des jonctions triadiques (10 nm) qui rend possible cette interaction.

Dans la fibre musculaire striée squelettique, l'association entre les tétrades de  $Ca_v1.1$  et les pieds jonctionnels du RS observée en microscopie électronique a constitué le premier indice de l'interaction physique entre les acteurs du couplage EC localisés dans les membranes tubulaire et réticulaire jonctionnelle (Block et al. 1988). Au sein d'une tétrade, chaque molécule de  $Ca_v1.1$  se retrouve directement au contact de l'une des quatre sous-unités du RYR1 auquel il fait face (Block 1988; Paolini et al. 2004). C'est cette interaction protéine/protéine unique qui permet le couplage direct entre potentiel membranaire du tubule-T et libération d'ions  $Ca^{2+}$  (pour plus de détails, voir *section III.1.1.1. Transitoires calciques voltage-dépendants*). De manière surprenante, seul un RYR1 sur deux est couplé à une tétrade (Block 1988; Paolini et al. 2004). Le rôle structural et fonctionnel que joue cette alternance de couplage entre  $Ca_v1.1$ s et RYR1s n'a pas encore été clairement identifié. Les hypothèses initiales suggéraient l'activation des RYR1s non couplés via le processus de  *$Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release* (CICR) par lequel le  $Ca^{2+}$  libéré par les RYR1s couplés activerait les RYR1s non couplés (pour plus de détails, voir *section III.1.1.2. Flux de libération calcique*) (pour revue, voir Endo 2009). Cependant d'autres hypothèses supposent que l'ouverture des RYR1s non couplés s'effectuerait par interactions allostériques entre RYR1s adjacents via des protéines régulatrices telle que FKBP12 (Marx et al. 1998). De manière importante, un travail récent de Ríos et al. (2019) suggère que l'organisation stricte en damier des protéines  $Ca_v1.1$  et RYR1 est liée uniquement à des interactions entre ces deux partenaires : l'alternance de RYR1s couplés et non couplés résulterait d'un encombrement stérique empêchant deux monomères contigus de  $Ca_v1.1$  de se lier sur des tétramères adjacents (Figure 12).

Les résultats obtenus à partir de préparations musculaires issues des souris dyspédiques et dysgénésiques – respectivement porteuses de mutation invalidante pour le RYR1 et pour  $Ca_v1.1$  – ont été déterminants pour l'étude des rôles structuraux et fonctionnels de ces deux protéines et plus généralement pour la compréhension du couplage EC.

En ce qui concerne  $Ca_v1.1$ , deux composants principaux ont été identifiés comme impliqués dans sa communication avec RYR1 : la grande boucle connectant les domaines II et III de la sous-unité  $\alpha_{1s}$  (Tanabe et al. 1988; Tanabe et al. 1990 ; García et al. 1994; Lu et al. 1994; Nakai et al. 1998) et la queue C-terminale de la sous-unité auxiliaire  $\beta_{1a}$  (Beurg et al. 1999; Sheridan et al. 2004). Par ailleurs, d'autres sites de  $Ca_v1.1$  ont été suggéré contribuer à l'activation de RYR1 (Ahern et al. 2001).

En ce qui concerne RYR1, les régions impliquées dans son interaction avec  $Ca_v1.1$  n'ont pas encore été clairement identifiées. Cependant, des études proposent la séquence dite « divergente » – située entre les domaines SPRY2 et 3 (pour *SplA kinase and ryanodine receptor*) de RYR1 (résidus 1085-1112) (Figure 9) – comme un élément important de sa communication avec  $Ca_v1.1$  de par sa capacité à interagir avec la boucle II-III de  $\alpha_{1s}$  (Perez et al. 2003; Sheridan et al. 2004; Cui et al. 2009). Cependant, l'affinité de cette interaction est faible et son implication dans le couplage EC n'est pas encore unanimement admise.

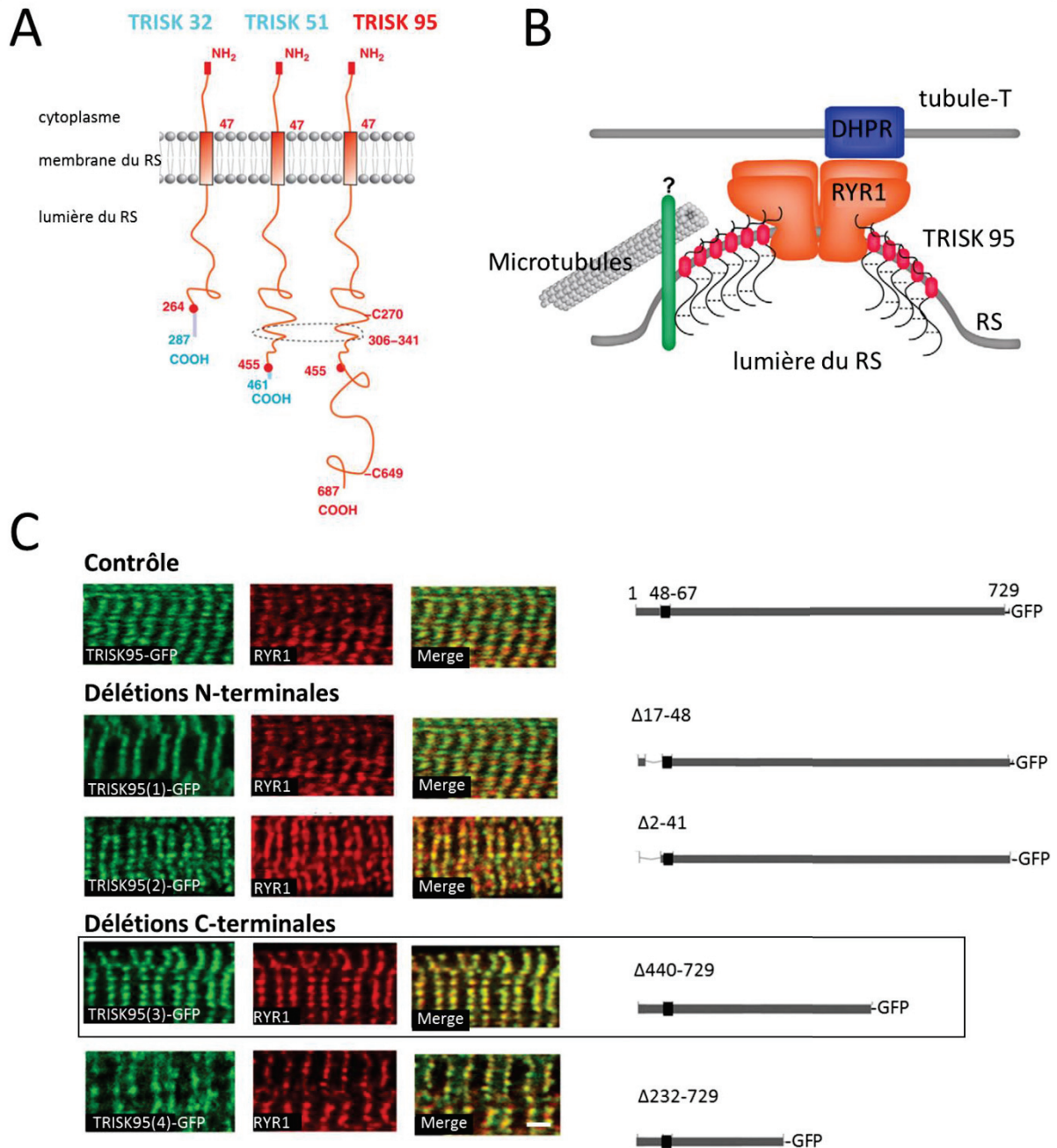
L'interaction entre  $Ca_v1.1$  et RYR1 est directe et réciproque, ce qui signifie qu'en plus d'être activé par  $Ca_v1.1$  (couplage « orthograde »), RYR1 lui transmet également un signal activateur (couplage « rétrograde »). En effet, la densité de courant de type L, quasiment nulle dans les myotubes dyspédiques, retrouve des valeurs normales lorsque le RYR1 y est exprimé (Nakai et al. 1996; Fleig et al. 1996). En augmentant à la fois le niveau d'expression et la conductance unitaire de  $Ca_v1.1$ , RYR1 jouerait un rôle analogue aux sous-unités accessoires du DHPR dans la modulation allostérique de  $Ca_v1.1$  (Avila et Dirksen 2000). C'est le domaine central (720-765) de la boucle II-III de  $Ca_v1.1$  qui est la région cible impliquée dans ce couplage bi-directionnel (Grabner et al. 1999).

#### 1.4. Protéines associées

Bien qu'il soit établi que le DHPR et le RYR sont les deux éléments clés du couplage EC, de nombreuses autres protéines sont organisées autour de ces deux canaux pour former avec eux un complexe macromoléculaire appelé le « complexe de libération de  $Ca^{2+}$  » (Figure 15).

- **Les principaux acteurs moléculaires du complexe de libération de  $Ca^{2+}$**

Les trois protéines principalement impliquées dans le complexe de libération de  $Ca^{2+}$  sont la triadine, la junctine et la calséquestrine dont l'arrangement triadique extrêmement organisé doit être maintenu



**Figure 13. Isoformes de TRISK et portion de TRISK 95 nécessaire à la bonne morphologie des triades**

- A.** Structures schématiques des trois principales isoformes de la triadine de rat (TRISK 32, TRISK 51 et TRISK 95) dans la membrane du RS qui ne diffèrent que par la longueur de leur extrémité C-terminale luminale. Les structures communes sont représentées en rouge et les portions spécifiques de chaque isoforme sont représentées dans une couleur différente. Le domaine « coil-coiled » (résidus 306-341) est délimité par des pointillées. D'après Marty (2015)
- B.** Représentation schématique de TRISK 95 dans la membrane du RS de la fibre musculaire squelettique. D'après Fourest-Lieuvin et al. (2012)
- C.** Myoblastes primaires de rat en culture transfectés avec des vecteurs d'expression codant pour la triadine-GFP (TRISK 95, contrôle), les mutants triadine-GFP délétés en N-terminal ( $\Delta$ 17-48 et  $\Delta$ 2-41) ou en C-terminal ( $\Delta$ 440-729 et  $\Delta$  232-729) et co-marqués avec un anticorps anti-RYR1. En comparaison au contrôle, seule l'expression de TRISK95(3) (délétion  $\Delta$ 440-729) n'entraîne pas de modification du profil d'expression de RYR1 suggérant que les résidus 1 à 439 de TRISK95 sont nécessaires à la bonne morphologie des triades. (Barre d'échelle 2  $\mu$ m)  
Modifié d'après Rossi et al. (2014)

en une structure spécifique indispensable à l'efficacité du couplage EC ; et ceci malgré les déformations cellulaires induite à chaque cycle contractile.

**La triadine** correspond à une famille de protéines composée de différentes isoformes qui sont obtenues par épissage alternatif du seul et même gène *trdn* (Thevenon et al. 2003). Les triadines sont des protéines transmembranaires du RS qui diffèrent seulement par la longueur de leur unique segment C-terminal luminal (Figure 13 A, B). Il a été montré que le muscle de rat compte au moins trois isoformes appelés TRISK 95 (729 résidus), TRISK 51 (461 résidus) et TRISK 32 (287 résidus) en fonction de leur poids moléculaire (en kDa) (Marty et al. 2000; Vassilopoulos et al. 2005).

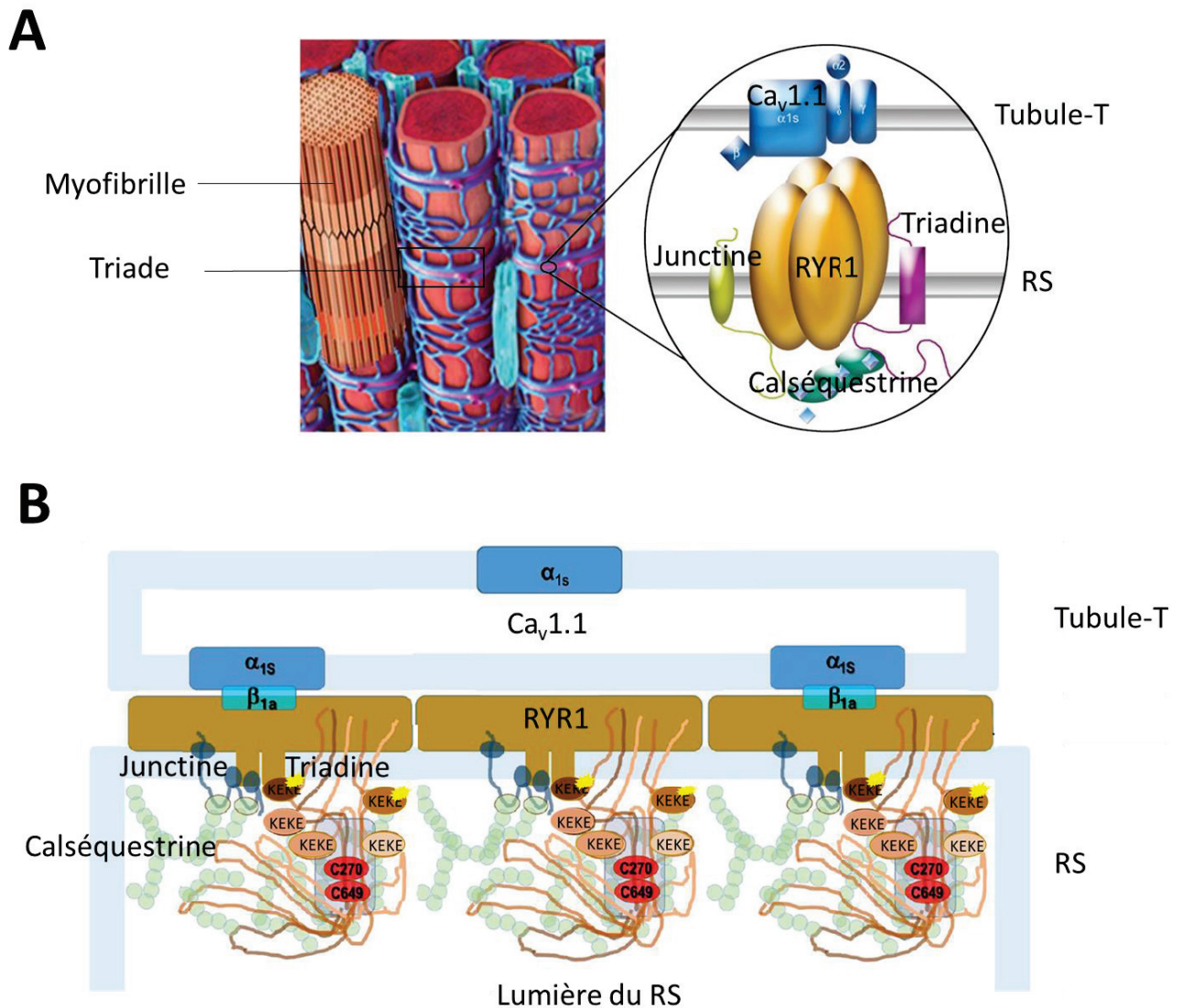
TRISK 32 est l'isoforme cardiaque majoritaire présente sur toute la membrane du RS (jonctionnelle et longitudinale) (pour revue, voir Marty 2015).

TRISK 95 et 51 sont les isoformes principales et spécifiques du muscle strié squelettique et font partie intégrante du complexe de libération de  $Ca^{2+}$ . Leur domaine N-terminal interagit avec la portion cytoplasmique de RYR1 (pour revue, voir Dulhunty et al. 2017). Leur région C-terminale luminale est enrichie en résidus lysine (K) et glutamate (E) (« motif KEKE », résidus 210-224) hautement chargés (Realini et al. 1994) qui permettent leur interaction avec RYR1 et avec la calséquestrine (Lee et al. 2004; Kobayashi et al. 2000). Par ailleurs, deux régions de TRISK95 sont indispensables à sa stabilisation à la triade des muscles striés squelettiques : il s'agit d'une part, des résidus cystéine (270 et 649) qui permettent la formation de ponts disulfures et donc l'oligomérisation de la protéine et d'autre part, du domaine « coiled-coil » (résidus 306-341). L'identification de ces deux régions lumineuses d'intérêt a permis de mettre en évidence la portion nécessaire et suffisante à l'ancrage de la triadine dans la membrane jonctionnelle du RS (Fourest-Lieuvin et al. 2012; Rossi et al. 2014b) (Figure 13 C). **Cette capacité d'adressage exclusif au RS jonctionnel d'une portion de la triadine constitue une propriété particulièrement intéressante que j'ai largement exploitée durant ma thèse (voir sections Synthèse et problématique ; et Matériels et méthodes).**

Il a également été identifié que, grâce à son association luminale à de petites protéines associées aux microtubules, TRISK 95 fait le lien entre les triades et le cytosquelette (Klopfenstein et al. 2001; Park et al. 2010; Osseni et al. 2016).

Les deux modèles de souris triadine-KO qui ont été générés sont viables et fertiles et ne présentent pas de phénotype marqué délétère. En revanche, ils présentent des déficits subtils de structure et de fonction (Shen et al. 2007; Oddoux et al. 2009). Plus spécifiquement, les muscles de ces souris sont caractérisés par la présence de triades mal-orientées (30 % longitudinales ou obliques au lieu de transverses). En réponse à une stimulation, les muscles présentent un déficit modeste de force, associé à une réduction de l'amplitude de la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS. Chez l'Homme, les mutations sur le





**Figure 14. Les principaux acteurs du complexe de libération de  $\text{Ca}^{2+}$**

- A.** Représentation schématique de l'interaction entre les principaux partenaires du complexe de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à la triade des fibres musculaires squelettiques. Parmi eux, les deux partenaires majoritaires de ce complexe sont le  $\text{Ca}_v1.1$  (en bleu) et le RYR1 (en jaune). Trois protéines du RS sont également représentées : la triadine (membranaire, en rose), la junctine (membranaire, en jaune) et la calséquestrine (luminale, en vert). Les carrés bleus représentent le  $\text{Ca}^{2+}$ . Modifié d'après Marty et Fauré (2016)
- B.** Modèle schématique de l'arrangement de la triadine, de la junctine et de la calséquestrine à la jonction triadique. Les polymères de triadine (5 monomères, en nuances de marron) sont formés grâce à la formation de ponts disulfures entre les résidus cystéines C270 et C469 (ovales rouges). Chaque polymère de triadine possède un seul site de liaison (ovale marron avec une étoile jaune) pour le RYR1 et pour la calséquestrine (cercles verts) via ses motifs KEKE. Un monomère de junctine est représenté (traits bleus) avec deux sites de liaison luminale et un site de liaison cytoplasmique à RYR1 (cercles bleus). L'interaction entre la junctine et la calséquestrine s'effectue au niveau de deux sites (ovales verts). Modifié d'après Dulhunty et al. (2017)

gène *trdn*, menant à l'absence de la protéine, sont responsables de sévères arythmies cardiaques associées à des situations de mort subite (Roux-Buisson et al. 2012).

L'ensemble des données fonctionnelles concernant le rôle de la triadine n'est cependant pas intuitivement cohérent. En effet, de manière surprenante, la surexpression de TRISK 95 induit un déficit du couplage EC dans les myotubes de rat (Rezgui et al. 2005) alors que l'étude en bicouche lipidique de canaux RYR1 purifiés montre une augmentation de l'activité du canal en présence de TRISK 95 (Wei et al. 2009). Par ailleurs, la surexpression de la triadine potentialise le couplage EC et augmente les prédispositions aux arythmies dans les cardiomyocytes de rat (Terentyev et al. 2005; Rezgui et al. 2005).

En résumé, la triadine est une protéine d'interaction avec le RYR qui paraît importante pour la morphologie des triades ainsi que pour l'efficacité optimale du couplage EC sans pour autant être critique à sa fonction.

**La junctine** est un variant non catalytique d'épissage du gène *asph* (pour aspartate- $\beta$ -hydroxylase) inséré dans la membrane du RS des muscles squelettiques et cardiaque. Cette petite protéine de 26 kDa n'a pas fait le sujet d'autant d'études que la triadine et de nombreux doutes persistent encore quant à ses sites d'interaction et son implication dans le couplage EC. De récents travaux de co-immunoprécipitation ont identifié des interactions entre les portions C-terminale cytosolique et N-terminale luminale (motifs KEKE) de la junctine avec respectivement les portions cytosolique et luminale de RYR1 et RYR2 (Li et al. 2015). De plus, tout comme la triadine (Guo et Campbell 1995) avec qui elle interagit directement (Zhang et al. 1997), la junctine se fixerait à la calséquestrine et permettrait ainsi son ancrage à la membrane du RS (Mitchell et al. 1988) (Figure 14). La surexpression de la junctine dans les cardiomyocytes de souris entraîne une altération de localisation de la calséquestrine couplée à des anomalies de contractilité ainsi qu'une augmentation de l'association tubule-T/citernes terminales de RS de 10% (Zhang et al. 2001). L'ensemble de ces données indiquent que la junctine, notamment de par ses nombreuses interactions avec les protéines du RS, joue un rôle important dans la structure du complexe de libération de  $Ca^{2+}$  et donc dans son efficacité et mériterait d'être davantage étudiée.

**La calséquestrine** est la protéine principale de liaison au  $Ca^{2+}$  dans le RS (Figure 14); elle peut fixer ou libérer des ions  $Ca^{2+}$  à chaque cycle de contraction/relaxation. Dans le muscle squelettique, elle est présente sous deux isoformes codées par les gènes *casq1* et *casq2*. La calséquestrine 1 (CASQ1) est l'isoforme exprimée dans les fibres à contraction rapide tandis que la calséquestrine 2 (CASQ2) est retrouvée dans les fibres à contraction lente ainsi que dans les cardiomyocytes (Fliegel et al. 1990; Scott et al. 1988). Un monomère de calséquestrine contient 400 résidus (40 kDa) regroupés en trois

domaines identiques (Wang et al. 1998). Les études de microscopie électronique montrent que des agrégats de calséquestrine sont présents dans les régions riches en RYRs (Franzini-Armstrong et al. 1987; Nori et al. 2006).

CASQ1 et RYR1 sont présumés interagir, cependant la nature de l'interaction entre ces deux protéines ainsi que son impact sur le couplage EC restent sujets à controverse. Alors que certaines études dans des systèmes reconstitués en bicouche lipidique montrent que CASQ1 active l'ouverture des RYR1s (Ohkura et al. 1995; Kasai et Ide 1996; Szegedi et al. 1999), une étude suggère au contraire que sa présence inhiberait le canal (Beard et al. 2002). Par ailleurs, des études réalisées *in vitro* suggèrent que l'effet de CASQ1 sur l'activité du RYR1 serait  $Ca^{2+}$ -dépendante et notamment médiée par son interaction avec la triadine, via son domaine riche en asparagine (résidus 354-367) qui est aussi le motif principal de sa liaison au  $Ca^{2+}$  (Shin et al. 2000). De plus, les expériences réalisées sur l'isoforme cardiaque indiquent que la triadine et la junctine semblent être les médiateurs indispensables à l'interaction de la calséquestrine avec le RYR (Györke et al. 2004).

Afin d'identifier plus précisément le rôle de la calséquestrine dans le couplage EC, un modèle de souris invalidées pour le gène *casq1*, viables et fertiles a été généré en 2007 (Paolini et al. 2007). Les muscles squelettiques des souris CASQ1-KO présentent une altération de structure des triades avec notamment des empilements de domaines membranaires jonctionnels, une diminution du volume des citernes terminales de RS ainsi qu'une augmentation de la densité de RYR1s et du nombre de mitochondries. Lors de stimulations électriques répétées, la diminution accélérée de la concentration intraluminaire de  $Ca^{2+}$  dans les fibres CASQ1-KO entraîne la déplétion du RS et l'impossibilité de maintenir des transitoires calciques cytosoliques d'amplitude suffisante pour soutenir la contraction pendant des stimulations répétées (Canato et al. 2010). L'ensemble de ces données suggère que la calséquestrine est essentielle au développement normal du RS ainsi qu'au maintien de l'homéostasie calcique par l'efficacité de son pouvoir tampon (voir aussi, *section II.1.2. Les systèmes tampon du RS*). De manière surprenante, une autre étude effectuée sur ce même modèle CASQ1-KO a montré que l'ablation de la calséquestrine conduisait à l'apparition d'un phénotype d'hyperthermie maligne avec une sensibilité accrue à l'halothane et à la chaleur (Protasi et al. 2011). Plus récemment, une mutation faux-sens (N244G) du gène *casq1* a été identifiée chez un groupe de patients souffrant de myopathie vacuolaire caractérisée par l'accumulation d'agrégats protéiques dans la lumière du RS (Rossi et al. 2014a). Ces données suggèrent que CASQ1 est un gène candidat pour certaines myopathies.

- **Les autres protéines associées à RYR1**

**FKBP12** (pour *FK506-Binding Protein 12*) appartient à la famille des immunophilines, protéines de liaison aux médicaments immunosuppresseurs tels que la FK506 ou la rapamycine. Elle est aussi connue sous le nom de calstabine 1 et interagit avec les acides aminés 2458 à 2468 de RYR1 (la

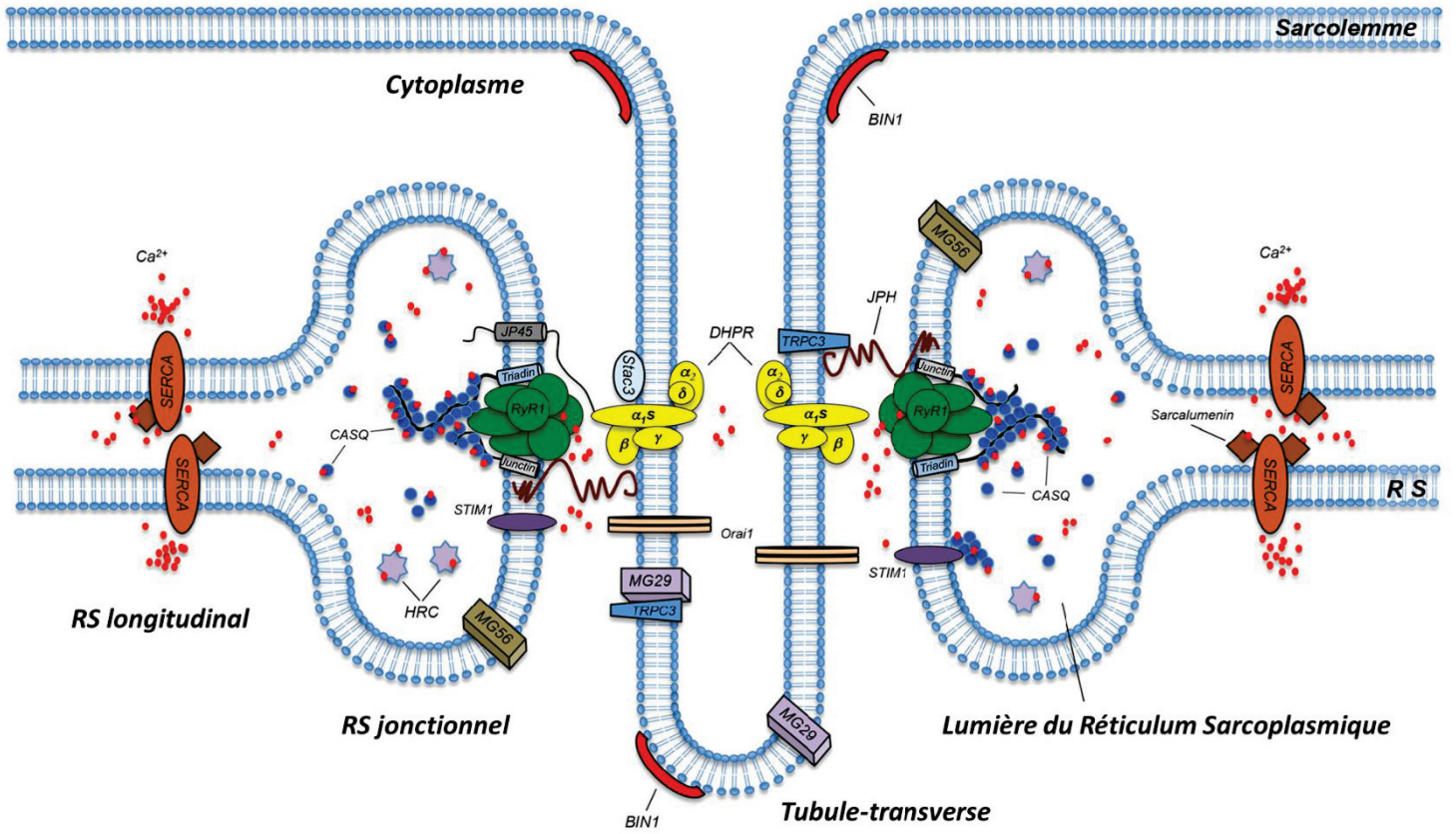


Figure 15. Représentation schématique des protéines triadiques du muscle strié squelettique

D'après Barone et al. (2015)

FKBP12.6 ou calstabile 2 interagit avec RYR2) avec une stoechiométrie de 4:1 chez le mammifère (pour revue, voir Lanner et al. 2010).

L'absence de FKBP12 *in vitro* – induite par incubation de vésicules de RS avec la rapamycine – conduit à une augmentation de la conductance unitaire et de la probabilité d'ouverture du canal RYR1 (Ahern et al. 1997). Chez les souris FKBP12-KO, les propriétés contractiles changent de manière distincte en fonction du type de muscle, la libération de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire voltage-dépendante diminue et les courants Ca<sup>2+</sup> de type L augmentent. L'ensemble de ces résultats suggère que la FKBP12 joue un rôle à la fois sur le contrôle des couplages orthograde et rétrograde (Tang et al. 2004).

**Junctophilines** – Chez le mammifère, on compte quatre isoformes de junctophiline (JPH1-JPH4). Le muscle squelettique exprime JPH1 et JPH2 tandis que seul JPH2 est retrouvé dans le muscle cardiaque. Les junctophilines contiennent huit répétitions N-terminales de quatorze résidus d'acides aminés hydrophobes, appelés les domaines MORN (pour *membrane occupation and recognition nexus*), capables d'interagir avec les phospholipides membranaires (Takeshima et al. 2000). Leur domaine C-terminal est un segment transmembranaire localisé dans la membrane du RS. Grâce à leur structure, les junctophilines agissent comme un pont moléculaire qui facilite le contact étroit entre les tubules-T et la membrane du RS (pour revue, voir Barone et al. 2015) ; elles semblent d'ailleurs intervenir dans la formation et dans la stabilisation des triades (voir par exemple Ito et al. 2001) ainsi que dans l'assemblage du DHPR avec d'autres protéines du couplage EC (Golini et al. 2011). En plus de son rôle structural, l'utilisation de shRNAs dirigés contre JPH2 a montré le rôle de cette protéine dans la régulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, l'efficacité du couplage EC et la contractilité des myocytes cardiaques (Van Oort et al. 2011).

De nombreuses autres petites protéines (mitsugmin29, JP45, ...) jouent un rôle structural et fonctionnel dans le couplage EC (pour revue, voir Treves et al. 2009). Par exemple, **la Mitsugumin-29** (pour 29 kDa), protéine membranaire de la famille des synaptophysines, est majoritairement insérée dans la membrane des tubules-T du muscle squelettique sous forme d'hexamère (Brandt et al. 2001). Elle semble jouer un rôle dans la bonne formation des triades ainsi que dans l'activité canal du RYR1 (Pan et al. 2004). Le polypeptide **JP45** (pour 45 kDa) est composé d'un seul segment transmembranaire et interagit à la fois avec la calséquestrine et avec Ca<sub>v</sub>1.1 (Anderson et al. 2003). Il semble être impliqué dans la régulation de l'activité de Ca<sub>v</sub>1.1 (Gouadon et al. 2006).

## 2. Autres régulateurs de l'homéostasie calcique

Dans le muscle strié squelettique, l'ouverture des canaux RYR1 mène à une augmentation rapide, massive et réversible de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui passe d'une valeur de repos d'environ 100 nM à quelques dizaines voire centaines de micromolaires. L'étroite régulation de l'homéostasie  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique indispensable à l'efficacité du couplage EC ainsi qu'à l'intégrité et la viabilité cellulaire fait intervenir un ensemble complexe de protéines.

### 2.1. Régulateurs réticulaires

Le RS est le système membranaire interne de la cellule musculaire qui joue le rôle principal dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire au cours des cycles successifs de contraction/relaxation. En effet, entre les cycles contractiles notamment, les mécanismes de recapture et de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  par de nombreuses protéines du RS sont essentiels à sa libération massive au cours du couplage EC.

#### 2.1.1. La pompe $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA)

- **Structure moléculaire**

La pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) est responsable de la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarco(endo)plasmique. Cette protéine de 11 kDa est retrouvée chez tous les organismes vivants. Chez les mammifères, il existe trois gènes qui codent pour la protéine SERCA et huit isoformes. Les SERCA1A et SERCA2B sont exprimées dans les fibres musculaires squelettiques à contraction rapide. L'isoforme SERCA2A est exprimée dans les fibres musculaires à contraction lente ainsi que dans les cardiomyocytes (Martonosi et Pikula 2003; Periasamy et Kalyanasundaram 2007; Brini et al. 2013). Les études de cristallographie ont permis d'identifier notamment la présence de dix hélices transmembranaires (M1-M10) ainsi que les domaines cytosoliques de phosphorylation (domaine P) et de fixation à l'ATP de la protéine. Les sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  sont proches des domaines transmembranaires et accessibles au  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique mais pas au  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. La phosphorylation de la SERCA par l'ATP est à l'origine d'une série de changements de conformation qui mènent à une déstabilisation des hélices transmembranaires de sorte que deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  fixés se retrouvent du côté luminal de la protéine (pour revue, voir Martonosi et Pikula 2003) : c'est ainsi que le  $\text{Ca}^{2+}$  est recapturé dans la lumière du RS (MacLennan et al. 1992; Toyoshima et Inesi 2004; Møller et al. 2005). Enfin, les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$ , le pH, les niveaux d'ATP, d'ADP et de Phosphate inorganique ainsi que des protéines accessoires sont autant de facteurs qui peuvent influencer/moduler l'activité de la pompe SERCA (pour revue, voir Periasamy et Kalyanasundaram 2007).

L'importance physiologique des différentes isoformes de SERCA a été largement étudiée grâce aux modèles de souris et de rats transgéniques surexprimant ou déficients en SERCA (Prasad et al. 2004).

La surexpression de SERCA2A entraîne une augmentation de la vitesse de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  et de la contractilité cardiaque (Vetter et al. 2002). De manière intéressante, l'augmentation des niveaux d'expression de la SERCA 1A (x 2.5) dans le cœur induit une recapture deux fois plus importante de  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi qu'une diminution de près de 50 % du niveau d'expression de SERCA2A, indiquant des phénomènes de compensation entre isoformes (Ji et al. 1999; Lalli et al. 2001). A l'inverse, les souris KO hétérozygotes pour SERCA2A présentent une diminution de près de la moitié de la protéine aboutissant à une baisse de la rapidité de la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cœur. Par contre, le modèle KO homozygote pour SERCA2A est létal (Periasamy et al. 1999).

Par ailleurs, il a été identifié que la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS serait diminuée dans le muscle squelettique des souris *mdx* (Schneider et al. 2013) et qu'une surexpression de la protéine SERCA permettrait d'atténuer le phénotype dystrophique (Goonasekera et al. 2011).

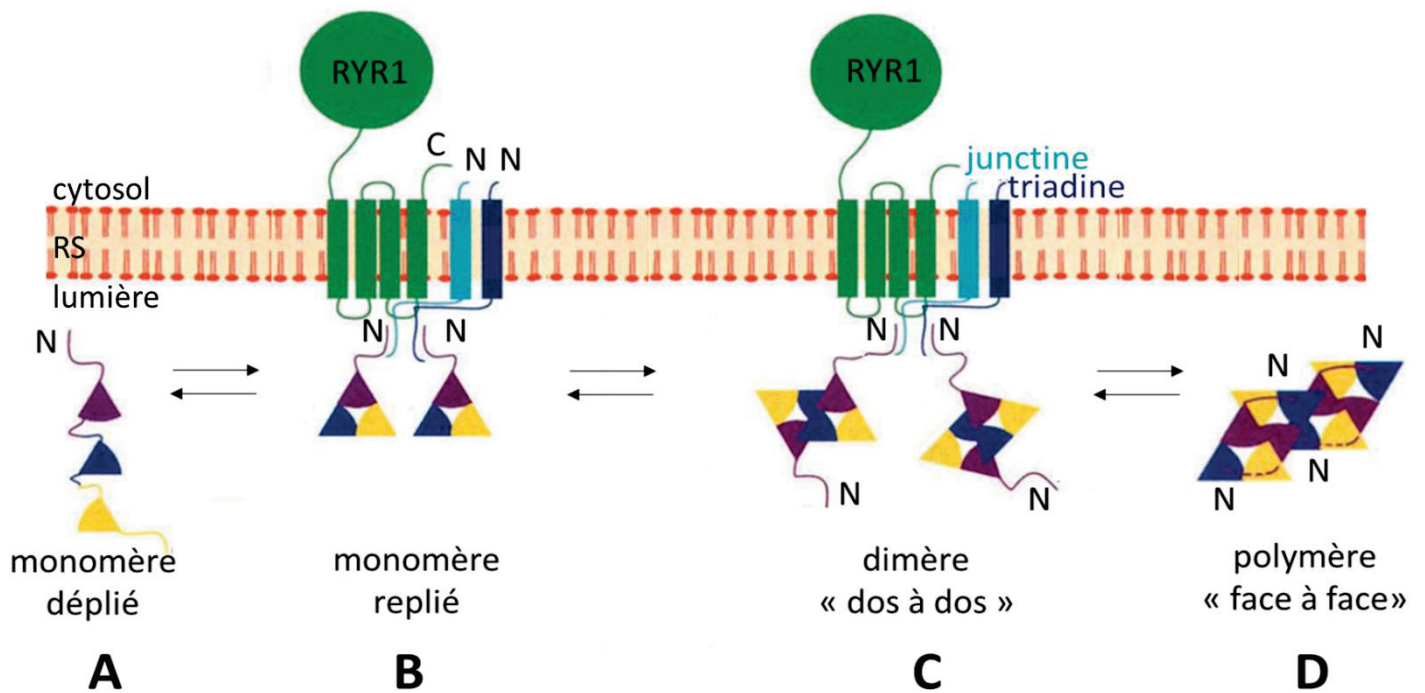
- **Pharmacologie**

Il existe une grande variété d'inhibiteurs de la SERCA (thapsigargine, acide cyclopiazonique (CPA), curcumin, bisphénol A, rapamycine, ...) aux structures chimiques et sites d'action variés (pour revue, voir Michelangeli et East 2011). Tandis que certains ont permis d'identifier les mécanismes conformationnels impliqués dans la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$ , d'autres sont utilisés comme outils pharmacologiques pour l'étude de l'activité du RS et de la signalisation  $\text{Ca}^{2+}$  associée dans le muscle normal et pathologique. A l'heure actuelle, le développement d'inhibiteurs isoforme-spécifiques fait l'objet de nombreuses études dans le domaine de la recherche contre le cancer (voir par exemple Denmeade et Isaacs 2005; Wong et al. 2013; Seo et al. 2016; Bong et Monteith 2018).

**La thapsigargine** est de loin l'inhibiteur de la SERCA le plus largement utilisé. C'est un lactone sesquiterpénique issu de la plante *Thapsia Garganica* capable de bloquer sélectivement la pompe ATPasique en empêchant à la fois sa liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  et sa phosphorylation (Sagara et Inesi 1991). De plus, elle est isoforme-spécifique et présente une affinité très importante pour la SERCA1 ( $K_i = 0.21 \text{ nM}$ ) (Wootton et Michelangeli 2006).

La thapsigargine inhibe de manière réversible la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-dépendante sur des vésicules de RS isolées de muscles squelettiques de lapin (0.5-100 nM; Sagara et Inesi 1991) et sur fibres musculaires pelées (300  $\mu\text{M}$ ; Du et al. 1994). Dans la fibre musculaire squelettique intacte, la thapsigargine est classiquement utilisée (1  $\mu\text{M}$ ) comme outil pharmacologique de déplétion du RS en  $\text{Ca}^{2+}$  (voir par exemple Kurebayashi et Ogawa, 2001).

**Le CPA** (pour acide cyclopiazonique) est un acide indole tétramérique produit par les souches fongiques *Aspergillus* et *Penicillium*. Ce métabolite est une mycotoxine dangereuse pour la



**Figure 16. Changements de conformation Ca<sup>2+</sup>-dépendants de la calséquestrine**

Chaque triangle représente un des trois domaines homologues de la molécule de calséquestrine

- En présence de faible concentration de Ca<sup>2+</sup> (<0.1 mM), le monomère est déplié.
- L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> luminal (0.01-1mM) entraîne le repliement des monomères de calséquestrine qui peuvent interagir avec la triadine et la junctine et sont capables de se dimériser via leur portion C-terminale.
- Les dimères adoptent une configuration « dos à dos » (C.) et sont capables de fixer le Ca<sup>2+</sup>.
- En présence de fortes concentrations de Ca<sup>2+</sup> luminal (> 10 mM), les dimères de calséquestrine se polymérisent en configuration « face à face » par leur portion N-terminale et se dissocient de la triadine et de la junctine

Modifié d'après Wang et al. (1998)



consommation humaine et animale en raison de son effet inhibiteur sur l'activité ATPasique de la pompe SERCA (Seidler et al. 1989). Le CPA est hautement sélectif, présente une forte affinité pour la SERCA et empêche sa liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ . Comme la thapsigargine, son effet inhibiteur sur l'activité de la pompe est largement utilisé *in vivo* sur fibres musculaires squelettiques (50  $\mu\text{M}$ ) comme outil pharmacologique de déplétion du RS en  $\text{Ca}^{2+}$  (voir par exemple, Allard et al. 2006).

### 2.1.2. Les systèmes tampon du RS

Les protéines de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  localisées dans la lumière du RS ont la propriété principale d'agir comme des tampons calciques. Pour pouvoir agir comme tels, elles possèdent une haute capacité de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  et une affinité modérée.

- **La calséquestrine**

Déjà vue précédemment dans le cadre de son interaction avec RYR1, la calséquestrine est une protéine très acide à pH neutre qui présente une faible affinité ( $K_D \sim 1 \text{ mM}$ ) mais une forte capacité de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  (40 -80 ions par molécule) (MacLennan et Wong 1971; Endo 1977; Yano et Zarain-Herzberg 1994; Park et al. 2004). Ces deux propriétés sont essentielles car elles confèrent au RS sa capacité à séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo*. Un modèle proposé par Wang et al. (1998) – basé sur la structure de la protéine identifiée par cristallographie – suggère que la calséquestrine change de conformation en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal (Figure 16) :

- A faibles concentrations ( $< 0.01 \text{ mM}$ ), les monomères (composés de trois domaines homologues) sont dépliés dans la lumière du RS.
- Entre 0.01 mM et 10 mM, les monomères se replient et se dimérisent en configuration « dos à dos » par leur portion C-terminale pour former une poche chargée négativement capable de lier le  $\text{Ca}^{2+}$ .
- En présence de très fortes concentrations ( $> 10 \text{ mM}$ ), les dimères de calséquestrine se polymérisent en configuration « face à face » par leur extrémité N-terminale ce qui entraîne leur dissociation de la triadine et de la junctine.

Ainsi, dans le muscle au repos, la concentration physiologique de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans la lumière du RS est d'environ 0.5-1 mM car les ions  $\text{Ca}^{2+}$  se retrouvent majoritairement ( $> 20 \text{ mM}$ ) fixés à la calséquestrine qui interagit avec la triadine et la junctine (Wang et al. 1998; Zhang et al. 1997). Les données actuelles suggèrent que lors de l'activation du couplage EC, un changement conformationnel du RYR serait transmis aux dimères de calséquestrine qui se détacheraient de la triadine et de la junctine entraînant ainsi sa dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$ . Alors, le  $\text{Ca}^{2+}$  libre augmenterait localement dans les citernes terminales de RS et deviendrait disponible pour être libéré par le RYR (Wang et al. 1998; Ikemoto et al. 1991). En fin de contraction/début de relaxation, le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal diminue ( $> 0.01 \text{ mM}$ ) et la

calséquestrine se dépolymérise (Manno et al. 2017). Le retour à l'état de repos est associé à une augmentation progressive de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans les citernes terminales grâce à la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par l'activité de recapture de la SERCA. Les monomères de calséquestrine seraient alors de nouveau capables d'interagir avec la triadine et la junctine, de se dimériser et de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$ .

- **L'HRC**

L'HRC (pour *Histidine rich  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein*) est une protéine de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  riche en résidus histidine et localisée dans la lumière du RS qui se lie à la triadine (pour revue, voir Arvanitis et al. 2011). C'est récemment qu'elle a été décrite comme régulateur de la capture, de la séquestration et de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS dans les myocytes cardiaques où elle agirait donc comme un tampon calcique (Han et al. 2011). Cependant, son rôle dans le couplage EC du muscle squelettique n'a pas encore été exploré.

## 2.2. Régulateurs sarcolemmaux

Le RS possède de grandes capacités de recapture et de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$  et ceci malgré la succession ou la durée prolongée des cycles contractiles. De nombreuses études suggèrent l'existence de systèmes de régulation sarcolemmaux potentiellement activés par la déplétion du RS qui permettraient d'éviter une pénurie en  $\text{Ca}^{2+}$  au cours du couplage EC.

### 2.2.1. Canaux calciques

- **La voie d'influx calcique activée par la déplétion des stocks intracellulaires (SOCE)**

La voie d'influx  $\text{Ca}^{2+}$  activée par la déplétion des stocks intracellulaires ou SOCE (pour *store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry*) est un mécanisme observé dans une large variété de types cellulaires (Avila-Medina et al. 2018) qui a été identifié il y a plus d'une trentaine d'année (Putney 1986). STIM1 et ORAI1 sont les deux partenaires moléculaires clés de ce processus SOCE permettant de coupler l'ouverture de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrane plasmique au contenu du réticulum (pour revue, voir Michelucci et al. 2018).

**STIM1** (pour *stromal interacting molecule 1*) est une protéine membranaire du réticulum qui est capable de se dimériser à son extrémité C-terminale cytosolique (Ji et al. 2008) et dont la portion N-terminale luminale possède deux régions de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  chargées négativement (Liou et al. 2005).

**ORAI1** (*calcium release-activated calcium modulator 1*) est une protéine de 33 kDa insérée dans la membrane des tubules-T, elle contient quatre domaines transmembranaires et des extrémités N- et C-terminales cytosoliques. C'est un canal de haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  mais qui possède une faible conductance unitaire (< 1 pS) (pour revue, voir Parekh et Putney 2005).

Plus précisément, la déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  (<300  $\mu\text{M}$ ) du RS serait détectée par les protéines STIM1 qui s'oligomériseraient dans la membrane du RS avant de migrer à la jonction triadique pour interagir avec

les canaux calciques tubulaires ORAI1 et activer leur ouverture (Zhang et al. 2006). Le processus SOCE permettrait ainsi d'aider au maintien des concentrations luminales de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS.

Le rôle physiologique de ce mécanisme SOCE dans le muscle squelettique n'a cependant jamais pu être confirmé de manière unanime *in vivo*. En effet, les résultats soutenant cette hypothèse reposent sur des études réalisées sur fibres musculaires préalablement perméabilisées et/ou en présence de bloqueurs de la pompe SERCA induisant une déplétion excessive non-physiologique du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire (Launikonis et al. 2010 ; Wei-LaPierre et al. 2013). Sur fibres musculaires squelettiques intactes, aucune indication de l'activité physiologique de ces canaux n'a pu être détectée (Allard et al. 2006).

Les mutations dans les gènes *stim1* et *orai1* sont comptées parmi les mutations responsables de myopathies à agrégats tubulaires qui se caractérisent par une faiblesse musculaire progressive (Chevessier et al. 2005). Les agrégats tubulaires correspondent à des accumulations de paquets denses de tubules retrouvés dans le cytoplasme des fibres musculaires squelettiques. Chez l'Homme, des mutations sur le gène codant pour STIM1 induiraient l'oligomérisation de cette protéine, même en l'absence de déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS, à l'origine d'une activation constitutive de ORAI1 et donc d'une surcharge calcique intracellulaire délétère (Böhm et al. 2013). De manière comparable, des mutations sur le gène codant pour ORAI1 ont été identifiées comme responsables d'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  excessif (Böhm et al. 2017).

- **Autres**

Les **TRPs** (pour *transient receptor potential*) sont une superfamille (TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML et TRPA) de canaux ioniques cationiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ) plus ou moins sélectifs. Ils sont retrouvés dans de nombreux types cellulaires où ils détectent de nombreux stimuli physiques et chimiques. Bien que ces canaux soient cationiques non sélectifs, la majorité des études dont ils font l'objet concerne leur rôle dans l'influx  $\text{Ca}^{2+}$  et leur recrutement par STIM1 (Huang et al. 2006; Zeng et al. 2008).

Dans le muscle squelettique, on retrouve les sous-familles de TRPC (pour *canonical*), TRPV (pour *vanilloid*) et TRPM (pour *mélastatine*) et plus particulièrement, les isoformes TRPC<sub>1</sub> et TRPC<sub>4</sub>, TRPV<sub>2</sub> et TRPV<sub>4</sub>, TRPM<sub>4</sub> et TRPM<sub>7</sub>. Si ces protéines semblent jouer un rôle physiologique mineur dans le maintien de l'homéostasie  $\text{Ca}^{2+}$  musculaire, elles ont été présumées responsables de l'influx  $\text{Ca}^{2+}$  anormal observé dans la dystrophie de Duchenne (pour revue, voir Gailly 2012). Cependant, ceci reste très controversé dans la mesure où certains travaux suggèrent que ces canaux se trouvent dans la membrane du RS (Berbey et al. 2009).

L'**ECCE** (pour *excitation-coupled  $\text{Ca}^{2+}$  entry*) est un mécanisme découvert par les groupes de K.G. Beam, P. Allen et I. Pessah par lequel, sous l'influence de la dépolarisation membranaire, le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire entrerait dans la cellule musculaire. L'ECCE serait absent des myotubes issus de souris dysgénésiques

(déficients en  $Ca_v1.1s$ ) et dyspédiques (déficients en RYR1s) bien qu'il fût initialement décrit comme indépendant du courant de type L porté par  $Ca_v1.1$  (Cherednichenko et al. 2004). Outre les courants portés par  $Ca_v1.1$  et RYR1, il existerait donc un troisième type de flux calcique vers le cytosol qui ne serait pas activé par la déplétion du RS et qui présenterait des propriétés similaires à celles des canaux SOCE. Curieusement, après plusieurs séries de travaux sur cette question par différents groupes (Hurne et al. 2005; Lee et al. 2015), les auteurs de la découverte initiale ont finalement établi que le courant calcique de type L de  $Ca_v1.1$  constitue l'essentiel de l'ECCE remettant ainsi en cause l'existence de ce processus (Bannister et al. 2009).

### 2.2.2. Systèmes d'extrusion

Dans une fibre musculaire squelettique au repos, le niveau de  $Ca^{2+}$  cytosolique est stable donc le flux net de  $Ca^{2+}$  à travers le sarcolemme est nul ; ce qui signifie que l'influx est équivalent à l'efflux. Il existe donc des mécanismes dans la membrane plasmique capables de faire sortir le  $Ca^{2+}$  de la cellule afin d'assurer le maintien de l'homéostasie  $Ca^{2+}$ .

- **L'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX)**

L'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX pour *Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger*) est une petite protéine membranaire (350-550 Da) qui utilise l'énergie du gradient électrochimique du  $Na^+$  pour pomper le  $Ca^{2+}$  hors de la cellule avec la stœchiométrie 3  $Na^+$  / 1  $Ca^{2+}$  (Kimura et al. 1986). Parmi les trois isoformes exprimés chez le mammifère (NCX1-NCX3), on retrouve NCX2 et NCX3 dans le muscle strié squelettique (Li et al. 1994; Nicoll et al. 1996) dont le rôle physiologique serait de soutenir l'effort de la SERCA après le couplage EC (Cifuentes et al. 2000). Ce rôle de l'échangeur dans le muscle squelettique n'est cependant pas aussi critique que dans le muscle cardiaque où NCX1 joue un rôle central d'extrusion du  $Ca^{2+}$  pendant la relaxation et participe également au couplage EC en permettant l'entrée de  $Ca^{2+}$  au cours de la dépolarisation membranaire.

- **La pompe  $Ca^{2+}$ -ATPase (PMCA)**

La PMCA (pour *plasma membrane Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) est insérée dans la membrane plasmique de la majorité des cellules eucaryotes et permet le transport ATP-dépendant de  $Ca^{2+}$  du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Cette protéine (~130 kDa) a une structure comparable à celle de la pompe ATPase réticulaire SERCA. Elle est composée de 10 domaines transmembranaires avec ses extrémités N- et C-terminales cytosoliques. Sa grosse portion cytosolique (~400 résidus soit 80% de sa masse totale) est comprise entre les segments transmembranaires S4 et S5 et contient le domaine catalytique d'hydrolyse de l'ATP. La boucle intracellulaire S2-S3 correspond au « domaine de transduction »

principalement impliqué dans les changements conformationnels nécessaires à la translocation de seulement deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  par mole d'ATP hydrolysé (pour revue, voir Strehler et Zacharias 2001).

La PMCA est activée par la fixation du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline – en présence fortes concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  libre – et est inhibée par sa dissociation de la calmoduline – lorsque les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  libre diminuent (Au et al. 1985).

Dans le muscle squelettique au repos, la PMCA participe au maintien de l'homéostasie  $\text{Ca}^{2+}$ . En revanche, au cours du couplage EC, elle est très rapidement saturée (pour revue, voir Calì et al. 2018).

### 2.3. Tampons calciques cytoplasmiques

Pendant le couplage EC, une fraction importante du calcium libéré du RS se retrouve complexé à des protéines cytosoliques qui contribuent ainsi à moduler l'amplitude et les cinétiques de la variation de calcium libre cytosolique. Certaines de ces protéines pourraient également moduler directement le couplage EC.

- **La troponine C**

Déjà vue dans le cadre de l'organisation et des mécanismes moléculaires de la contraction (*section I.2.1. Sarcomère et machinerie contractile*), la troponine C (~18 kDa) est la sous-unité de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  du complexe de la troponine et son interaction avec les troponines I et T est centrale dans la régulation de la contraction des muscles squelettiques et cardiaques. Il existe deux gènes connus de la troponine C, l'un code pour l'isoforme rapide (FTnC, pour *fast troponin C*) et l'autre code pour les isoformes lente (STnC, pour *slow troponin C*) et cardiaque (CTnC, pour *cardiac troponin C*). Ces isoformes n'ont pas la même affinité et ne peuvent pas fixer la même quantité d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (pour revue, voir Gomes et al. 2002).

La molécule de troponine C a une forme d'haltère et elle est constituée de deux domaines globulaires N- et C-terminaux reliés entre eux par une région centrale hélicoïdale (Houdusse et al. 1997). Globalement, chaque tête globulaire contient deux motifs « main-EF » – motifs en hélice-boucle-hélice le plus communément retrouvé parmi les protéines de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  (Lewit-Bentley et Réty 2000) – et peut donc fixer deux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Les deux sites de liaison N-terminaux (EF1 et EF2) présentent une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D \sim 10 \mu\text{M}$ ) tandis que les domaines C-terminaux (EF3 et EF4) sont de forte affinité ( $K_D \sim 100 \text{nM}$ ) et lient également le  $\text{Mg}^{2+}$  par compétitivité. Ainsi, au cours du couplage EC, les changements conformationnels de la troponine C induits par la fixation de deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  sur les sites EF1 et EF2 sont à l'origine des changements de structure des filaments fins qui peuvent alors interagir avec les filaments épais (Herzberg et al. 1986).

Au-delà de son rôle dans la contraction, la troponine C représente un système tampon cytoplasmique important vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, via ses sites EF3 et EF4, car elle est présente à forte

concentration dans le cytoplasme de la cellule musculaire (concentration totale de sites de fixation  $TN_{total} \sim 250 \mu M$ ) (Baylor et al. 1983).

- **La parvalbumine**

La parvalbumine est une petite protéine (12 kDa) de haute affinité pour le  $Ca^{2+}$  ( $K_D = 10-100 \text{ nM}$ ). Elle est composée de deux motifs « main-EF », ce qui lui permet de fixer simultanément deux ions  $Ca^{2+}$ . Comme pour les sites de haute affinité au  $Ca^{2+}$  de la troponine C, les motifs « main EF » de la parvalbumine peuvent également fixer le  $Mg^{2+}$  ( $K_D = 91 \mu M$ ).

- A des concentrations de  $Ca^{2+}$  de repos ( $\sim 100 \text{ nM}$ ), les sites de fixation de la parvalbumine sont majoritairement occupés par le  $Mg^{2+}$ .

- Au cours de l'activation du couplage, la libération rapide et transitoire de  $Ca^{2+}$  est suivie par une augmentation tardive de la concentration de  $Mg^{2+}$  intracellulaire ( $\sim 50 \mu M$ ) (Irving 1989; Somlyo et al. 1985; Jacquemond et Schneider 1992) ce qui indique que, lors de son relargage par le RS, le  $Ca^{2+}$  remplace le  $Mg^{2+}$  sur la parvalbumine.

- Au cours de la relaxation, le retour à des concentrations de repos est cent fois plus lent pour le  $Mg^{2+}$  que pour le  $Ca^{2+}$  (Irving 1989; Somlyo et al. 1985; Jacquemond et Schneider 1992).

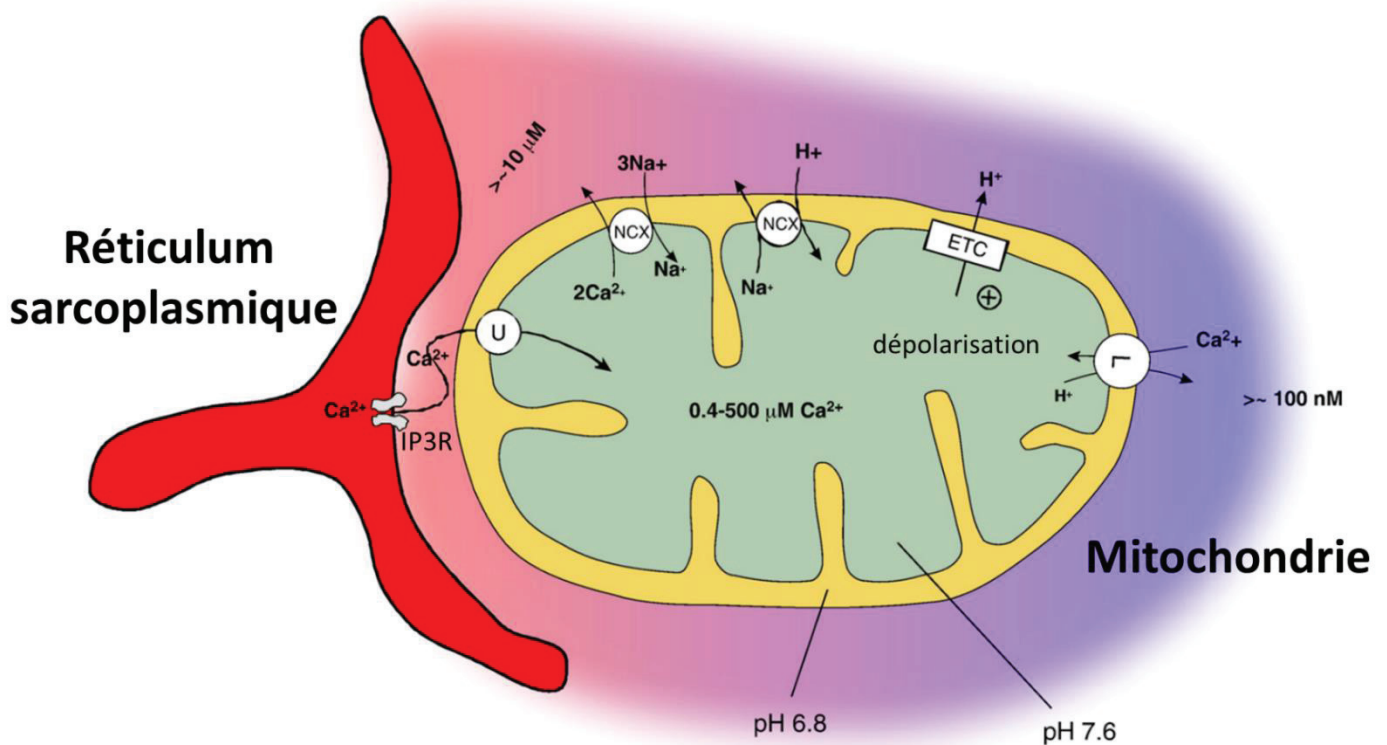
Les cinétiques lentes de dissociation/fixation ( $\sim 1s^{-1}$ ) de la parvalbumine aux ions  $Mg^{2+}$  expliquent que la parvalbumine n'entre pas en compétition avec les sites de faible affinité de la troponine C (pour revue, voir Berchtold et al. 2000).

En raison de sa présence à très fortes concentrations (concentration totale de site de fixation au  $Ca^{2+}$ ,  $PV_{total} = 700 \mu M - 1 \text{ mM}$ ) dans la cellule musculaire, la parvalbumine représente un puissant tampon du  $Ca^{2+}$  cytosolique (Baylor et al. 1983; Garcia et Schneider 1993).

- **La calmoduline**

La calmoduline (CaM) est une protéine ubiquitaire ( $\sim 17 \text{ kDa}$ ) en forme d'haltère et dont chaque tête globulaire présente deux motifs « main-EF » lui permettant de lier quatre ions  $Ca^{2+}$  au total avec une forte affinité ( $K_D = 500 \text{ nM} - 5 \mu M$ ) (pour revue, voir Chin et Means 2000). Lorsqu'elle est libre, c'est-à-dire non complexée au  $Ca^{2+}$ , on parle d'apo-CaM. Lorsqu'elle est complexée au  $Ca^{2+}$  (CaM), elle peut se fixer au RYR (un site de fixation à la CaM par monomère de RYR) (Wagenknecht et al. 1997; Xiong et al. 2006) dans des proportions stœchiométriques isoformes et  $Ca^{2+}$ -dépendantes (Tripathy et al. 1995; Balshaw et al. 2001).

La mesure de l'activité unitaire des RYR1 et RYR3 *in vitro* montre que la liaison du complexe  $Ca^{2+}/CaM$  est activatrice à faibles concentrations de  $Ca^{2+}$  et inhibitrice à fortes concentrations de  $Ca^{2+}$  (Chen et al. 1997; Fruen et al. 2000). En particulier, dans le muscle squelettique, la CaM semble activer le RYR1



**Figure 17 : Mécanismes de capture et d'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie**

Le canal  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial (*mitochondrial calcium uniport*, « U ») permet l'entrée rapide et massive de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur de la mitochondrie, mais seulement en présence de très fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $> 10 \mu\text{M}$ ) atteintes dans les microdomaines cytosoliques situés à proximité des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  IP3Rs, insérés dans la membrane du RS longitudinal.

L'antiport LETM1 (« L ») conduit l'entrée lente de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie en échange de  $\text{H}^+$ . LETM1 opère en présence de faible niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ( $> 100 \text{ nM}$ ) et son activité est limitée par le gradient de pH généré par la chaîne de transport des électrons mitochondriale (ETC). LETM1 permet de détecter de petites élévations de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique sans risquer de surcharger la mitochondrie. Le  $\text{Ca}^{2+}$  peut être extrudé de la mitochondrie via LETM1 (bidirectionnel) mais également via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (« NCX ») lors de fortes charges de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial.

D'après Santo-Domingo et Demaurex (2010)

par augmentation de sa sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui suggère qu'elle jouerait un rôle critique dans le contrôle de l'activation des canaux aux niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  de repos (Fruen et al. 2000).

Cependant, à l'échelle de la fibre musculaire intacte, il existe très peu de données fonctionnelles convaincantes permettant de confirmer l'importance physiologique de ces régulations.

Concernant son rôle de tampon calcique, la calmoduline n'a qu'une contribution mineure par rapport à la troponine C et à la parvalbumine car elle est faiblement exprimée dans la fibre musculaire (sept fois moins que la troponine C) (Baylor et al. 1983).

## 2.4. Autres

### 2.4.1. La mitochondrie

Au cours du couplage EC, les besoins en ATP augmentent rapidement d'un facteur 100. En effet, la consommation d'ATP est non seulement nécessaire à l'interaction entre l'actine et la myosine mais également au fonctionnement de la pompe réticulaire SERCA. Mais, puisqu'il n'est pas stocké à fortes concentrations dans la fibre musculaire squelettique au repos, une telle demande en ATP requiert une production rapide et soutenue par les mitochondries (Griffiths et Rutter 2009; Porter et Wall 2012). Ces organites occupent 10 à 15 % du volume cellulaire et sont localisés au niveau des bandes I, entourant le réseau de RS auquel ils sont reliés par des structures d'attache (Boncompagni et al. 2009). Ainsi, grâce à cette intime juxtaposition entre ces deux compartiments, la mitochondrie pourrait capturer le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui stimulerait la synthèse d'ATP nécessaire à la contraction. Il a été suggéré que l'antiport LETM1, antiport  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , permettrait la capture rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie en présence de faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ( $> 100 \text{ nM}$ ) (Santo-Domingo et Demarex 2010). Tandis que le canal MCU (pour *mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniport*), localisé dans la membrane mitochondriale interne, fonctionnerait à fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $>10 \mu\text{M}$ ), et lui permettrait de récupérer directement le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré par le RS au cours du couplage EC (pour revue, voir Zhou et al. 2016) (Figure 17)

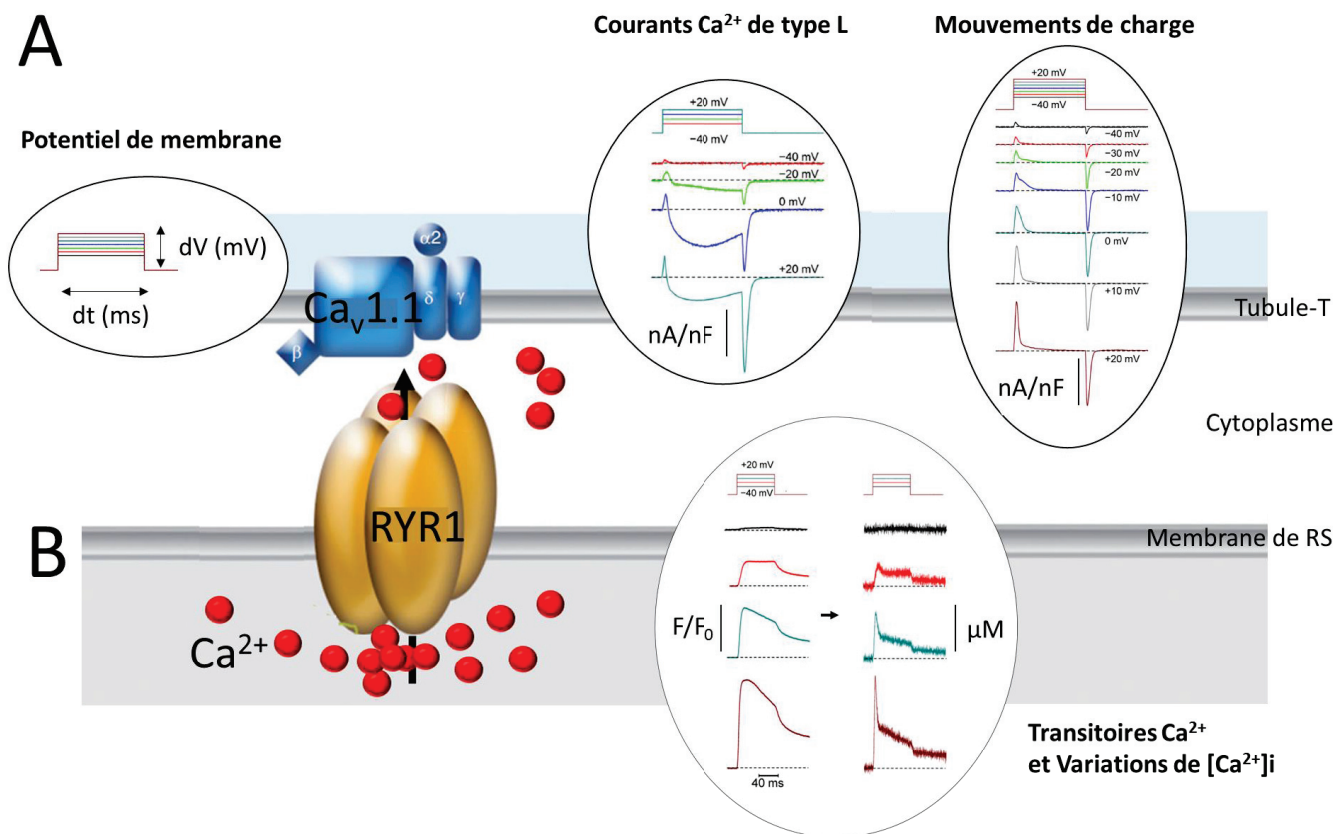
### 2.4.2. Le récepteur à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R)

L'IP<sub>3</sub>R (pour *inositol tri-phosphate receptor*) constitue une deuxième classe de canal de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui est activé par la fixation de son ligand endogène, l'IP<sub>3</sub>, et qui partagent 17% d'homologies avec la protéine RYR. Il existe trois isoformes d'IP<sub>3</sub>R (IP<sub>3</sub>R1- IP<sub>3</sub>R3) qui sont composées de trois grands domaines : un domaine N-terminal de fixation à l'IP<sub>3</sub>, un domaine intermédiaire et une région pore C-terminale (Mignery et Südhof 1990). L'IP<sub>3</sub>R est une protéine principalement retrouvée dans la membrane du RE ( $\sim 300 \text{ kDa}$ ) et, contrairement au RYR, elle est ubiquitaire.

L'IP<sub>3</sub>R est indispensable aux voies de signalisation intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes dans la majorité des cellules de mammifères. Dans le muscle strié squelettique, l'IP<sub>3</sub>R est inséré dans la membrane du RS



longitudinal et il est postulé impliqué dans l'activation des canaux SOCE et dans l'activation des MCU (pour revue, voir Prole et Taylor 2019). Par ailleurs, l'un des mécanismes à l'origine de son activation serait initié par la fixation de l'ATP extracellulaire sur les récepteurs purinergiques métabotropiques (P2Y). Ceci entraînerait l'activation des récepteurs couplés à la phospholipase C à l'origine de l'augmentation de la concentration intracellulaire d'IP<sub>3</sub>. Aussi, les IP<sub>3</sub>Rs seraient impliqués dans les évènements transcriptionnels Ca<sup>2+</sup>-dépendants de détermination du phénotype lent ou rapide de la fibre musculaire striée squelettique. En effet, la stimulation de Ca<sub>v</sub>1.1 à basse fréquence entraîne une libération d'ATP extracellulaire à l'origine de la libération de Ca<sup>2+</sup> à travers les IP<sub>3</sub>R qui régulerait l'expression des gènes impliqués dans la transition phénotype rapide-phénotype lent (Casas et al. 2010; Jorquera et al. 2013).



**Figure 18. Combinaison des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie  $Ca^{2+}$  pour la caractérisation fonctionnelle du couplage excitation-contraction**

Contrôle du potentiel de membrane des tubules-T (A.) avec mesure simultanée :

- des courants  $Ca^{2+}$  de type L de Cav1.1 ou des mouvements de charges intramembranaire des segments S4 de Cav1.1 (en nA/nF) (A.)
- et/ou des variations de fluorescence de l'indicateur  $Ca^{2+}$  cytosolique (transitoires  $Ca^{2+}$ ) permettant le calcul des variations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (B.)

Modifié d'après Marty (2015) ; Hernández-Ochoa et Schneider (2012)

## CHAPITRE 3 : PROPRIETES ELECTROCHIMIQUES DE LA MEMBRANE DU RS

L'activité des RYRs est essentielle à la fonction musculaire squelettique. Cependant, aucun courant généré par l'ouverture de ces canaux ne peut être directement mesuré *in vivo* par la technique de potentiel-imposé. En effet, cette méthode d'électrophysiologie permet uniquement de mesurer et de contrôler le potentiel membranaire de surface des cellules via l'injection d'une quantité de courant appropriée. Or, le RS est un système membranaire interne isolé électriquement de la membrane de surface. Ainsi, de nombreux mécanismes physiologiques associés au maintien et à la régulation de la libération de l'ion  $Ca^{2+}$  par le RS restent incompris.

Ce chapitre décrit les propriétés électrochimiques connues ou supposées de la membrane du RS qui ont pu être caractérisées *in vivo* grâce au développement d'approches indirectes.

### 1. Flux de libération calcique

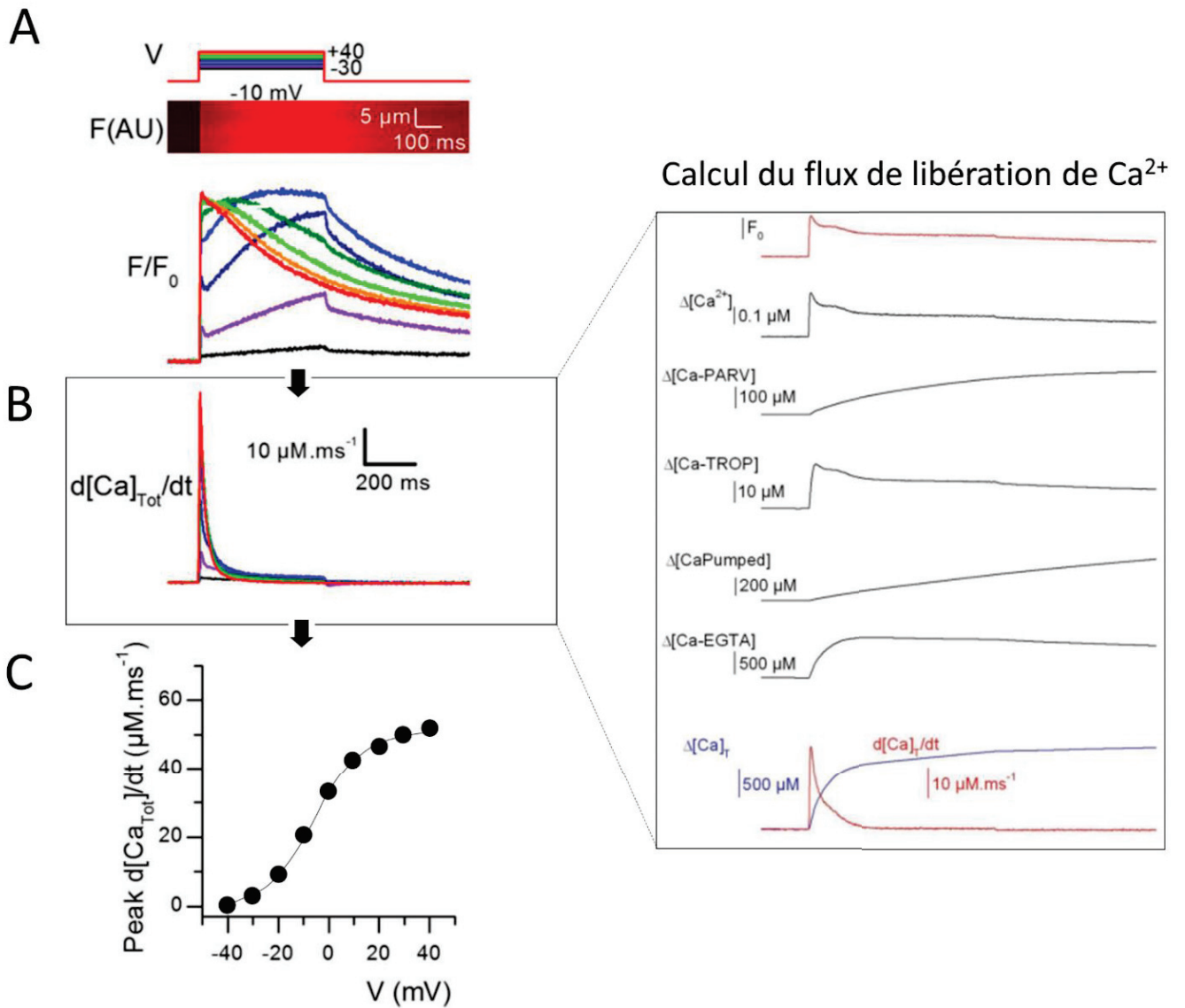
#### 1.1. Caractérisation fonctionnelle du couplage EC

Dans le muscle strié squelettique, les interactions moléculaires  $Ca_v1.1$ -RYR1 constituent l'élément clé du couplage entre la dépolarisation membranaire et la libération massive de  $Ca^{2+}$  intracellulaire par le RS nécessaire à la contraction. La caractérisation quantitative des conséquences fonctionnelles de ces interactions est rendue possible *in vivo* grâce à la combinaison des techniques d'électrophysiologie et de détection de  $Ca^{2+}$  sur fibre musculaire isolée (pour revue, voir Hernández-Ochoa et Schneider 2012) (Figure 18). Les approches électrophysiologiques simultanées les plus utilisées sont :

- le déclenchement de PA par stimulation de champ.
- le déclenchement de PA en conditions de courant-imposé et la mesure simultanée du potentiel
- le déclenchement de variations contrôlées de potentiel membranaire (conditions de potentiel-imposé) permettant la mesure simultanée du courant de membrane et ainsi la détection des mouvements de charges intra-membranaires de  $Ca_v1.1$  ou du courant  $Ca^{2+}$  macroscopique à travers  $Ca_v1.1$  en conditions de potentiel-imposé.

#### 1.1.1. Transitoires calciques voltage-dépendants

A partir des années 1970 chez la grenouille (Miledi et al. 1977; Kovács et al. 1979) et des années 1990 chez le mammifère (Delbono et Stefani 1993; Garcia et Schneider 1993; Jacquemond 1997), les études réalisées en conditions de potentiel-imposé sur fibres musculaires isolées, montrent que la dépolarisation de la membrane plasmique déclenche la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS. Cette libération se caractérise par une augmentation transitoire de  $Ca^{2+}$  cytosolique (ou transitoire  $Ca^{2+}$ ) qui est



**Figure 19. Transitoires Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants et flux de libération de Ca<sup>2+</sup>**

- A.** Transitoires Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants : variations moyennes de la fluorescence (F) de l'indicateur Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, le rhod-2, normalisées par rapport à la fluorescence de base (F/F<sub>0</sub>), mesurées sur une fibre musculaire squelettique de souris en réponse à des dépolarisations membranaires d'amplitude croissante (V, de -30 à +40 mV).
- B.** Flux calciques (d[Ca]<sub>Tot</sub>/dt) voltage-dépendants (à gauche) estimés à partir des enregistrements en (A.) pour chaque valeur de dépolarisation grâce au modèle (à droite) qui prend en compte :
- les propriétés de l'indicateur Ca<sup>2+</sup>, ce qui permet de calculer la variation moyenne de Ca<sup>2+</sup> cytosolique (Δ[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)
  - la fixation du Ca<sup>2+</sup> sur les deux tampons cytosoliques : la parvalbumine (Δ[Ca-PARV]) et la troponine C (Δ[Ca-TROP])
  - la recapture du Ca<sup>2+</sup> par la pompe SERCA (Δ[Ca-Pumped])
  - la fixation du Ca<sup>2+</sup> sur le chélateur de Ca<sup>2+</sup> utilisé comme bloqueur de la contraction, ici l'EGTA (Δ[Ca-EGTA])
- C.** Relation entre le pic du flux de libération de Ca<sup>2+</sup> et la valeur de dépolarisation membranaire. En réponse à des dépolarisations d'amplitudes croissantes, l'amplitude maximum de la vitesse de la libération de Ca<sup>2+</sup> augmente.

Modifié d'après Kutchukian et al. (2016)

interrompue par la repolarisation. Plus précisément, la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  physiologique par le RS est étroitement contrôlée par le potentiel de membrane et dite « voltage-dépendante » (Fig 19 A) :

- Le potentiel-seuil de déclenchement des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  se situe à des valeurs de dépolarisation membranaire comprise entre -40 et -20 mV.

- Au-delà du seuil, des dépolarisations d'amplitude croissante génèrent un flux calcique d'amplitude croissante qui atteint un maximum pour des valeurs de l'ordre de +20 à + 40 mV (Delbono et Stefani 1993; Garcia et Schneider 1993; Jacquemond 1997).

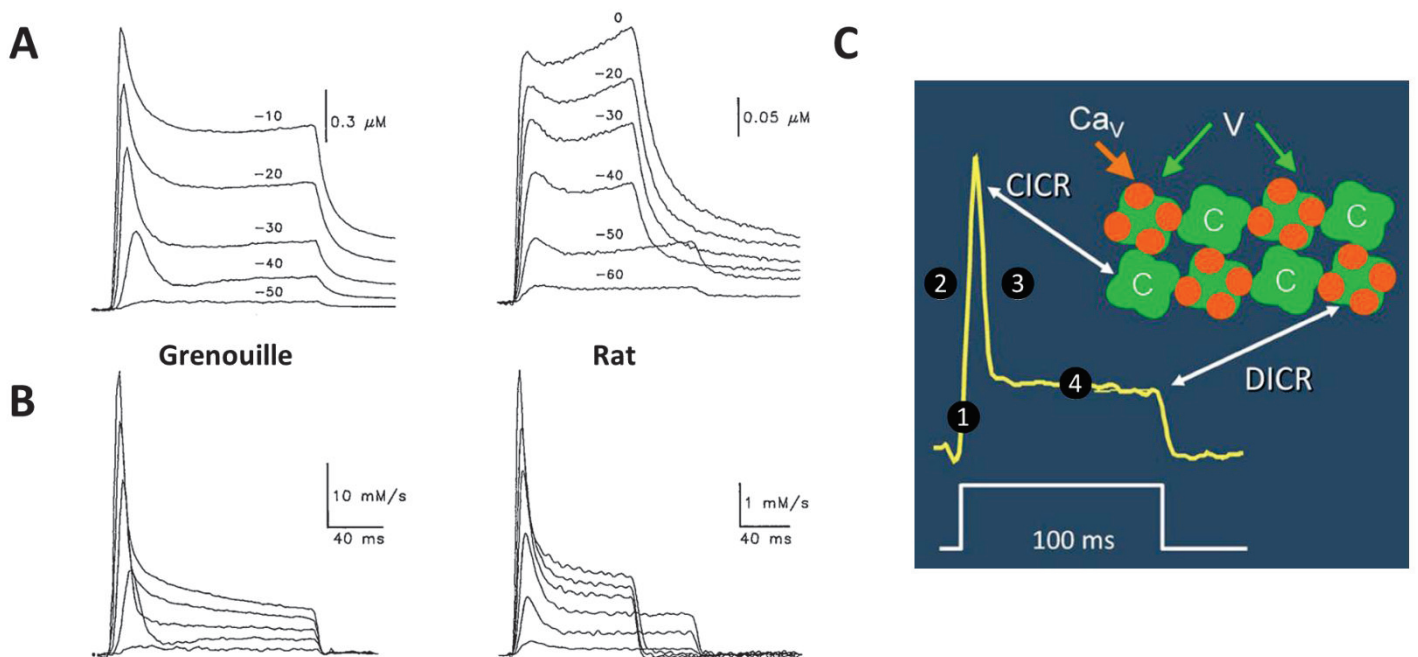
Plus récemment, l'utilisation d'indicateurs de faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  introduits dans la lumière du RS a permis de mesurer les changements de concentration intra-luminale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le même type de situations expérimentales (Kabbara et Allen 2001; Manno et al. 2013, 2017). Cette nouvelle approche a permis d'appréhender les mécanismes associés à la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ainsi que les situations de déplétion du RS en  $\text{Ca}^{2+}$  (Robin et Allard 2012a, 2013). Par ailleurs, l'excellente résolution de cette approche a permis de montrer que le contrôle de l'activité des canaux RYR par le potentiel de membrane (par  $\text{Ca}_v1.1$ ) s'effectue sur toute la gamme de potentiel jusqu'aux niveaux de repos (Robin et al. 2012).

#### 1.1.2. Flux de libération calcique

L'analyse des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  peut permettre d'estimer le flux calcique  $d[\text{Ca}^{2+}]_T/dt$ , c'est-à-dire la vitesse d'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS traduisant l'activité globale des canaux RYR. Pour cela, la variation de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  total cytosolique est estimée en prenant en compte 1) des propriétés de l'indicateur utilisé, 2) de la redistribution du  $\text{Ca}^{2+}$  sur ses différents tampons intracellulaires (parvalbumine, troponine C et autres tampons calciques exogènes éventuellement utilisés comme l'EGTA) et 3) de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS (SERCA) (Figure 19 B) (Baylor et al. 1983; Melzer et al. 1984; Collet et al. 2004).

#### • **Flux de libération de $\text{Ca}^{2+}$ chez les amphibiens**

Chez les amphibiens, en réponse à un train de PA ou à un créneau de dépolarisation-imposée, le flux de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire se décompose en deux phases, de manière indépendante de l'amplitude ou de la durée de l'activation (Figure 20): un pic de libération transitoire rapide d'une durée de l'ordre de 10 à 20 ms suivi d'une période maintenue d'amplitude plus faible (~20% du pic initial) (Baylor et al. 1983; Melzer et al. 1984; Schneider et Simon 1988). De manière intéressante, lorsque deux brèves dépolarisations-imposées ou deux PA sont appliqués avec un intervalle inférieur ou égal à une durée de l'ordre de moins de 500 ms, le flux  $\text{Ca}^{2+}$  obtenu en réponse au deuxième PA est dépourvu de ce pic initial (Baylor et al. 1983; Schneider et Simon 1988) et le temps de latence



**Figure 20. Flux de libération de  $Ca^{2+}$  et inactivation partielle de la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS**

- A.** Transitoires  $Ca^{2+}$  mesurés avec l'indicateur Antipyrylazo III dans des fibres musculaires squelettiques de grenouille (à gauche) et de rat (à droite) en réponse à des dépolarisations membranaires (valeurs indiquées au-dessus de chaque tracé). D'après Shirokova et al. (1996)
- B.** Flux de libération de  $Ca^{2+}$  calculé à partir des enregistrements en (A.). Le pic précoce correspond à la composante inactivable. Il est suivi d'une composante soutenue. Ces propriétés du flux de  $Ca^{2+}$  sont observées chez l'amphibien et chez le mammifère. D'après Shirokova et al. (1996)
- C.** Modèle de Rios et Pizarro 1988 :
- ① DICR (*depolarization-induced  $Ca^{2+}$ -release*) : ouverture des RYR couplés à  $Ca_v1$  (V)
  - ② CICR (*calcium-induced  $Ca^{2+}$ -release*) : ouverture des RYR non couplés (C)
  - ③ Arrêt du CICR : fermeture des canaux C
  - ④ Maintien du DICR : les canaux V restent ouverts pendant toute la durée de la dépolarisation
- D'après Ríos (2018)

nécessaire à la récupération de l'amplitude du pic initial est corrélé au temps requis pour restituer le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire initial de repos (Schneider et Simon 1988). Ces résultats ont permis de confirmer les données obtenues *in vitro* (voir section II.1.2.2.3. Libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et régulations) et de mettre ainsi en évidence l'existence d'un processus physiologique d'inactivation  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant d'une partie des canaux RYR au cours de l'activation musculaire.

Dans la même logique, la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ouverture des canaux RYR déterminée *in vitro* (voir section II.1.2.2.3. Libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et régulations) a conduit plusieurs groupes à rechercher un corrélat physiologique à cette propriété du canal. En effet, la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  de l'activation des RYRs était initialement anticipée pouvoir se traduire par l'activation d'un mécanisme de  *$\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release* (CICR) au cours de l'activation musculaire. Cependant, la mise en évidence *in vivo* de cette composante  $\text{Ca}^{2+}$ -activée de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  s'est révélée compliquée. Au cours des années 1990, deux groupes ont testé l'existence de ce mécanisme par utilisation d'une stratégie consistant à étudier les propriétés du flux dans des fibres injectées ou dialysées avec de fortes concentrations de tampons calciques exogènes (voir par exemple Jacquemond et al. 1991; Hollingworth et al. 1992). Les conclusions des deux groupes sont longtemps restées contradictoires mais ont finalement été réconciliées dans une certaine mesure par les travaux de Pape et al. (2002) qui suggèrent l'existence d'un processus de CICR pour les flux activés par de fortes valeurs de dépolarisation membranaire.

Dans l'ensemble, il faut admettre qu'une grande partie des difficultés et contradictions liées à ces travaux résultent des incertitudes dans la quantification absolue des signaux calciques intracellulaires (pour revue, voir Ríos 2018). Finalement, c'est la découverte de la présence des événements élémentaires de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS, les *sparks*  $\text{Ca}^{2+}$  – dont le support moléculaire est vraisemblablement l'isoforme RYR3 – qui fournira la preuve définitive de la fonctionnalité du processus de CICR dans le muscle de grenouille (pour plus de détails, voir section III.1.2. Evènements calciques élémentaires).

- **Flux de libération  $\text{Ca}^{2+}$  chez les mammifères**

Chez le mammifère, le flux de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à un train de PA ou à un créneau de dépolarisation-imposée possède globalement des propriétés cinétiques similaires à celles observées chez la grenouille (Garcia et Schneider 1993; Delbono 1995; Peter Szentesi et al. 1997b) (Figure 20). Cependant, certains mécanismes sous-jacents diffèrent fondamentalement entre les deux modèles. En particulier, il est maintenant acquis que, chez le mammifère, le mécanisme de CICR n'est pas mis en jeu dans les conditions normales en raison de l'absence d'expression significative de l'isoforme RYR3 (pour plus de détails, voir section III.1.2. Evènements calciques élémentaires).

- **Les différents modèles**

Le **modèle** initial de Rios et Pizarro 1988 (Figure 20 C), à partir d'observations sur le muscle de grenouille, proposait que deux mécanismes de libération de  $Ca^{2+}$  soient impliqués au cours du couplage EC du muscle squelettique : le mécanisme de DICR initial et prolongé (pour *depolarization-induced  $Ca^{2+}$ -release*) et le mécanisme de CICR secondaire et bref. D'après ce modèle :

(1) **DICR** : La dépolarisation membranaire active les canaux RYR couplés à  $Ca_v1$  dits canaux « V », pour voltage-activés.

(2) **CICR** : le  $Ca^{2+}$  libéré localement par les canaux V se fixe sur les sites d'activation (« A » ; Laver et al. 1997) des RYRs non couplés dits canaux « C », pour calcium-activés. L'ouverture des canaux C est à l'origine du pic de libération initial de  $Ca^{2+}$ .

(3) **Arrêt du CICR** : L'augmentation subséquente de  $Ca^{2+}$  intracellulaire entraîne sa fixation sur les sites d'inactivation (« I » ; Laver et al. 1997) des canaux C d'où la décroissance rapide du signal.

(4) **Maintien du DICR** : Les canaux V restent ouverts pendant toute la durée de la dépolarisation et sont donc responsables de la phase de plateau.

Ce modèle s'est largement appuyé sur l'organisation du réseau de RYR et  $Ca_v1$  où seulement un RYR sur deux est en contact avec une tétrade de  $Ca_v1$  (Figures 12 et 20). Les RYRs non couplés fournissaient ainsi intuitivement le support moléculaire des canaux C responsables du CICR. Cependant, la démonstration ultérieure de l'existence des *sparks* calciques comme étant les événements spécifiquement dus au CICR, et dont l'accumulation produit le transitoire calcique macroscopique de la fibre musculaire de grenouille mais pas de la fibre mammifère (pour plus de détails, voir *section III.1.2. Evènements calciques élémentaires*), allait considérablement bousculer toutes ces considérations. A l'heure actuelle, il est ainsi envisagé que malgré des cinétiques extrêmement similaires, le flux calcique chez l'amphibien comporte une composante de CICR qui contribue au pic initial alors que ce n'est pas le cas chez le mammifère (pour revue, voir Rios 2018). Par contre, dans les deux espèces, le déclin rapide du pic initial serait dû à l'inactivation  $Ca^{2+}$  dépendante.

L'étude plus fine des propriétés du mécanisme d'inactivation  $Ca^{2+}$ -dépendant chez l'amphibien a donné naissance au **modèle de libération « quantique » de  $Ca^{2+}$**  qui suggère l'existence de sous-groupes de canaux RYRs (ou « couplons ») possédant des sensibilités différentes, c'est-à-dire activés seulement pour une certaine gamme de potentiel (Pizarro et al. 1997; Stern et al. 1997). Ainsi, de fortes valeurs de dépolarisation activeraient progressivement certains groupes de RYRs puis en inactiveraient d'autres (Pizarro et al. 1997). Ce modèle suggère que l'ensemble des RYRs présents à la face jonctionnelle d'un même tubule-T, et associés aux  $Ca_v1$ , formeraient non pas un ensemble de canaux  $Ca^{2+}$  indépendants mais plutôt une unité fonctionnelle de libération de  $Ca^{2+}$  appelée « couplon ». Chaque triade serait donc composée de deux couplons.



Ce modèle a été repris par Szentesi et al. (2000) pour expliquer le processus d'inactivation partielle du flux  $Ca^{2+}$  chez le mammifère. Dans leur **modèle « d'inactivation déterministe »**, une même valeur de dépolarisation recruterait toujours le même groupe de RYRs qui s'inactivent progressivement au cours de la stimulation. De cette manière, dans les expériences de doubles pulses, le déclin du pic au second pulse est de même amplitude que la composante « inactivable » du premier pulse.

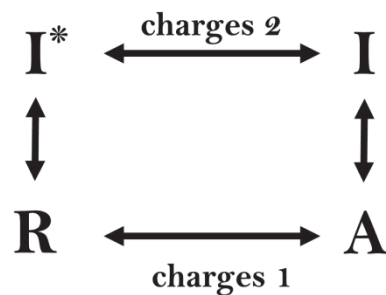
### 1.1.3. Inactivation voltage-dépendante du couplage EC et mouvements de charge

Historiquement, les mesures de tension musculaire développée en réponse à des variations de  $K^+$  externe, chez la grenouille et chez le rat, ont très tôt montré qu'au cours de dépolarisations membranaires soutenues (>2-5 s), la contraction musculaire n'est pas maintenue (Hodgkin et Horowicz 1960; Dulhunty 1991). De plus, la réduction du potentiel de repos (de -80 mV à -60 mV) produit une forte augmentation du potentiel-seuil de contraction, c'est-à-dire que des dépolarisations de plus grande amplitude sont nécessaires au raccourcissement des sarcomères (Chua et Dulhunty 1988). L'amplitude et la durée (période réfractaire) de ce phénomène de blocage de la contraction sont d'autant plus importantes que l'amplitude et la durée de la dépolarisation augmentent (Dulhunty 1991). Le processus d'inactivation du couplage EC mis en évidence par ces travaux est dû aux propriétés du détecteur de potentiel  $Ca_v1.1$ .

Deux types de mouvements de charges intramembranaires (ou « *gating current* » ou « courant de porte ») générés par les segments S4 de  $Ca_v1.1$  peuvent être mesurés en fonction du potentiel de maintien de la membrane des fibres musculaires (pour revues, voir Dulhunty 1992; Ríos et al.1992) :

- Lorsque la membrane est maintenue à un potentiel supérieur ou égal au potentiel de repos ( $\sim -80$  mV) : une certaine quantité de charges (charges 1) se déplace en réponse à une dépolarisation membranaire et la fibre se contracte.
- Lorsque la membrane est maintenue dépolarisée pendant plusieurs secondes, la fibre entre dans un état inactivé dans lequel il est impossible de déclencher une contraction par une stimulation électrique : les charges 1 disparaissent et le déplacement d'une certaine quantité de charges (charges 2) devient possible mais seulement lors de la repolarisation de la membrane. La quantité de charges 2 mesurées dans une fibre maintenue dépolarisée est à peu près égale à celle des charges 1 dans une fibre au repos.

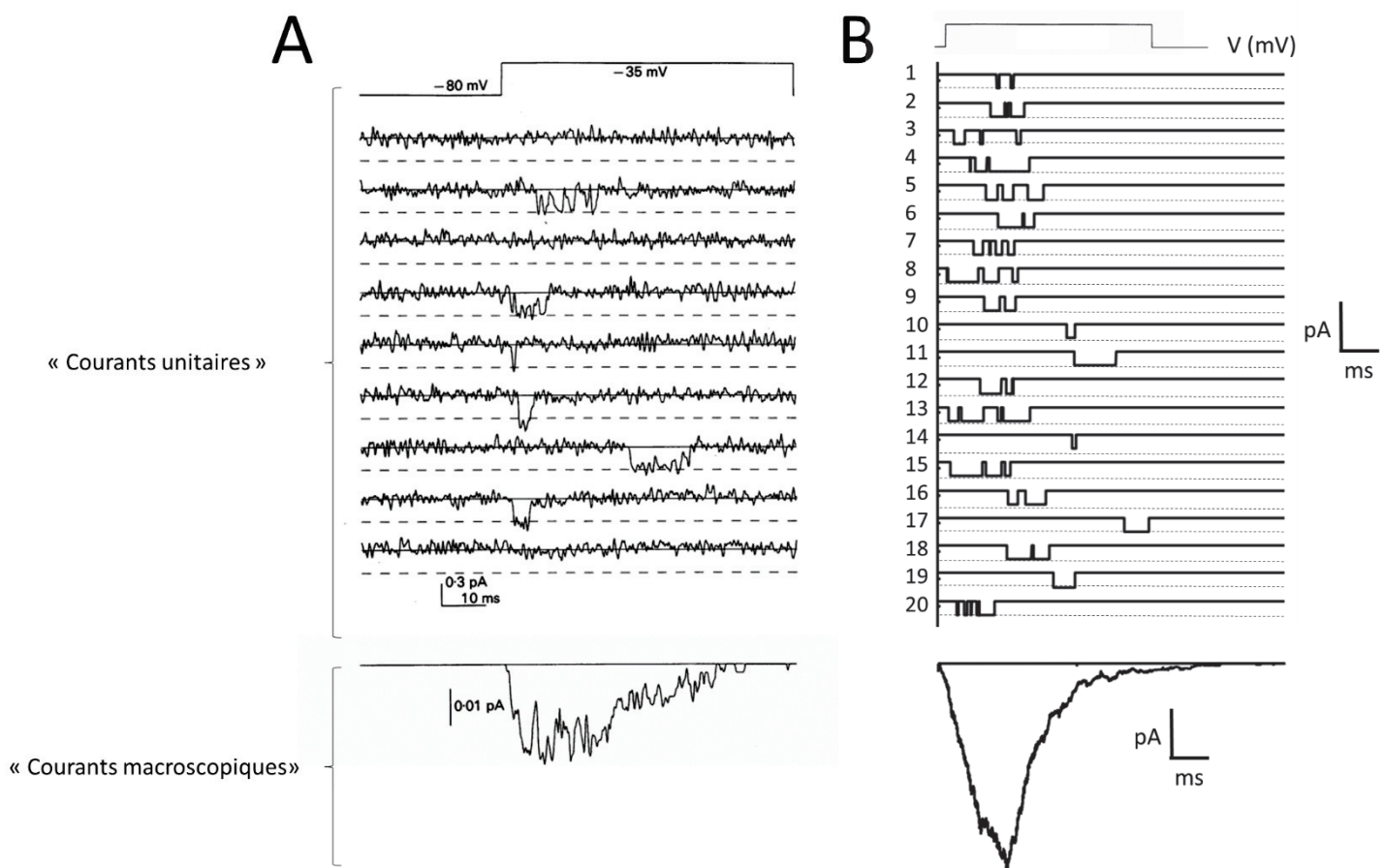
Sur la base de l'existence de ces deux types de charges, Brum et Rios (1987) proposent que le détecteur de potentiel  $Ca_v1.1$  possède 4 états :



Les charges 1 proviennent des mouvements rapides voltage-dépendants du détecteur de potentiel entre l'état de repos R et l'état activé A. Tandis que les charges 2 proviennent de la transition rapide voltage-dépendante entre les deux états inactivés  $I^*$  et I. L'inactivation ( $A \rightarrow I$ ) et la restauration ( $I^* \rightarrow R$ ) sont des transitions lentes indépendantes du potentiel qui permettent un échange réciproque entre les charges 1 et 2.

Au potentiel de repos, une dépolarisation provoque la transition de l'état R vers l'état A avec des cinétiques rapides (de l'ordre de la ms) puis de A vers I avec des cinétiques plus lentes (de l'ordre de la s). Ainsi, un seul potentiel d'action permet le déplacement du système de R vers A mais sa durée n'est pas suffisante au passage à l'état I. En revanche, des stimulations de plus longue durée induisent la transition de A vers I. Après un passage complet du système à l'état I (inactivation complète), une repolarisation rapide permet le retour à  $I^*$  puis le passage de  $I^*$  vers R, le système redevient activable. Le système ( $Ca_v1.1$ -R<sub>YR</sub>1) peut donc se résumer au fonctionnement d'une seule porte (dite « porte d'activation ») pouvant s'ouvrir (et déclencher la libération de  $Ca^{2+}$ ) ou se fermer (et empêcher la possibilité au  $Ca^{2+}$  d'être libéré) sous l'effet des mouvements de charges 1 et 2.

Peu après, Brum et al. (1988a, 1988b) et Pizarro et al. (1989) ont décrit la sensibilité au  $Ca^{2+}$  extracellulaire de ce phénomène d'inactivation chez la grenouille. En effet, en l'absence de  $Ca^{2+}$  – et de tout autre cation divalent – non seulement les charges 1 et la libération de  $Ca^{2+}$  par les R<sub>YR</sub>s sont supprimées, mais en plus, la distribution des charges est identique que la fibre musculaire soit polarisée ou non. Ce phénomène est expliqué par la présence d'un « *priming site* » qui doit être occupé par des espèces cationiques pour maintenir le système dans l'état activable au repos. Ce n'est que récemment que les propriétés de l'inactivation voltage-dépendante ont été caractérisées chez le mammifère (Ferreira Gregorio et al. 2017). Le phénomène présente des propriétés globalement similaires à ce qui avait été décrit chez la grenouille. Cependant, de manière intéressante, le détecteur de potentiel est partiellement inactivé aux niveaux de repos du potentiel de membrane avec comme



**Figure 21 : Courant ionique macroscopique et courants unitaires**

Le courant ionique macroscopique est le résultat de la sommation de l'activité unitaire des canaux ioniques.

- A.** Activité unitaire des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  membranaires activés par la dépolarisation et courant macroscopique associé. L'état de fermeture du canal est représenté par le trait plein, l'état d'ouverture est représenté par les pointillées. D'après Balke et al. (1992)
- B.** Modélisation statistique de l'ouverture stochastique d'un ou de plusieurs canaux ioniques activés par la dépolarisation membranaire et résultante macroscopique. L'état de fermeture du canal est représenté par le trait plein, l'état d'ouverture est représenté par les lignes en pointillées. Modifié d'après Nekouzadeh et Rudy (2007)

conséquence, des modifications substantielles de la fraction de détecteurs inactivés en fonction du niveau de calcémie dans la gamme clinique.

**Ce processus d'inactivation du couplage EC permet donc de manipuler le potentiel de membrane de la fibre musculaire en activant (ou pas) le mécanisme de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS : propriété très intéressante que j'ai largement exploitée durant ma thèse.**

### 1.2. Evènements calciques élémentaires (ECE)

Le courant ionique macroscopique (ou global) est composé de l'ensemble des courants unitaires généré par l'activité d'un ou de plusieurs canaux (Figure 21). De la même manière, les transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  – qui sont des variations globales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire – devraient être la résultante de la sommation spatio-temporelle d'évènements calciques élémentaires (ECE) reflète de l'activité d'un canal ou de plusieurs canaux RYR fonctionnant de manière cohérente.

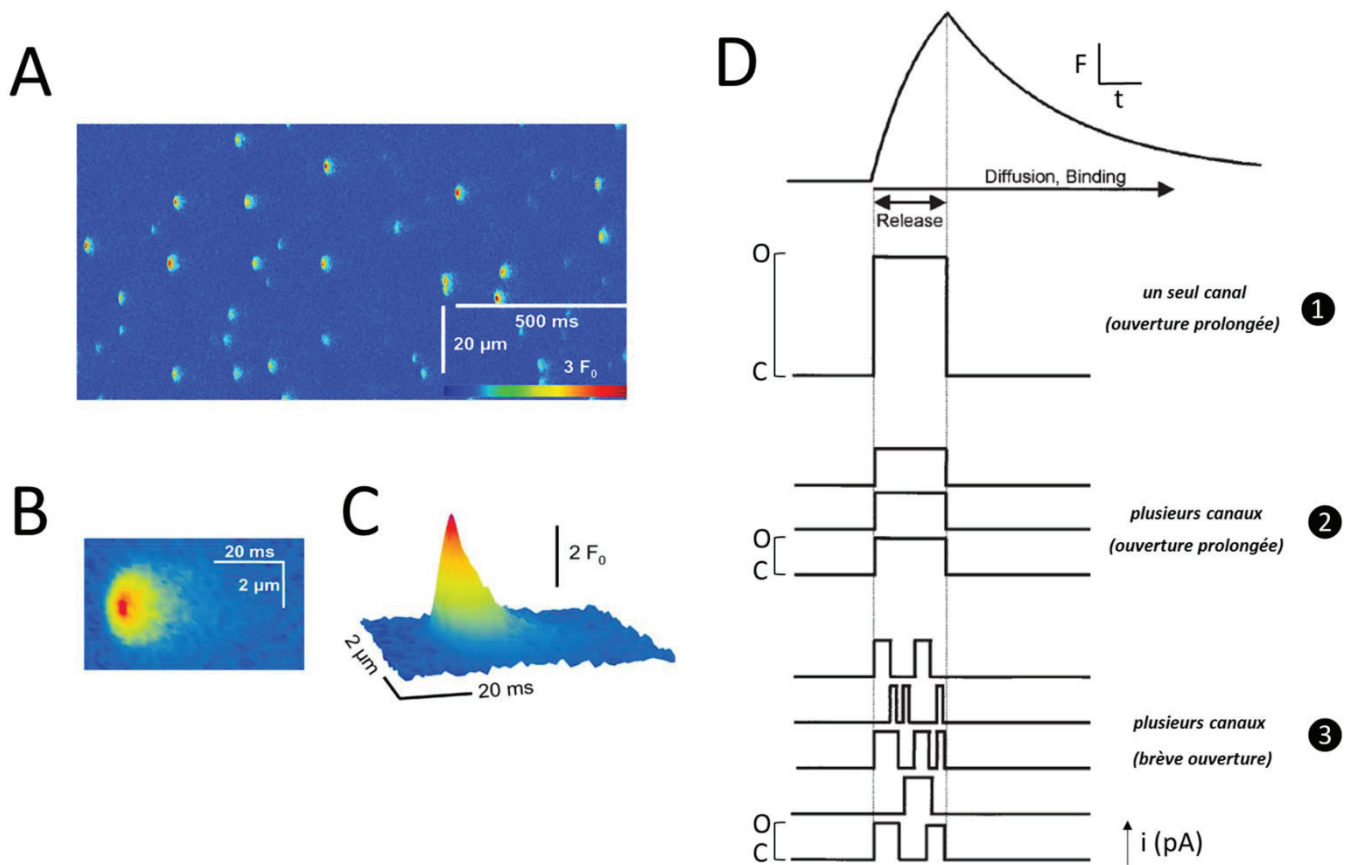
Depuis le début des années 1990, l'avènement de la microscopie confocale a permis la détection dynamique de signaux de fluorescence dans de très faibles volumes cellulaires (de l'ordre de  $0.3 \times 0.3 \times 1 \mu\text{m}^3$ ). Cette technique a rendu possible la détection de l'activité élémentaire des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires dans les cellules vivantes et a révolutionné la compréhension de leurs propriétés physiologiques (pour revues, voir Berridge 2006; Niggli et Shirokova 2007).

#### 1.2.1. Caractérisation et propriétés

Les étincelles (couramment dénommées aussi en français « *sparks* » )  $\text{Ca}^{2+}$ , observés pour la première fois dans les cardiomyocytes de rat, se présentent sous la forme d'augmentations spontanées et hautement localisées de la fluorescence de l'indicateur  $\text{Ca}^{2+}$  (Cheng et al. 1993). Ces signaux ont rapidement été considérés comme des événements calciques élémentaires (ECE) reflétant la libération locale de  $\text{Ca}^{2+}$  par un canal ou un petit groupe de canaux RYR. Quelques années après l'identification des *sparks*, des signaux encore plus brefs et localisés, les « *quarks* » plus à même de refléter l'activité attendue d'un seul canal, ont également été observés dans des préparations de cardiomyocytes (Lipp et Niggli 1996).

- **Les *sparks*  $\text{Ca}^{2+}$  dans la fibre musculaire d'amphibien**

Les *sparks*  $\text{Ca}^{2+}$  ont été très rapidement identifiés dans les fibres musculaires squelettiques de grenouille où ils apparaissent spontanément au repos (Klein et al. 1996) (Figure 22 A-C) et à fréquence de plus en plus élevée à mesure que le couplage EC est activé par des dépolarisations d'amplitude croissante. Qu'ils soient spontanés ou induits, les *sparks* se décomposent en deux phases : un pic initial de fluorescence suivie d'une phase de plateau de plus longue durée et d'intensité moins importante.



**Figure 22. Evènements calciques élémentaires spontanés dans la fibre musculaire d'amphibien**

- A. Image de microscopie confocale (mode « balayage de ligne » ou « *line scan* ») obtenue sur fibre musculaire de grenouille avec l'indicateur fluorescent fluo-4. D'après Csernoch (2007)
- B. Caractéristiques spatio-temporelles d'un *spark*  $\text{Ca}^{2+}$  enregistré sur l'image en (A.).
- C. Reconstitution 3D du signal moyen obtenu à partir de 18 sparks de (A.) aux mêmes caractéristiques spatio-temporelles. D'après Csernoch (2007)
- D. Evènements unitaires potentiellement à l'origine de la genèse d'un spark La phase de montée pourrait être issue de :
  - ① l'ouverture prolongée d'un seul canal
  - ② l'ouverture prolongée et simultanée de plusieurs canaux
  - ③ l'ouverture asynchrone en rafale d'un groupe de canaux
 D'après Schneider (1999)

En termes de propriétés spatio-temporelles, les *sparks* spontanés ont une FWHM (ou largeur à mi-hauteur) d'environ 1-2  $\mu\text{m}$  et une FDHM (ou durée à mi-hauteur) de 10 ms. En termes de propriétés cinétiques, ils présentent une phase de montée d'environ 8 ms et une phase de décroissance de 11 ms. Les différences d'amplitude et de distribution spatiale entre deux *sparks* ne sont pas significatives et seraient seulement dues aux positions relatives des sources à l'origine des signaux dans le plan focal (pour revues, voir Csernoch 2007; Niggli et Shirokova 2007).

A de fortes valeurs de dépolarisation, le nombre très important de *sparks* rend impossible la détection d'évènements isolés. L'inactivation partielle du couplage EC induite par un bref pré-pulse dépolarisant a cependant permis d'étudier la voltage-dépendance de ces signaux individuels pour une large gamme de potentiel (Lacampagne et al. 1996; Klein et al. 1997). L'amplitude et les cinétiques d'activation des *sparks* apparaissent indépendantes de la durée et de l'amplitude de stimulation. En revanche, ils sont d'autant plus nombreux que la durée et l'amplitude de la dépolarisation augmentent (Klein et al. 1996; Klein et al. 1997). Cette variation de fréquence des évènements individuels en fonction du potentiel explique la voltage-dépendance du décours et de l'amplitude des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  (Lacampagne et al. 1996; Klein et al. 1997). Dans ces préparations, l'augmentation transitoire du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique global est donc la résultante de l'accumulation de ces *sparks*, évènements discrets stéréotypés de libération de  $\text{Ca}^{2+}$ .

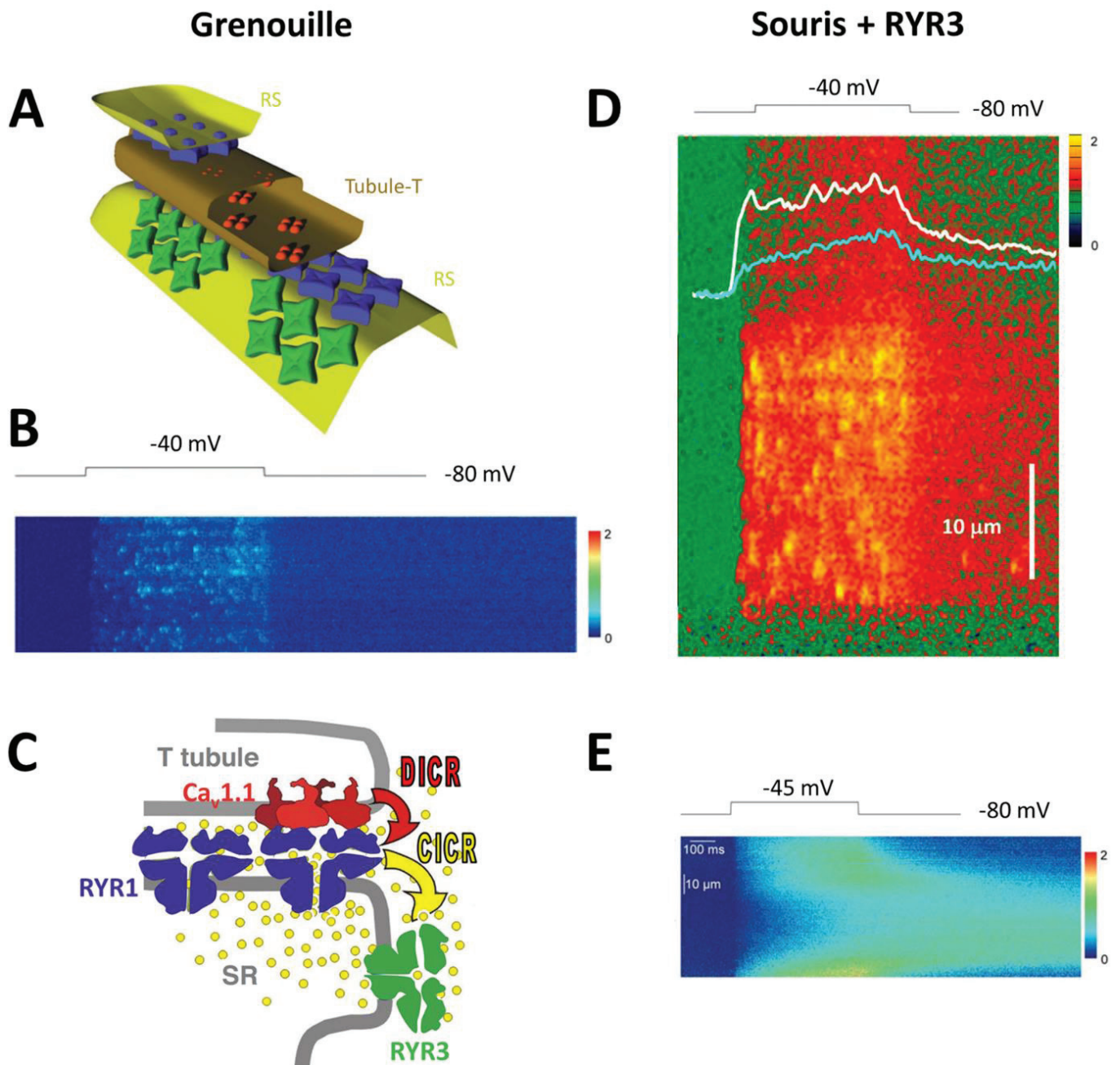
Schneider (1999) décompose les évènements unitaires hypothétiques à l'origine de la genèse d'un *spark* suivant plusieurs modèles (Figure 22 D):

- 1) Ouverture prolongée d'un seul canal RYR
- 2) Ouverture prolongée et simultanée de plusieurs canaux RYR
- 3) Ouverture asynchrone et en rafale d'un groupe de canaux RYR

Les travaux de modélisation de Ríos et Brum (2002) indiquent que les *sparks*  $\text{Ca}^{2+}$ , enregistrés dans les fibres musculaires squelettiques d'amphibien, proviendrait d'un flux pouvant atteindre 30 pA requérant l'activation de près de 60 RYRs.

- **Les ECEs dans la fibre musculaire de mammifère**

De manière inattendue, la situation dans les muscles de mammifère est plus compliquée et confuse. En effet, les premiers travaux sur l'étude des ECEs dans les fibres musculaires squelettiques de rat adulte ne sont pas concluants : les *sparks*  $\text{Ca}^{2+}$  sont rares dans une fibre au repos et la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendante se présente sous la forme d'une variation homogène de la fluorescence (Shirokova et al. 1998). Puis, des ECEs ont pu être mis en évidence dans les fibres musculaires au repos dans diverses situations de stress: fibres pelées mécaniquement (Kirsch et al. 2001), fibres soumises à un choc osmotique (Wang et al. 2005) et fibres perméabilisées (Weisleder et al. 2012). Dans ces



**Figure 23. Organisation des canaux RYR1 et RYR3 dans la fibre musculaire squelettique de grenouille et changement de phénotype des fibres musculaires squelettiques de souris exprimant l'isoforme RYR3 exogène**

**A.** Chez l'amphibien, les fibres musculaires squelettiques expriment les isoformes RYR1 à la membrane jonctionnelle du RS (ligne Z) et RYR3 à la membrane parajonctionnelle. D'après Felder et Franzini-Armstrong (2002)

**B.** Image de microscopie confocale (« balayage de ligne ») qui illustre la production de *sparks* activés par la dépolarisation dans la fibre musculaire de grenouille. D'après Legrand et al. (2008)

**C.** Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la production de *sparks* voltage-activés chez l'amphibien : La dépolarisation membranaire active les RYR1 (en bleu), canaux couplés à  $Ca_v1.1$  (en rouge) par le mécanisme de DICR (libération de  $Ca^{2+}$  induite par la dépolarisation). L'augmentation de  $Ca^{2+}$  cytosolique générée active les canaux non couplés, les RYR3 (en vert) par le mécanisme de CICR (libération de  $Ca^{2+}$  induite par le  $Ca^{2+}$ ). D'après Pouvreau et al. (2007)

**D.** et **E.** Images de microscopie confocale (balayage de ligne) de la fluorescence d'un indicateur calcique enregistrées dans des fibres musculaires de souris exprimant RYR3, lors de l'application d'une dépolarisation membranaire. (D.) La production de *sparks* amplifie la réponse à la dépolarisation (tracé blanc vs tracé bleu). (E.) Observation d'une vague  $Ca^{2+}$  post-dépolarisation.

D'après Legrand et al. (2008) ; Pouvreau et al. (2007)

conditions expérimentales, les ECEs sont constitués de *sparks* mais également d'un groupe de signaux fluorescents locaux aux propriétés différentes de celles des *sparks*. Ces évènements isolés observés chez le mammifère ont été définis comme des « *embers* » (Kirsch et al. 2001; Zhou et al. 2003) : ils sont stables (dépourvus de pic initial), de longue durée (FDHM de 10 à 50 ms avec des phases de montée ~10 ms et de décroissance ~15 ms) et de plus faible amplitude que les *sparks* (4 à 5 fois), ce qui indique qu'ils sont générés par un plus faible flux (~0.5 à 1 pA) qui pourrait correspondre à l'ouverture d'un seul RYR (pour revue, voir Csernoch 2007; Niggli et Shirokova 2007).

### 1.2.2. Structures impliquées

Chez l'amphibien, les fibres musculaires squelettiques expriment les isoformes RYR1 à la membrane jonctionnelle et RYR3 en position parajonctionnelle de la membrane du RS (Felder et Franzini-Armstrong 2002) et répondent aux dépolarisations membranaires par la production de *sparks* (Figure 23 A-B).

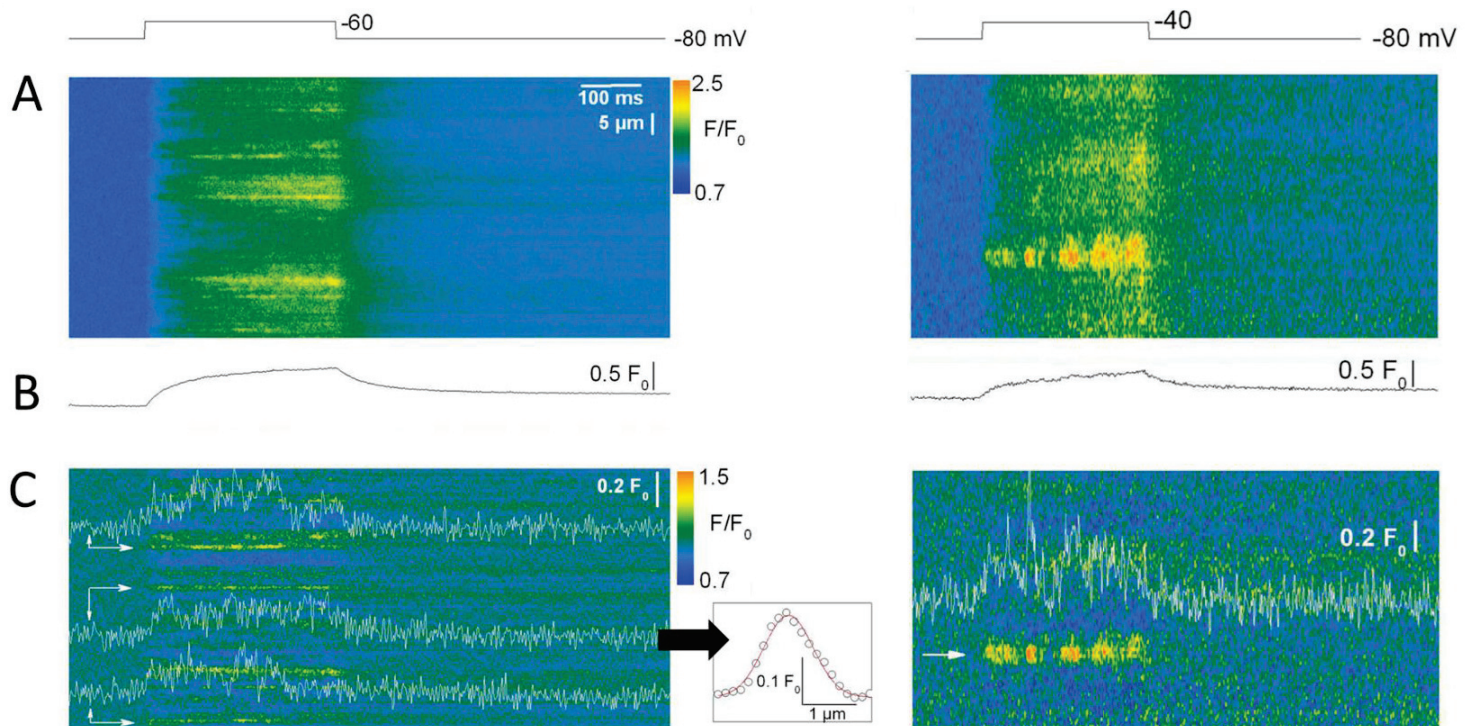
Chez le mammifère, les muscles squelettiques de l'embryon et du nouveau-né expriment les formes embryonnaires des isoformes RYR1 (ou RYR1 $\alpha$ ) et RYR3 (ou RYR3 $\beta$ ) et sont capables de produire des *sparks* mais uniquement de manière spontanée et indépendante du potentiel (Conklin et al. 1999; Shirokova et al. 1999). En revanche, les muscles adultes perdent l'isoforme RYR3 et leur capacité à produire des *sparks* (Sorrentino 1995; Flucher et al. 1999).

L'expression de RYR3 dans des myotubes dyspédiques – dans lesquels RYR1 fait défaut – entraîne l'apparition de *sparks* spontanés (Ward et al. 2000). De plus, la transfection d'ADNc de RYR3 dans le muscle de souris adulte recrée le phénotype de la grenouille où des *sparks* sont observés en abondance et permettent d'amplifier la réponse des fibres à la dépolarisation membranaire (Pouvreau et al. 2007) (Figure 23 D). En revanche, des travaux réalisés dans les mêmes conditions expérimentales montrent que l'expression de RYR3 déclenche l'apparition de vagues de Ca<sup>2+</sup> mais pas de *sparks* activés par la dépolarisation (Legrand et al. 2008) (Figure 23 E). Les raisons de ces résultats contradictoires restent obscures.

Les données de Pouvreau et al. (2007) suggèrent que la différence de signalisation Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendante entre la grenouille et la souris est due à la composition différente en isoformes de RYR. Or l'imagerie Ca<sup>2+</sup> réalisée sur des myotubes dysgénésiques montre que, en l'absence de Ca<sub>v</sub>1.1, les RYR1s sont tout autant capables de générer des *sparks* que les RYR3s (Zhou et al. 2006). Ces résultats sont confirmés par l'observation de *sparks* spontanés dans les fibres musculaires adultes de souris perméabilisées ou pelées (où tout ou partie de la membrane est retirée) (Kirsch et al. 2001; Weisleder et al. 2012). Ca<sub>v</sub>1.1 semble donc jouer un rôle critique dans la répression de l'ouverture spontanée et/ou induite par le Ca<sup>2+</sup> des canaux RYR1 sous forme de *sparks*.

En résumé, l'ensemble de ces données indiquent que :





**Figure 24. Hétérogénéité d'ouverture voltage-dépendante des canaux RYR1 dans la fibre musculaire squelettique de souris**

- A.** Variations de fluorescence de l'indicateur  $\text{Ca}^{2+}$  fluo-3 enregistrées par microscopie confocale (mode « balayage de ligne ») dans une fibre musculaire de souris en réponse à une dépolarisation à -60 mV (à gauche) ou à -40 mV (à droite).
- B.** Variations moyennes globales de la fluorescence ( $F/F_0$ ) obtenues à partir des images en (A.)
- C.** Evènements  $\text{Ca}^{2+}$  élémentaires identifiés sur les images en (A.). L'insert du milieu correspond à l'étendue spatiale de l'évènement local à gauche et la courbe superposée correspond à la courbe gaussienne correspondante permettant l'estimation de la FWHM.

D'après Csernoch et al. (2008)

- Dans le muscle squelettique de mammifère, le mécanisme physiologique d'activation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  est le processus de DICR (libération de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la dépolarisation). Ce mécanisme correspond à l'ouverture des RYR1s en réponse aux changements conformationnels voltage-dépendants de  $\text{Ca}_v1.1$  et permet un contrôle étroit de l'activation des canaux RYR1 (Schneider et Chandler 1973; Eduardo Rios et Brum 1987; Tanabe et al. 1988; Nakai et al. 1996).
- Dans le muscle squelettique d'amphibien, la genèse de *sparks* en réponse à la dépolarisation de la membrane est spécifique de l'isoforme RYR3. Les RYR3s, n'étant pas couplés à  $\text{Ca}_v1.1$ , s'ouvrent à la suite de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par les RYR1s via le mécanisme de CICR (Sorrentino et Reggiani 1999; et pour revue, voir Murayama et Ogawa 2002) (Figure 23 C).

### 1.2.3. Hétérogénéité d'ouverture voltage-dépendante

L'ensemble des résultats obtenus sur le muscle squelettique de mammifère décrit plus haut indique que 1) ce muscle ne produit pas de *sparks* en conditions physiologiques et que 2) la détection d'une activité unitaire voltage-dépendante des canaux RYR s'avère être beaucoup plus difficile que chez l'amphibien (pour revue, voir Ríos 2018).

A l'heure actuelle, seuls les travaux de Csernoch et al. (2004, 2008) ont permis la détection d'ECEs voltage-activés dans la fibre musculaire squelettique de mammifère. Ceci est d'autant plus paradoxal que l'étude approfondie *in vivo* des ECEs activés au cours du couplage EC est déterminante pour la compréhension des mécanismes de contrôle et de régulation de la synchronisation des RYR1s et donc pour la compréhension de la fonction du muscle squelettique dans des conditions normales et pathologiques.

En 2004, Csernoch et al. identifient pour la première fois des ECEs voltage-dépendants dans la fibre musculaire de rat. Les signaux sont détectés lors de faibles dépolarisations de la membrane et présentent les caractéristique d'*embers* isolés : faible amplitude, longue durée et cinétiques lentes. De plus, leur fréquence et leurs propriétés spatio-temporelles varient avec la valeur de dépolarisation. Brièvement, ils sont de plus longue durée et présentent des cinétiques plus rapides quand la valeur de la dépolarisation augmente. Par contre, l'amplitude des signaux est conservée quelle que soit le niveau de dépolarisation ( $\Delta F/F_0 = 0.19 \pm 0.01$ ) ce qui correspondrait à l'ouverture d'un seul canal ( $\sim 0.5$  pA) (Kettlun et al. 2003). De plus, les auteurs montrent que le flux  $\text{Ca}^{2+}$  global obtenu par la sommation de ces évènements discrets reproduit les données expérimentales.

En 2008, les travaux de Csernoch et al. sur fibres musculaires squelettiques intactes de souris témoignent de l'existence d'ECEs activés par le couplage EC (Figure 24). Ces ECEs détectés au cours de dépolarisations membranaires de 500 ms présentent également des propriétés – amplitude

( $\Delta F/F_0 \sim 0.2$ ), durée ( $\sim 400$  ms) et FWHM ( $\sim 2 \mu\text{m}$ ) – similaires à celles des « *embers* » (González et al. 2000; Zhou et al. 2003).

Dans l'ensemble, ces signaux de fluorescence pourraient donc refléter l'activité unitaire des canaux RYR1 au cours du couplage EC dans la fibre musculaire de mammifère. Cependant, la difficulté d'extraire ces événements du signal global de fluorescence généré par l'indicateur calcique en réponse à la dépolarisation a considérablement limité les progrès ultérieurs.

## 2. La question du potentiel de membrane du RS

Dans les cellules vivantes, l'activité des canaux ioniques membranaires génère des changements de potentiel essentiels à de nombreuses fonctions biologiques.

A l'état stationnaire, les concentrations relatives d'un ion de part et d'autre d'une membrane sont maintenues et déterminent le potentiel d'équilibre de cet ion:

$$\text{Equation de Nernst : } E_x = R.T/z.F.\log_{10}([X^+]_{\text{externe}}/[X^+]_{\text{interne}})$$

A cette valeur de potentiel, le flux net (influx - efflux) de cet ion à travers un canal sélectif dans la membrane est nul (Hodgkin et al. 1952; Julian et al. 1962).

Ainsi, la différence de potentiel électrique entre l'intérieur et l'extérieur d'une membrane (ou potentiel transmembranaire,  $E_m$ ) à un instant  $t$  est la résultante de la somme des produits du potentiel d'équilibre par la perméabilité (ou conductance) membranaire relative de chaque espèce ionique présente :

$$E_m = R.T/z.F \log_{10} (\sum P_x \cdot [X]_{\text{externe}}/[X]_{\text{interne}})$$

Les flux ioniques de part et d'autre d'une membrane biologique résultant de la variation de la perméabilité membranaire, ils sont étroitement corrélés aux changements de potentiel de cette membrane.

Dans le muscle strié squelettique, le couplage EC implique des événements électrochimiques au niveau des deux systèmes membranaires triadiques : le réseau tubulaire-T et celui du RS.

Les propriétés électriques et ioniques de la membrane tubulaire-T ainsi que son rôle dans l'activation du couplage EC sont aujourd'hui bien connus sur les plans théoriques et expérimentaux (voir *section II.1.2. Le récepteur aux dihydropyridines*). Par contre, si depuis le début des années 1970, de nombreuses approches ont tenté de caractériser et de modéliser les éventuels changements de potentiel membranaire du RS au cours de l'activité musculaire, ses propriétés électrochimiques *in vivo* sont encore méconnues en raison de son inaccessibilité expérimentale aux approches électrophysiologiques.

## 2.1. Libération de $\text{Ca}^{2+}$ et contre-courants ioniques associés

- **Libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et dépolarisation du RS**

C'est principalement l'utilisation de sondes fluorescentes potentiométriques (pour revue, voir Endo 1977) qui a permis de tester la théorie selon laquelle la membrane du RS serait dotée d'une activité électrique au cours du couplage EC. Des mesures de biréfringence (Baylor et Oetliker 1974) et l'utilisation du Nile Blue A, marqueur phospholipidique fluorescent (Bezanilla et Horowicz 1975; Vergara et al. 1978), ont permis d'enregistrer sur fibres musculaires isolées de grenouille un signal optique potentiel-dépendant, lent et transitoire. Ce signal a été initialement interprété comme la traduction d'un phénomène de dépolarisation membranaire au cours du couplage EC. Les auteurs soulignent l'impossibilité de la membrane de surface à engendrer un tel signal. Ils affirment que ce signal ne peut provenir que de la membrane du RS dont la surface est de 75 à 150 fois plus importante que celle de la membrane de surface. Pour eux, il est raisonnable de penser à un changement de potentiel de la membrane du RS de l'ordre de +135 mV (luminal négatif vs cytosol) en accord avec une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire de plus de 35  $\mu\text{M}$  en réponse à un potentiel d'action (Baylor et Oetliker 1974).

Ces résultats suggèrent que, au cours du couplage EC, la perméabilité membranaire du RS augmenterait spécifiquement et exclusivement pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, si tel était le cas, le potentiel de la membrane du RS atteindrait très rapidement ( $< 1$  ms après l'apparition du PA) les valeurs du potentiel d'équilibre de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  ( $E_{\text{RS}} \sim E_{\text{Ca}} \sim +120$  mV) (Gillespie et Fill 2008) et le flux net de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers le RS cesserait instantanément, compromettant ainsi la possibilité de maintenir un signal calcique nécessaire à la contraction.

Au delà de l'incohérence théorique de ces résultats, des études complémentaires sur fibres isolées révèlent l'étrange similarité entre les propriétés (voltage dépendances, amplitudes et cinétiques) des signaux optiques de biréfringence et celles des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces travaux posent la question de la nature véritable du phénomène biologique à l'origine de ces signaux optiques (Kovács et al. 1983).

Finalement, la variabilité des données enregistrées, l'incertitude concernant la fiabilité d'une mesure stricte du potentiel de membrane du RS par ces méthodes ainsi que la méconnaissance de certaines caractéristiques biophysiques du canal RYR n'ont pas permis à l'époque de faire progresser de manière déterminante la question de l'activité électrique membranaire du RS et la question est depuis restée expérimentalement non testée.

- **Libération de Ca<sup>2+</sup> et contre-courants ioniques**

A partir du début des années 1980, la mise en évidence de l'existence de contre-courants ioniques réticulaires concomitants à la libération de Ca<sup>2+</sup> remet en question l'ensemble des résultats précédents suggérant la possible dépolarisation du RS au cours du couplage EC.

La détermination des compositions ioniques (notamment Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>) des citernes terminales de RS, par la méthode de microanalyse aux rayons X, a d'abord permis d'identifier que, dans une cellule musculaire au repos, toutes les espèces ioniques (sauf le Ca<sup>2+</sup>) sont à l'équilibre de part et d'autre de la membrane du RS ( $[X^+]_{\text{cyto}}=[X^+]_{\text{RS}}$  et  $E_{\text{RS}}\sim 0$  mV). Par contre, lors de l'activation du couplage EC, la déplétion en Ca<sup>2+</sup> du RS serait couplée à une augmentation significative des concentrations lumineales de Mg<sup>2+</sup> et de K<sup>+</sup> (Somlyo et al. 1977; Somlyo et al. 1981). Ces résultats sont soutenus par des travaux sur vésicules de RS qui montrent que la libération de Ca<sup>2+</sup> ne peut avoir lieu qu'en présence d'autres ions perméants, principalement le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup>, car ils permettraient de compenser la perte de charges positives lumineales due à l'efflux Ca<sup>2+</sup> (Moutin et Dupont 1988; Abramcheck et Best 1989). En d'autres termes, en l'absence d'autres espèces ioniques susceptibles de traverser rapidement la membrane du RS, il n'y a pas de rééquilibration des charges et la libération de Ca<sup>2+</sup> est inhibée par la différence de potentiel développée (luminal négatif vs cytosol).

La perméabilité membranaire du RS faible au repos ( $E_{\text{RS}}\sim 0$  mV) augmenterait donc, de manière transitoire au cours de l'activité musculaire, non seulement pour le Ca<sup>2+</sup> mais également pour d'autres espèces ioniques (Meissner et McKinley 1982; Meissner 1983; Somlyo et al. 1985).

Depuis ces premiers résultats, de nombreuses études suggèrent que, grâce à l'existence de ces contre-courants cationiques, la membrane du RS serait maintenue à un potentiel stationnaire de 0 mV et ceci quel que soit le degré d'activité musculaire (Smith et al. 1988; Fink et Veigel 1996; Oetliker 1989; Gillespie et Fill 2008b).

Récemment, Berti et al. (2017) ont modélisé l'impact des différents flux ioniques sur le potentiel membranaire du RS au cours du cycle cardiaque. Leurs données suggèrent que les changements de concentrations ioniques (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Cl<sup>-</sup>) nécessaires à la libération de Ca<sup>2+</sup> sont très faibles (quelques pourcents de leur valeurs de repos) et qu'elles n'induiraient qu'une petite variation du potentiel de membrane du RS ( $\sim 1-2$  mV). De plus, entre chaque battement cardiaque, les concentrations de toutes les espèces ioniques (Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Cl<sup>-</sup>) dans chacune des régions cellulaires considérées (RS longitudinal et citernes terminales, espace jonctionnel cytosolique et cytosol non jonctionnel) s'auto-ajusteraient pour revenir systématiquement à leur état d'équilibre.

## 2.2. Identification et caractérisation des canaux impliqués

Si les RYRs ont été identifiés depuis longtemps comme les canaux ioniques responsables de l'efflux  $\text{Ca}^{2+}$ , la question de la nature ionique des contre-courants associés ainsi que de l'identité moléculaire de leur(s) voie(s) de passage reste en suspens.

### 2.2.1. Les canaux potassiques

#### 2.2.1.1. Les canaux RYR

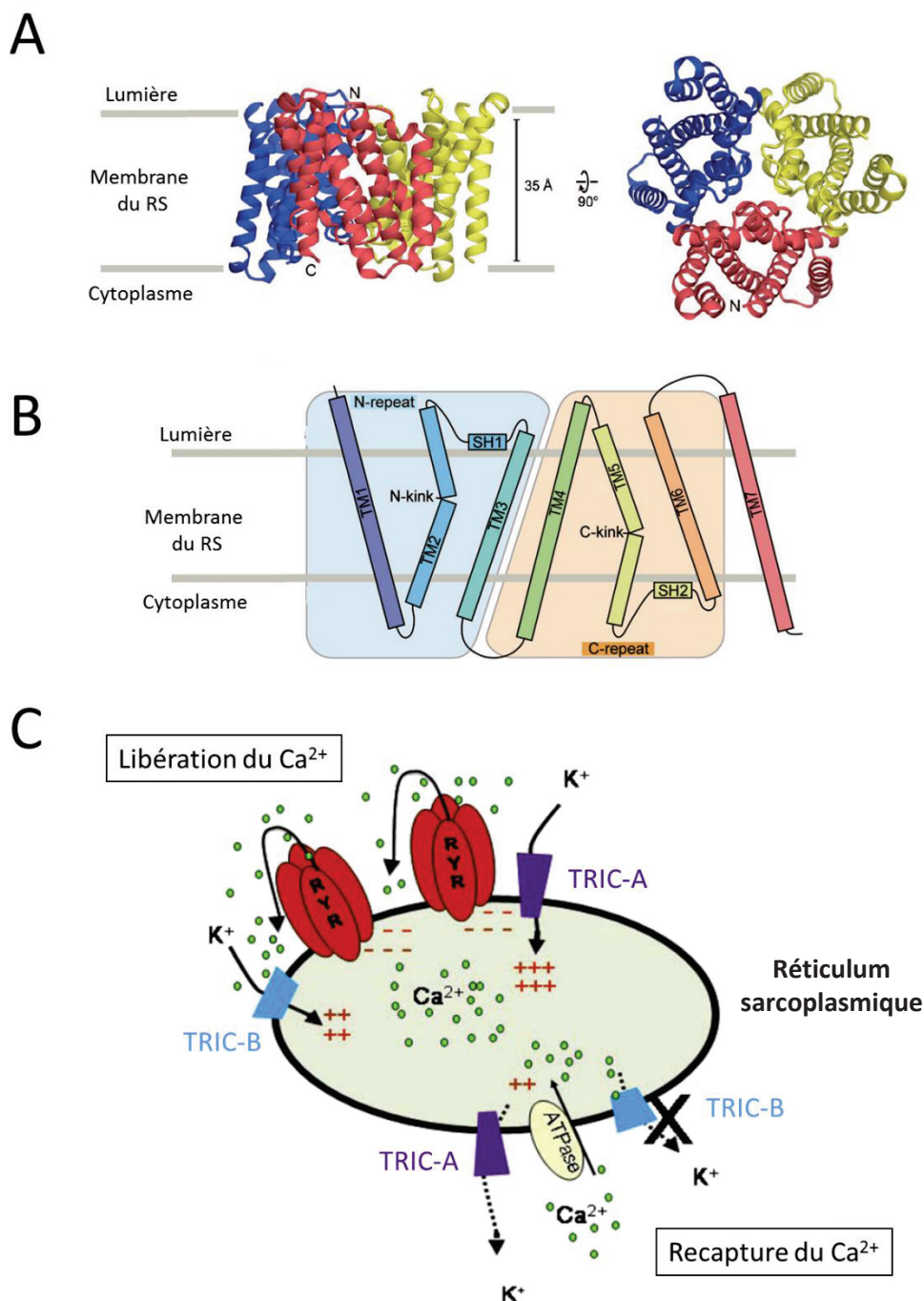
Les propriétés unitaires du canal RYR *in vitro* sont aujourd'hui bien caractérisées grâce aux études menées sur canal isolé (*section II.1.2.2. Caractéristiques biophysiques*) (pour revue, voir Williams 2002). Puisque les canaux RYR sont très peu sélectifs –avec un rapport de conductance  $g_{\text{K}}/g_{\text{Ca}} \sim 6-7$  – leur ouverture physiologique devrait entraîner le passage de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) et monovalents ( $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ ) (Imagawa et al. 1987; Lai et al. 1988; Smith et al. 1988; Anderson et al. 1989; Tinker et al. 1992; Gillespie et al. 2005). En conséquence, l'influx de  $\text{K}^+$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  à travers le RYR serait tel qu'il porterait le potentiel d'inversion du canal ( $E_{\text{rev}} \sim +2.7$  mV) à des valeurs très éloignées du potentiel d'équilibre de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  ( $E_{\text{Ca}} \sim +120$  mV) (Tinker et al. 1992; Gillespie et al. 2008).

Les travaux de Guo et al. (2013) sur cardiomyocytes perméabilisés indiquent que lorsque le contre-courant cationique à travers les canaux  $\text{K}^+$  est réduit ( $\sim 88\%$ ) et que celui à travers les canaux  $\text{Cl}^-$  est bloqué, le contre-courant nécessaire à une signalisation  $\text{Ca}^{2+}$  normale est maintenu. Ces résultats ajoutés aux propriétés unitaires du canal RYR ont conduit les auteurs à suggérer que, à moins que leur sélectivité ne change *in vivo*, les RYRs ouverts devraient être capables de supporter eux-mêmes le contre-courant cationique nécessaire et suffisant à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 2.2.1.2. Les canaux TRIC

De nombreuses approches apportent pourtant la preuve expérimentale de l'existence de canaux réticulaires monovalents cationiques, autres que le RYR, qui supporteraient le contre-courant nécessaire à l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS (voir par exemple Miller 1978; Coronado et al. 1980; Abramcheck et Best 1989; Wang et Best 1994; Picard et al. 2002).

Les canaux TRIC (pour *trimeric intracellular cation*), également connus sous le nom de mitsugumin 33, ont été découverts en 2007 dans le cadre de travaux de criblage visant à identifier de nouvelles molécules intervenant dans le maintien de l'homéostasie  $\text{Ca}^{2+}$  (Yazawa et al. 2007). Chez le mammifère, ce sont des protéines ubiquitaires exprimées sous deux isoformes (TRIC-A et TRIC-B) dont les structures primaires présentent 40% d'homologie. Ils sont retrouvés dans les deux types de muscles striés. Dans le muscle squelettique, la stœchiométrie TRIC-A :TRIC-B :RYR1 est  $\geq 5 : 1 : 1$  (O'Brien et al. 2019). Dans le muscle cardiaque, l'isoforme principal est TRIC-B (Pitt et al. 2010).



**Figure 25 : Structure et fonction des canaux TRIC**

- A.** Structure des canaux TRIC (dans le plan de la membrane du RS et du côté luminal) reconstituée à partir d'études de cristallographie. Chaque sous-unité de l'homotétramère est représentée par une couleur. D'après Kasuya et al. (2016)
- B.** Chaque monomère de TRIC est constitué de sept segments transmembranaires (TM1-TM7). Les hélices TM2 et TM5 s'enroulent au niveau de leurs résidus glycine (N- et C-« kink »). Les domaines d'interaction SH1 et SH2 entre monomères sont situés respectivement à proximité des TM2 et TM5. D'après Kasuya et al. (2016)
- C.** Représentation schématique du fonctionnement des mécanismes d'activation de TRIC-A et de TRIC-B au cours de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. TRIC-A est un canal  $\text{K}^+$  voltage-dépendant 1) activé par l'apparition de charges négatives à la face luminal de la membrane du RS lors de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et 2) inhibé par les charges positives qui apparaissent lors de la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par les pompes SERCA. TRIC-B est un canal  $\text{K}^+$   $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant 1) activé par l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  lors de sa libération par le RS et 2) inhibé par l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal quand il est recapturé. D'après Pitt et al. (2010)

Ce sont des protéines réticulaires (jonctionnelles et longitudinales) homotrimériques de 33 kDa (Figure 25 A). Chaque monomère est un canal fonctionnel composé de sept segments transmembranaires (TM1-TM7) et dont les hélices TM2 et TM5 s'entremêlent au niveau de leurs résidus Glycine ; cette conformation de la protéine est essentielle à son activité canal ionique (Figure 25 A, B). A la face luminale de la protéine, chaque monomère présente un domaine SH1 et un domaine SH2 capables d'interagir respectivement avec les domaines SH2 et SH1 du monomère voisin (Figure 25 B). La structure trimérique des canaux TRIC révèle également la présence de trois « fenestrations latérales » (une par interface entre monomère), donnant un accès direct au centre du canal. Ces régions représentent des sites de fixation pour des régulateurs potentiels tels que les ions  $\text{Ca}^{2+}$  principalement, mais également les ions  $\text{H}^+$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (Kasuya et al. 2016; Yang et al. 2016; Su et al. 2017).

L'étude des propriétés unitaires de ces canaux TRIC purifiés et réincorporés en bicouche indique que ce sont des canaux cationiques monovalents et principalement potassiques (Yazawa et al. 2007). L'activité des TRIC-A semble être fortement dépendante du potentiel de membrane : plus la face luminale du RS est chargée négativement, plus leur  $P_o$  (probabilité d'ouverture) est importante (Pitt et al. 2010).

Les canaux TRIC-B apparaissent sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  : ils sont actifs lorsque les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique augmentent et sont inhibés par le  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $> 100 \mu\text{M}$ ). Les TRIC-B sont rarement ( $\sim 25\%$ ) complètement ouverts, ils présentent plusieurs degrés d'ouverture (ou états de sous-conductance) ce qui augmenterait leur capacité à compenser les déséquilibres ioniques (Pitt et al. 2010; Matyjaszkiewicz et al. 2015).

L'ensemble de ces données fait des protéines TRIC un candidat moléculaire idéal pour la régulation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS.

Les défauts physiopathologiques observés dans les modèles de souris déficientes en TRIC constituent des résultats supplémentaires suggérant que ces canaux interviendraient dans la régulation de l'homéostasie  $\text{Ca}^{2+}$  (pour revue, voir Venturi et al. 2013). Les souris TRIC-A KO (*Tric-a*<sup>-/-</sup>) sont viables mais présentent une perméabilité réticulaire au  $\text{K}^+$  diminuée, des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  aux cinétiques ralenties, ainsi qu'une altération de la signalisation des *sparks* (amplitude diminuée, fréquence et durée augmentées). Alors que les embryons de souris double KO (*Tric-a*<sup>-/-</sup>; *Tric-b*<sup>-/-</sup>) meurent d'insuffisance cardiaque, les souris TRIC-B KO (*Tric-b*<sup>-/-</sup>) meurent d'insuffisance respiratoire peu de temps après leur naissance (voir par exemple, Yazawa et al. 2007). De manière intéressante, lorsque la protéine TRIC-A est surexprimée spécifiquement dans les muscles lisses de souris, elle induit une diminution du potentiel de repos de la membrane plasmique des cellules endothéliales (Tao et al. 2013). En effet, dans ces conditions expérimentales, l'augmentation de la fréquence des *sparks* indique une hyperactivité des canaux RYR. Cette augmentation de la libération spontanée de  $\text{Ca}^{2+}$  induirait



l'activation soutenue des canaux  $K^+$  membranaires  $Ca^{2+}$ -activés (TRIC-B) à l'origine de cette hyperpolarisation de la membrane de surface.

A partir de l'ensemble de ces résultats, l'activité des canaux TRIC-A et TRIC-B a été modélisée par le laboratoire de R. Sitsapesan (Figure 25 C). Ainsi au cours de la libération de  $Ca^{2+}$ , les cations monovalents (et plus particulièrement le  $K^+$ ) traverseraient la membrane du RS via les canaux TRIC-A principalement afin de compenser la perte de charges positives. De manière indépendante et simultanée, l'augmentation de  $Ca^{2+}$  cytosolique activerait l'ouverture progressive des canaux TRIC-B entraînant un influx cationique monovalent supplémentaire qui viendrait renforcer l'entrée de charges positives dans la lumière du RS. Et réciproquement, lorsque le  $Ca^{2+}$  est recapturé par les pompes SERCA, l'apparition de charges positives à la face luminale du RS induirait la fermeture des TRIC-A à l'origine de la diminution progressive de l'influx de cations (jusqu'à l'atteinte de leur potentiel d'équilibre). De plus, l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  luminal ( $> 100 \mu M$ ) couplée à la diminution de sa concentration cytosolique entraîneraient la fermeture des canaux TRIC-B (Pitt et al. 2010; O'Brien et al. 2019).

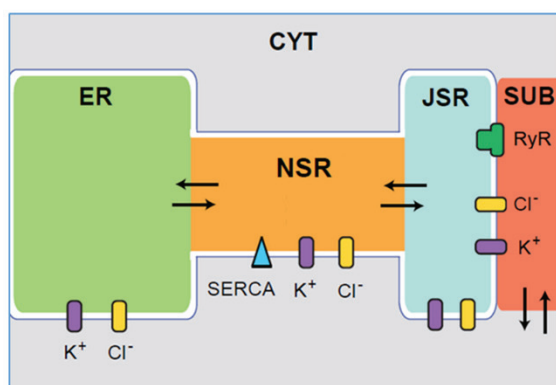
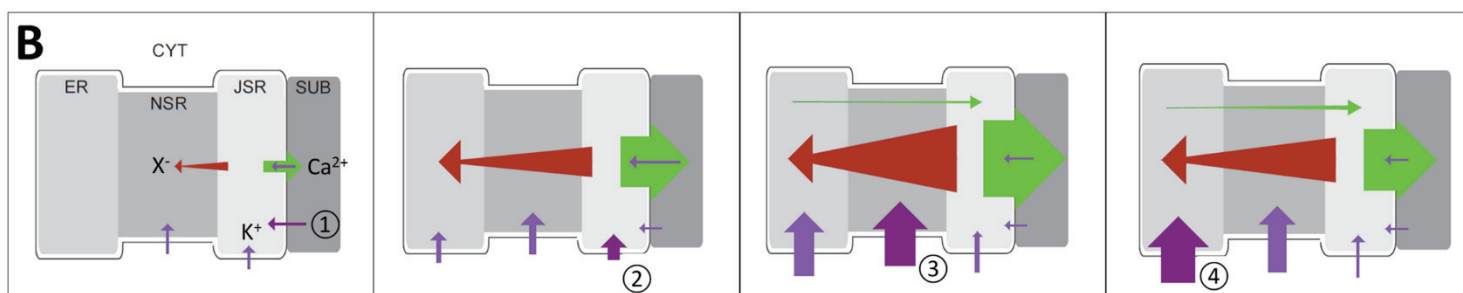
#### 2.2.1.3. Autres

Les protéines mitsugumine 23, pannexine, préséniline et TRP (pour *transient receptor potential*) sont autant de protéines canal insérées dans la membrane du RS. Ils interviennent probablement également, à moindre mesure, dans la régulation de l'homéostasie  $Ca^{2+}$  via leur activité canal cationique mais leur rôle fonctionnel n'a pas encore été complètement caractérisé à l'heure actuelle (pour revue, voir Takeshima et al. 2015).

#### 2.2.2. Les canaux chlores

A la suite des travaux de Miller (1978), de nombreuses études ont montré qu'il existait plusieurs types de canaux  $Cl^-$  réticulaires aux propriétés unitaires variées et aux nombreux régulateurs potentiels (pour revue, voir Kourie 1997). Tandis que certains canaux sont  $Ca^{2+}$ -dépendants (Dulhunty et al. 2002), d'autres semblent être régulés par le pH (Kourie 1999) et la plupart est sensible au potentiel (Kawano et Hiraoka 1993; Townsend et Rosenberg 1995). Certains canaux  $Cl^-$  sont régulés par l'ATP (Ahern et Laver 1998), la PKA (Kawano et al. 1992) ou la CaMKII (Kawano et Hiraoka 1993) qui, de manière intéressante, sont également des régulateurs de l'activité du RYR (pour plus de détails, voir *section II.1.2.2.3. Libération de  $Ca^{2+}$  et régulations*).

La diversité des canaux  $Cl^-$  suggère qu'ils ont de nombreuses fonctions et rend l'étude différentielle de leur propriété unitaire (sur bicouche lipidique) difficile.

**A****B**

**Figure 26. Le réseau intracellulaire de contre-courants en cascade**

**A. Schéma du modèle à 5 compartiments** : le RS jonctionnel (JSR), le RS non jonctionnel (NSR), le réticulum endoplasmique (ER), le microdomaine cytosolique jonctionnel (SUB) et le cytosol (CYT). Les canaux (RYR,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) et la pompe SERCA permettent le flux d'ions à travers la membrane du RS, les flux d'ions entre les compartiments contigus sont représentés par des flèches. Le plus gros compartiment, labellisé « ER », peut être considéré comme le RS fenestré et constitue un large réservoir d'ions.

**B. Le réseau intracellulaire de contre-courants en cascade**

① La libération de  $Ca^{2+}$  par le RS (flèche verte) commence, laissant plus d'anions que de cations dans le JSR. Les anions diffusent (flèche rouge) du JSR jusqu'au NSR induisant l'apparition de charges négatives dans le JSR. Les RYRs et les canaux  $K^+$  (flèches violettes) de la membrane du JSR sont les premiers canaux à supporter le contre-courant.

② La libération de  $Ca^{2+}$  s'accroît et les canaux  $K^+$  de la membrane du JSR atteignent un pic de contre-courant. L'influx d'anion dans le NSR se dirige progressivement vers l'ER. Les canaux  $K^+$  dans les membranes du NSR et du ER fournissent un contre-flux cationique significatif nécessaire à ce mouvements d'anions.

③ Quand le pic de libération de  $Ca^{2+}$  est atteint, la majorité du contre-courant fourni provient des canaux  $K^+$  localisés dans la membrane du NSR. Les gradients de  $Ca^{2+}$  à l'intérieur du RS conduisent les ions  $Ca^{2+}$  des compartiments ER et NSR vers le JSR. Les courants anioniques intra-RS sont au maximum.

④ La libération de  $Ca^{2+}$  ralentit. Les canaux  $K^+$  du ER supportent la majorité du contre-courant cationique, et la libération de  $Ca^{2+}$  reste importante. Le flux de  $Ca^{2+}$  intra-RS du NSR vers le JSR augmente. Le flux de  $Ca^{2+}$  des pompes SERCA et du ER vers le JSR permet de restaurer les concentrations de repos de  $Ca^{2+}$  dans le JSR.

D'après Zsolnay et al. (2018)

Chez les mammifères, de nombreux gènes codent pour les canaux  $\text{Cl}^-$  et certains d'entre eux ont été suggérés comme impliqués dans le processus de compensation de charges indispensable à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, l'identité moléculaire, les propriétés biophysiques ainsi que le rôle physiologique de chaque type de canal anionique inséré dans la membrane du RS restent encore inconnus.

### 2.2.3. Les canaux protons

La libération de  $\text{Ca}^{2+}$  est accompagnée d'une acidification luminale réticulaire (Pape et al. 1990; Kamp et al. 1998) tandis que la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  est couplée à l'extrusion de protons  $\text{H}^+$  par la SERCA (Inesi et Tadini-Buoninsegni 2014). Ces données suggèrent que des mouvements de  $\text{H}^+$  pourraient contribuer en faibles proportions (5-10%) aux contre-courants cationiques requis pour la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kamp et al. 1998). Si certains travaux suggèrent l'implication de certaines protéines, les processus impliqués dans la régulation du pH réticulaire au cours des cycles contraction/relaxation n'ont pas encore été clairement définis. Certaines études révèlent notamment la présence des échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (Okkenhaug et al. 2006) et  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (Kuum et al. 2012a; Kuum et al. 2012b) dans la membrane du RS et suggèrent leur implication respective dans la capture de  $\text{H}^+$  en échange du relargage de  $\text{Cl}^-$  ou de  $\text{K}^+$ .

### 2.3. « Le réseau intracellulaire de contre-courants en cascade »

Une vision plus nuancée de la contribution relative des canaux TRIC, RYR et  $\text{Cl}^-$  a été récemment développée par Zsolnay et al. (2018) qui suggèrent qu'aucun type de canal en particulier ne serait essentiel au contre-courant. Leur modèle développe le concept de « réseau intracellulaire de contre-courants en cascade » à travers le RS tout entier comme soutien efficace de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 26). Brièvement, les auteurs suggèrent que l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  serait principalement contre-balancé par la diffusion rapide de charges négatives intra-RS, et que c'est elle qui serait à l'origine de contre-courants locaux. En effet, la forte concentration d'anions dans la lumière du RS jonctionnel induirait leur déplacement vers le RS non-jonctionnel avec une conductance beaucoup plus élevée que celle des ions à travers les canaux RYR, TRIC et  $\text{Cl}^-$ . Et progressivement, l'apport de charges négatives provoquerait l'entrée locale de cations à travers les canaux TRIC (et d'un efflux d'anions à travers les canaux  $\text{Cl}^-$ ) à distance du RS jonctionnel.

## CHAPITRE 4 : BIOSENSEURS FLUORESCENTS, PRINCIPES ET APPLICATIONS

Les sondes fluorescentes codées génétiquement (ou biosenseurs fluorescents<sup>1</sup>) sont des dispositifs composés d'un élément de reconnaissance biologique – domaine macromoléculaire capable de détecter un analyte spécifique – et d'au moins une protéine fluorescente (FP, ou fluorophore). Elles sont ainsi capables de convertir la détection de l'analyte en signal fluorescent. En d'autres termes, l'interaction de la sonde protéique avec le composé pour lequel elle a été conçue entraîne des modifications de ses propriétés optiques.

Les biosenseurs fluorescents sont donc des protéines recombinantes qui présentent plusieurs avantages justifiant leur élaboration, utilisation et application croissantes :

- Ils peuvent être conçus facilement via la fusion par biologie moléculaire des ADNc codant pour le(s) domaine(s) sensible(s) (ou détecteur) et pour la (les) FP(s).
- Leurs propriétés (sélectivité, affinité, « *dynamic range*<sup>2</sup>», cinétiques) vis-à-vis du processus cellulaire d'intérêt peuvent dans une certaine mesure être modulées et optimisées par biologie moléculaire.
- Ils peuvent être introduits de manière non-invasive dans les cellules *in vitro* et *in vivo* par transfection virale, adénovirale ou plasmidique.
- L'introduction dans le vecteur d'expression (virus, adénovirus ou plasmide) d'un promoteur tissu-spécifique et/ou d'une séquence d'adressage à un compartiment subcellulaire permet de cibler la localisation du biosenseur qui sera ainsi capable de rapporter l'activité d'un seul type cellulaire et/ou d'une seule région subcellulaire d'intérêt.
- Quand ils s'expriment, ils sont généralement présents de manière stable dans la cellule.

En revanche, les propriétés spectrales des FPs et les mécanismes détecteurs peuvent être affectés par de nombreux paramètres cellulaires tels que le pH, la température ou les concentrations de certains ions qui peuvent biaiser la réponse fluorescente enregistrée. C'est pourquoi, la caractérisation de chaque biosenseur fluorescent doit être rigoureusement effectuée dans le système cellulaire d'application afin de s'assurer que sa réponse dépend seulement du paramètre étudié.

*Il est important de noter, pour la suite de la lecture de ce manuscrit, que 1) la terminologie « biosenseurs fluorescents » sera utilisée pour désigner les sondes fluorescentes codées génétiquement, bien qu'en toute rigueur, le terme de « biocapteurs fluorescents » soit le terme correct ; et 2) Pour des raisons de simplicité de terminologie, la dimension d'« amplitude relative maximale de la réponse » d'un biosenseur (ou « *dynamic range* ») sera exprimée sous le terme de « rendement ».*

A

FP	Couleur spectrale	Excitation (nm)	Emission (nm)	Brillance	Photostabilité	pKa	Chromophore
EBFP2	Bleu	383	448	18	55	5.3	SHG
ECFP <sup>22</sup>	Cyan	433/445	475/503	13	64	4.7	TWG
mCerulean	Cyan	433/445	475/503	27/24	36	4.7	TWG
mTFP1	Cyan-vert	462	492	54	110	4.3	AYG
mEGFP	Vert	488	507	34	174	6.0	TYG
mEmerald	Vert	487	509	39	101 <sup>S</sup>	6.0	TYG
sfGFP	Vert	485	510	54	157 <sup>S</sup>	5.5	TYG
EYFP <sup>22</sup>	Jaune	514	527	51	60	6.9	GYG
mVenus	Jaune	515	528	53	15	6.0	GYG
mCitrine	Jaune	516	529	59	49	5.7	GYG
YPet	Jaune	517	530	80	49	5.6	GYG
mKO	Orange	548	559	31	122	5.0	CYG
tdTomato	Orange	554	581	95	98	4.7	MYG
TagRFP	Orange	555	584	48	37 <sup>S*</sup>	<4.0	MYG
mRFP1 <sup>22</sup>	Rouge	584	607	12.5	8.7	4.5	QYG
mCherry	Rouge	587	610	17 <sup>††</sup>	96	<4.5	MYG
mKate	Rouge profond	588	635	15	166 <sup>S</sup>	6.0	MYG
mPlum	Rouge profond	590	649	3.2 <sup>††</sup>	53	<4.5	MYG

B

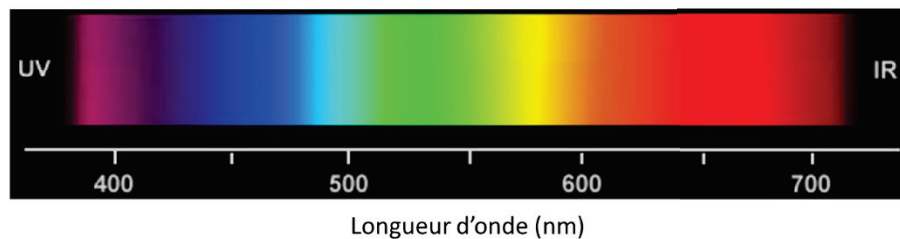


Figure 27. Propriétés physiques des principales protéines fluorescentes (FPs)

- A. Le tableau indique pour chaque protéine fluorescente (FP) citée : la couleur de la fluorescence émise (couleur spectrale), les pics d'absorption (excitation) et d'émission, la brillance, la photostabilité, le pKa et les trois acides aminés du chromophore (avec S pour la sérine, H pour l'histidine, G pour la glycine, T pour la thréonine, W pour le tryptophane, A pour l'alanine, Y pour Tyrosine, M pour méthionine, Q pour glutamine).
- B. Spectre du visible (lumière blanche) et longueurs d'onde associées.

D'après Shaner et al. (2007)

Ce chapitre décrit les principes généraux de la fluorescence et du fonctionnement des biosenseurs fluorescents et en particulier les biosenseurs sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  et au potentiel de membrane car c'est avec ceux-ci que j'ai pu travailler dans le cadre de mon travail de Thèse.

## 1. Propriétés générales

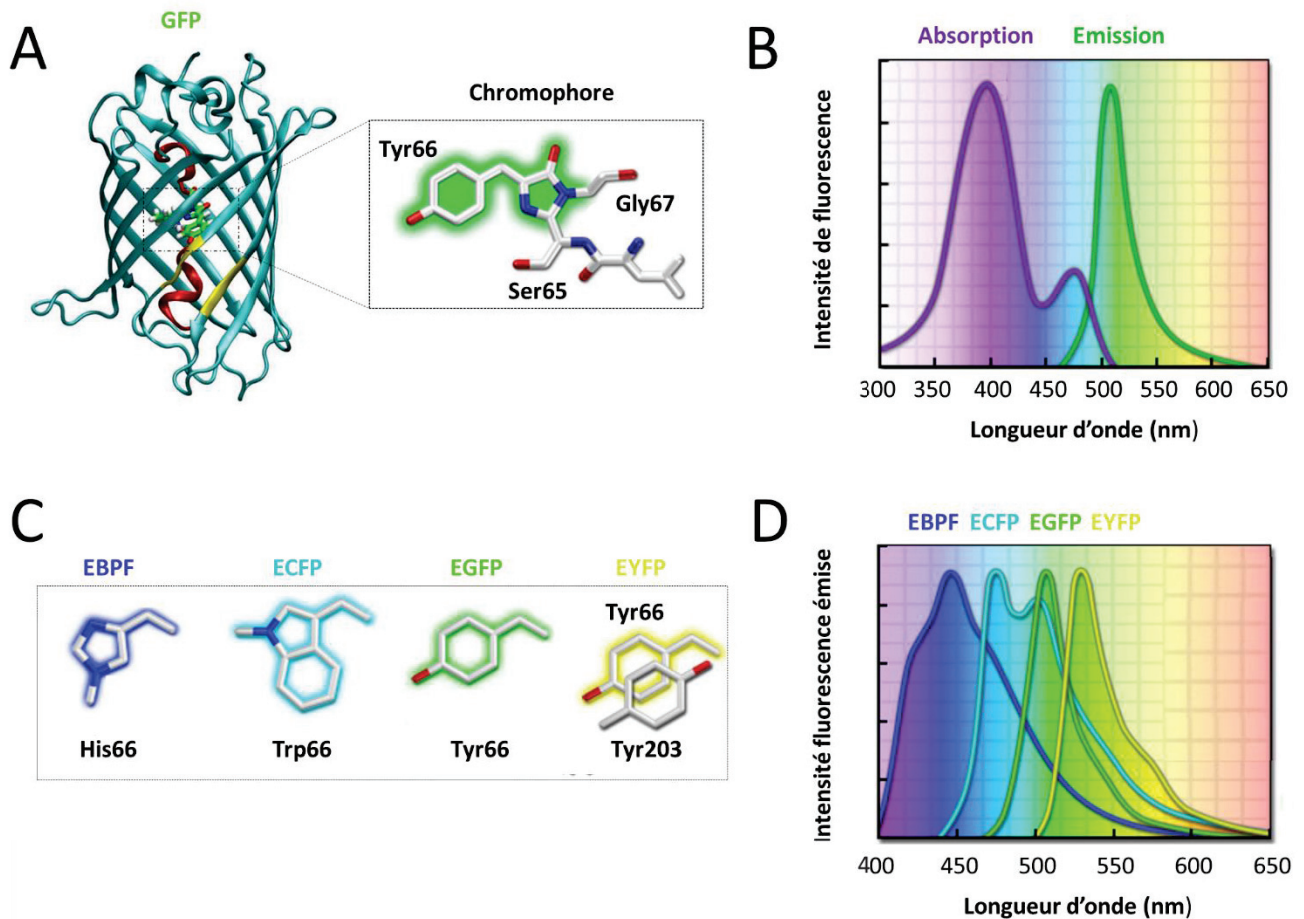
### 1.1. Principes généraux de la fluorescence

La découverte de la GFP (*green fluorescent protein*) dans la méduse *Aequorea victoria* au début des années 1960, a révolutionné le domaine de la biologie (Shimomura et al. 1962). Il existe aujourd'hui une large palette de FPs isolées d'organismes marins (FPs sauvages) ou générées par mutagenèse dirigée (FPs mutantes), dont la fluorescence respective s'étend sur tout le spectre visible du proche ultraviolet (UV, ~400 nm) au proche infrarouge (IR, ~700 nm) (Tsien 1998; Wang et al. 2004; Shaner et al. 2004). Cette capacité des protéines à fluorescer émane de la présence d'un groupement chimique appelé chromophore. Ce groupement se forme spontanément par repliement à l'intérieur de la protéine via la cyclisation autocatalytique de trois résidus consécutifs de la séquence et formation de deux cycles aromatiques. Par exemple, le chromophore de la GFP est formé à partir des résidus Ser65, Tyr66 et Gly67 (Prasher et al. 1992; Cody et al. 1993; Heim et al. 1994; Cubitt et al. 1995; Reid et Flynn 1997). Il est positionné au niveau de l'hélice  $\alpha$  centrale de la protéine qui a la forme d'un tonneau composé de 11 feuillets  $\beta$  (Figure 28) (Ormö et al. 1996; Yang, et al. 1996). Les extrémités N- et C-terminales de la GFP sont situées à l'extérieur du tonneau, ce qui facilite sa fusion à d'autres protéines.

Au cours d'une irradiation lumineuse, le chromophore absorbe les photons et ses électrons passent d'un état fondamental de repos ( $S_0$ ) à un état excité ( $S_1$ ). Lors de sa désexcitation (retour des électrons à  $S_0$ ), l'énergie emmagasinée par le chromophore est libérée sous la forme de photons (émission de fluorescence) via un processus radiatif (Figure 29 A). Cependant, une torsion du chromophore peut également aboutir à un processus de désexcitation non-radiatif qui supprime la fluorescence (Olsen et McKenzie 2009). Au sein d'une protéine, les mouvements du chromophore sont contraints par des empêchements stériques, des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène. La désexcitation non-radiative du chromophore est donc limitée et sa capacité à émettre de la fluorescence est favorisée (Patterson et al. 1997; Niwa et al. 1996).

La fluorescence est caractérisée par plusieurs propriétés :

- **Le rendement quantique** définit l'efficacité de l'émission de lumière fluorescente pour une molécule donnée. Il est le rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés par le chromophore. Il est d'autant plus élevé que le processus radiatif est important et le processus non-radiatif est faible.



**Figure 28. La protéine fluorescente verte (GFP) et ses premiers variants mutés**

- Schéma de la structure cristalline de la GFP qui a la forme d'un tonneau composé de 11 feuillets  $\beta$  (en cyan). Le chromophore (en vert) fait partie d'une hélice  $\alpha$  centrale (en rouge), placée à l'intérieur de la protéine. Le chromophore est constitué des trois résidus Ser65-Tyr66-Gly67.
- Spectres d'absorption et d'émission de la GFP.** Les intensités sont normalisées. Le spectre d'absorption présente deux pics à 395 nm et à 475 nm. Le spectre d'émission présente un pic à environ 505 nm.
- Variants mutés de la GFP.** La protéine EBPF est générée par la substitution Y66H (l'histidine remplace la tyrosine en position 66 du chromophore), la protéine ECFP par la substitution Y66W (le tryptophane remplace la tyrosine du chromophore), la protéine EYFP par la substitution T203Y (remplacement de la thréonine 203 en tryptophane) au niveau d'un résidu proche du chromophore lorsque la protéine est repliée. La protéine EGFP (pour *enhanced green fluorescent protein*) a été produite par les mutations F64L et S65T, ce qui a permis de réduire l'absorption à un seul pic et ainsi d'augmenter la fluorescence émise à 507 nm par rapport à la GFP.
- Spectres d'émission des variants mutés de la GFP. L'EBPF a un pic d'émission centré autour de 450 nm, l'EGFP à ~510 nm et l'EYFP à ~530 nm. L'ECFP a deux pics d'émission à ~470 nm et ~490 nm.

Modifié d'après Shaner et al. (2007)

- **Le coefficient d'extinction** correspond à l'intensité d'absorption des photons par le chromophore. Plus sa valeur est élevée, plus l'intensité de la fluorescence émise est importante pour une intensité d'illumination donnée.
- **La brillance** définit l'intensité de la fluorescence émise, elle est le produit du rendement quantique et du coefficient d'extinction.
- **Les spectres d'excitation (ou d'absorption) et d'émission** décrivent respectivement l'intensité de l'absorption et de la fluorescence d'une FP donnée en fonction de la longueur d'onde (Figure 28).
- **La durée de vie** est le temps moyen qu'un chromophore passe à l'état excité. Elle définit le déclin de l'intensité de la fluorescence émise en fonction du temps et prend la forme d'une courbe mono-exponentielle décroissante. La plupart des FPs ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde (ex : 3.3 ns pour la GFP ; Perozzo et al. 1988; Villoing et al. 2008).
- **La photostabilité** correspond au nombre d'excitations que peut subir une FP avant d'être dégradée. En pratique lors d'un balayage laser, le chromophore est excité quelques centaines de fois pour constituer un pixel. De ce fait, la répétition des enregistrements mène à une diminution progressive de la fluorescence émise par la FP (photodestruction ou *photobleaching*) dont la rapidité dépend de sa photostabilité (pour revue, voir Shaner et al. 2005).

Dans une population de GFPs, les chromophores se trouvent majoritairement à l'état protoné (neutre) mais une minorité d'entre eux est sous la forme déprotonée (anionique) (Brejc et al. 1997; Chattoraj et al. 1996). Le spectre d'absorption de la GFP présente donc deux pics à 395 nm (forme neutre) et à 475 nm (forme anionique) (Morise et al. 1974; Heim et al. 1994; Cubitt et al. 1995; Brejc et al. 1997). En revanche, le spectre d'émission présente un pic unique centré autour de 507 nm environ (lumière verte), ce qui indique que le chromophore se déprotone lorsqu'il est à l'état excité (Chattoraj et al. 1996) (Figure 28). La proportion très minoritaire de chromophores qui reste sous la forme protonée à l'état excité produit une fluorescence autour de 450 nm (lumière bleue), ce qui indique le décalage des spectres d'absorption et d'émission vers des longueurs d'onde plus courtes induite par la protonation du chromophore (Vallverdu et al. 2010).

L'introduction de mutations dirigées dans la séquence codant pour la GFP a donné naissance à la première génération de FPs aux pKa, spectres d'émission et d'absorption variés (pour revue, voir Tsien 1998). Par exemple, la substitution du résidu sérine du chromophore (Ser65) par un autre résidu a favorisé la forme anionique et réduit le spectre d'absorption de la FP à un seul pic (GFP<sup>S65T</sup>; Ormö et al. 1996). La substitution du résidu tyrosine du chromophore (Tyr66) a permis de générer des FPs émettant dans le bleu (EBFP et Sirius ; Ai et al. 2007; Tomosugi et al. 2009) et dans le cyan (ECFP,



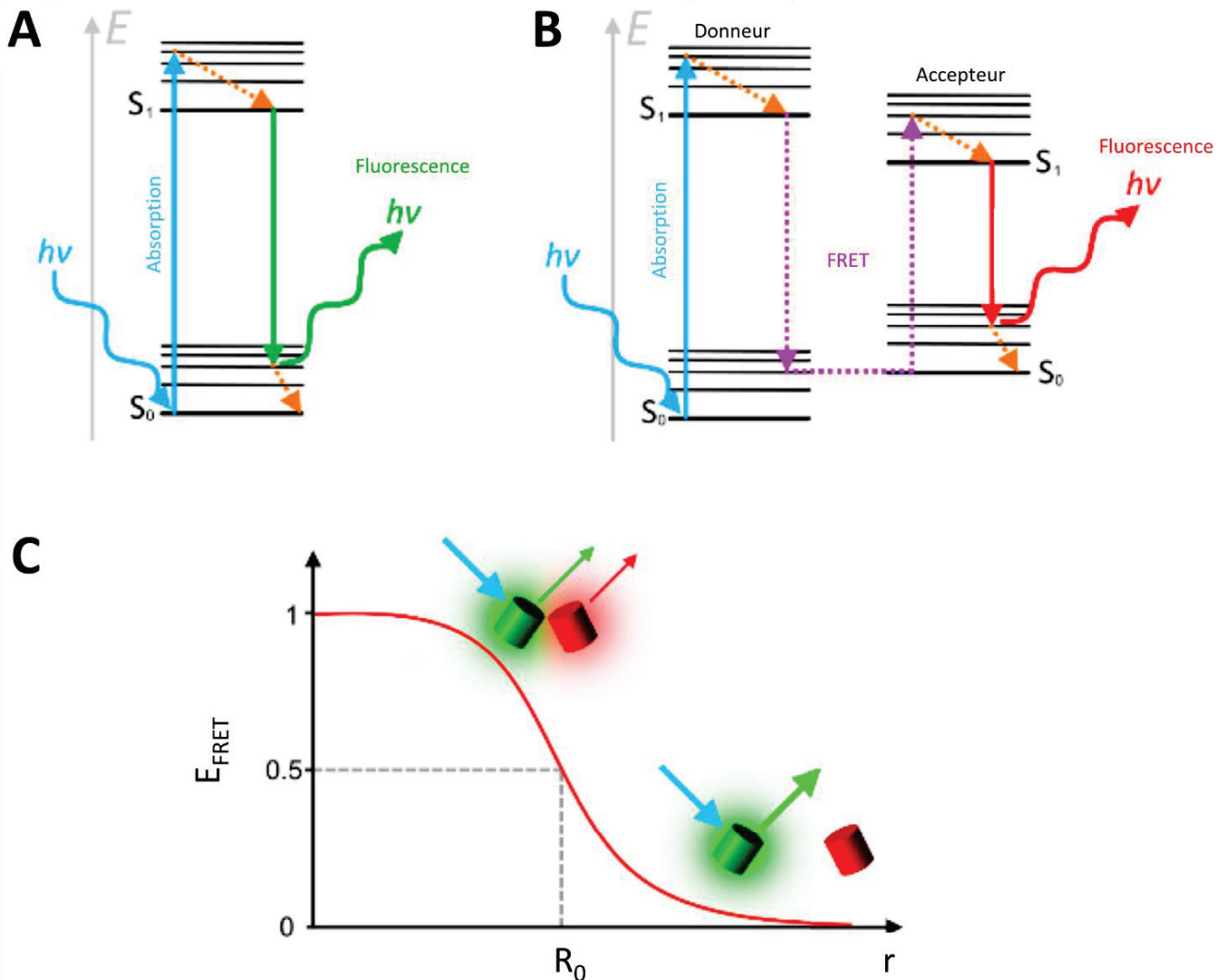


Figure 29. Le principe de Förster resonance energy transfer (FRET) (1/2)

- A. **Principe de la fluorescence** expliqué par le diagramme de Jablonski. L'absorption d'un photon (flèche bleue) par le chromophore entraîne le passage des électrons d'un état fondamental ( $S_0$ ) à un état excité ( $S_1$ ). L'état excité est un niveau d'énergie instable, ce qui pousse les électrons du chromophore à se relaxer (flèche verte droite) après être passés par un état de vibration non radiatif (flèche orange en pointillés). L'énergie libérée par ce retour à l'état  $S_0$  entraîne l'émission d'un photon (fluorescence,  $h\nu$ , flèche verte ondulée) à une longueur d'onde plus élevée que la longueur d'onde absorbée.
- B. **Principe du FRET** expliqué par le diagramme de Jablonski. Ici, l'énergie libérée par le donneur après excitation (flèche violette en pointillés) est absorbée par un accepteur situé à proximité, ce qui conduit à l'excitation de ses électrons, puis à l'émission de photons par l'accepteur (flèche rouge ondulée).
- C. **Corrélation entre l'efficacité du FRET ( $E_{\text{FRET}}$ ) et la distance qui sépare les fluorophores ( $r$ ).** Le rayon de Förster ( $R_0$ ) est la distance pour laquelle 50% de l'énergie maximale est transférée

D'après Hochreiter et al. (2015)

Cerulean, mTurquoise ; Rizzo et al. 2004; Goedhart et al. 2010). Enfin, la mutation d'un résidu voisin au chromophore a conduit à des protéines d'émission jaune (YFP ; Wachter et al. 1998) (Figure 28). Puis d'autres FP ont été isolées de nombreux organismes marins, et l'utilisation de la mutagenèse dirigée a permis de générer de nouveaux variants aux propriétés spectrales variées et améliorées (Shaner et al. 2005; Shaner et al. 2007; Chudakov et al. 2010) (Figure 27).

## 1.2. Les biosenseurs de type FRET

### 1.2.1. Le Förster Resonance Energy Transfer (FRET)

**Le FRET** (pour *Förster/fluorescence resonance energy transfer*) est un phénomène physique par lequel un fluorophore (donneur) à l'état excité transfère de manière non radiative son énergie d'excitation à un fluorophore voisin (l'accepteur). Ce transfert d'énergie se traduit par 1) une diminution de l'intensité de fluorescence (ou *quenching*) émise par le donneur et 2) une augmentation de l'intensité de fluorescence émise par l'accepteur.

Le FRET est un mécanisme sensible aux changements de conformation, d'orientation et de distance entre les deux fluorophores dans des dimensions de l'ordre de 1 à 10 nm (soit < 100 Å) (Förster 1948; Jares-Erijman et Jovin 2003). L'efficacité du transfert d'énergie ( $E_{FRET}$ ) du donneur vers l'accepteur est définie par l'équation de Förster et diminue lorsque la distance entre les deux fluorophores augmente (Figure 29):

$$E_{FRET} = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

Avec  $r$ , la distance entre les deux fluorophores et  $R_0$  (distance de Förster), la distance pour laquelle le transfert d'énergie entre les fluorophores atteint 50 % du transfert maximal. La valeur de  $R_0$  est spécifique à une paire de fluorophores donnée car elle dépend :

- du chevauchement suffisant (> 30 %) du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur (Figure 30 A),
- du rendement quantique du donneur en l'absence de l'accepteur ; l'efficacité du FRET est d'autant plus importante que ce paramètre est élevé,
- du coefficient d'extinction de l'accepteur ; plus sa valeur est élevée, plus l'efficacité du FRET est importante.
- du facteur d'orientation relative du dipôle ( $\kappa^2$ ) au moment du transfert d'énergie, c'est-à-dire lors de l'émission du donneur et donc de l'absorption par l'accepteur. La valeur de  $\kappa^2$  est située entre 0 et 4. Si les deux FP sont parallèles, l'efficacité du FRET sera plus importante que s'ils sont perpendiculaires.

**Les distances de Förster**  $R_0$  sont classiquement situées entre 2 et 8 nm (20-80 Å) (pour revues, voir Pietraszewska-Bogiel et Gadella 2011; Bajar et al. 2016; Terai et al. 2019). Selon l'équation de Förster, quand la distance  $r$  qui sépare les FP double (ex : de  $R_0$  à  $2R_0$ ), l'efficacité du transfert diminue et passe

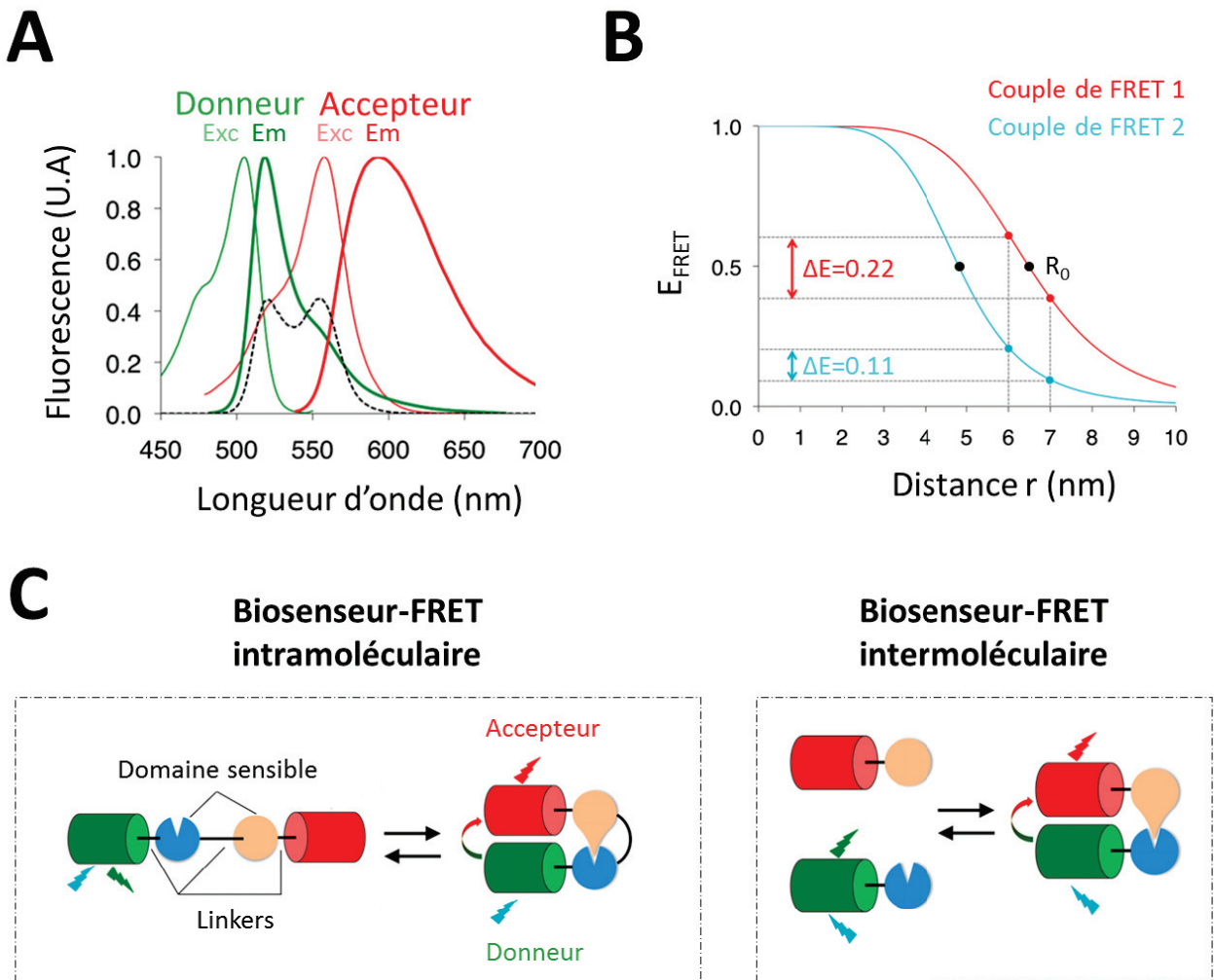


Figure 30. Le principe de Förster resonance energy transfer (FRET) (2/2)

- A. Spectres d'excitatin (Exc) et d'émission (Em) d'un donneur (tracés verts, ici exemple de la mClover3) et d'un accepteur (tracés rouges, ici exemple de la mRuby3) de fluorescence. Le tracé en pointillé correspond au spectre de chevauchement de l'émission du donneur et de l'excitation de l'accepteur.
- B. Variation de l'efficacité du mécanisme de FRET ( $E_{FRET}$ ) en fonction de la distance entre les deux partenaires de fluorescence. Le couple de FRET 1 (courbe en rouge, mClover3-mRuby3) affiche un FRET plus efficace en comparaison au couple de FRET 2 (courbe en bleu, ECFP-EYFP) en raison de son  $R_0$  (distance de Förster) plus élevé.
- C. Les deux types de biosenseur-FRET : intra- et inter-moléculaire. Les variations de FRET ont lieu lors de changements de conformation du domaine sensible (biosenseur-FRET intramoléculaire) ou lors de l'interaction entre deux molécules, chacune fixée à un partenaire de fluorescence (biosenseur-FRET intermoléculaire)

Modifié d'après Bajar et al. (2016)

de  $E_{\text{FRET}}=50\%$  à  $E_{\text{FRET}}=1.5\%$ . Ceci indique que le FRET permet une mesure très sensible des changements de conformation intra- et inter-moléculaire.

**L'efficacité du FRET** ( $E_{\text{FRET}}$ ) peut être quantifiée grâce à la méthode de déplétion sélective de l'accepteur. En pratique, cette déplétion s'effectue par photodestruction (ou *photobleaching*) complète de l'accepteur via son excitation prolongée de forte intensité et elle entraîne :

- la perte de la capacité de l'accepteur à absorber de l'énergie, donc l'abolition du FRET,
  - l'augmentation subséquente de l'intensité de fluorescence émise par le donneur (ou *dé-quenching*).
- L'intensité de la fluorescence émise par le donneur est déterminée avant et après *photobleaching* complet de l'accepteur. Ainsi, l'augmentation relative de l'intensité de fluorescence émise par le donneur est proportionnelle à  $E_{\text{FRET}}$  (pour revues, voir Pietraszewska-Bogiel et Gadella 2011; Zeug et al. 2012).

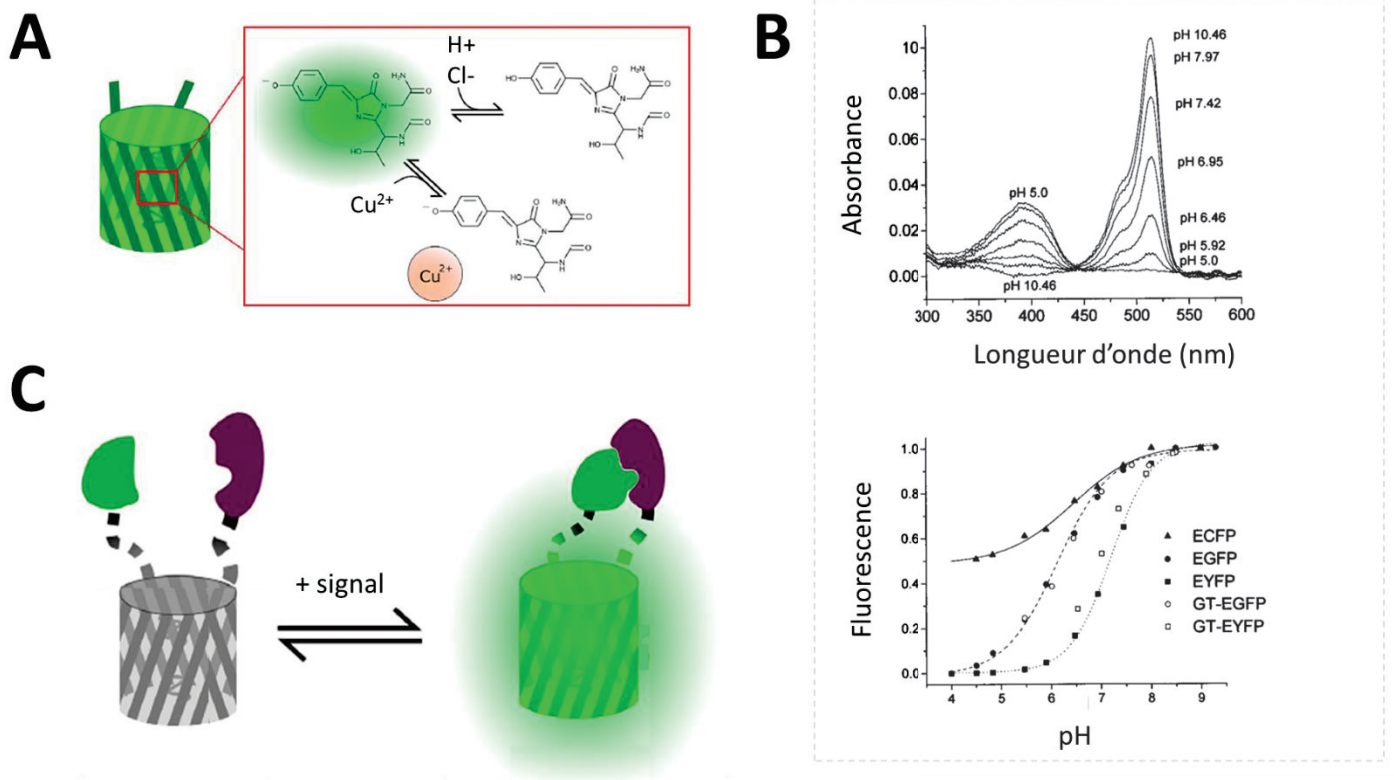
#### 1.2.2. Stratégies de conception et optimisation

Les biosenseurs basés sur le mécanisme de FRET (**biosenseurs-FRET**) sont composés d'un domaine sensible (ou détecteur) et d'un couple de fluorophores. Il existe deux grands types de biosenseur-FRET : intra- et inter-moléculaire (Figure 30). Dans les biosenseurs-FRET intramoléculaires, les deux fluorophores sont couplés à la même molécule (détecteur) dont les changements de conformation induisent les variations de FRET. Dans les biosenseurs-FRET intermoléculaires, les fluorophores donneur et accepteur sont fusionnés à des molécules différentes. Dans ce cas, c'est lorsque les deux molécules indépendantes se rapprochent que le FRET a lieu (pour revue, voir Bajar et al. 2016).

D'autres biosenseurs-FRET sont basés sur l'introduction d'un site de clivage protéolytique dans le *linker* connectant les deux partenaires de fluorescence. Ainsi, lorsque le clivage a lieu, les deux FPs se séparent induisant la diminution du phénomène de FRET. Enfin, certains biosenseurs sont dits homo-FRET car le couple de FRET est composé de deux FPs identiques. Dans ce cas, les biosenseurs se dimérisent lors de la détection du signal ce qui altère la polarisation de la lumière émise.

Mais finalement, dans tous les cas, quand le mécanisme de détection (liaison, dissociation, interaction, changements de conformation) opère, il altère la distance séparant les deux FPs à l'origine des variations de FRET.

Le choix des partenaires du couple de FRET (donneur et accepteur) est essentiel à la performance du biosenseur dans les cellules vivantes. Les variants mutés de la GFP telles que la CFP et la YFP ont été rapidement identifiés comme appropriés au mécanisme de FRET (Heim et Tsien 1996). Puis, la prise en compte de la dépendance du FRET à l'orientation et à la position relative des deux partenaires de fluorescence a été exploitée pour la conception et l'amélioration des biosenseurs fluorescents (pour



**Figure 31. Les biosenseurs basés sur une seule protéine fluorescente (FP)**

- A.** La sensibilité intrinsèque des FP aux ions  $H^+$ ,  $Cl^-$  et  $Cu^{2+}$  se manifeste par une diminution de l'émission de fluorescence induite par la protonation du chromophore ( $H^+$ ,  $Cl^-$ ) ou par un phénomène de quenching ( $Cu^{2+}$ ). D'après Sanford et Palmer (2017)
- B. Dépendance au pH du spectre d'absorption de la EYFP** (graphe du haut). La diminution du pH entraîne un décalage du spectre d'absorption de la EYFP vers des longueurs d'onde plus courtes ( $\sim 400$  nm) et donc une diminution de l'absorption à 530 nm (longueur d'onde d'absorption standard). Ce mécanisme explique la diminution de la fluorescence émise par la EYFP induite par la protonation de son chromophore.
- Dépendance au pH de la fluorescence émise par 3 variants mutés de la GFP** (ECFP, EGFP et EYFP) *in vitro* (symboles pleins) et *in vivo* (dans cellules Hela, symboles vides) (graphe du bas). Lorsque le pH diminue, la fluorescence émise par les FPs diminue à leur longueur d'onde standard d'émission. *In vitro*,  $pK_{a_{EYFP}}=7.1 \mu M$ ,  $pK_{a_{EGFP}}=6.15 \mu M$  et  $pK_{a_{ECFP}}=6.4 \mu M$ . D'après Llopis et al. (1998)
- C.** La fixation de domaines d'interaction aux extrémités N- et C-terminales de la cpFP permet d'enregistrer des variations de fluorescence lors des changements conformationnels de la cpFP (après interaction des domaines). « Signal » réfère à un analyte, une interaction ou un processus cellulaire. Modifié d'après Sanford et Palmer (2017)

revue, voir Bajar et al. 2016). L'optimisation des caractéristiques de réponse des biosenseurs-FRET peut également être réalisée via la modification de l'affinité du domaine sensible par introduction de mutations dirigées. Enfin, l'ajustement de la longueur et de la flexibilité des séquences de liaison (*linkers*) entre les partenaires de fluorescence et/ou entre le domaine sensible et la (les) FP(s) est une stratégie qui permet de concevoir un biosenseur-FRET aux propriétés optimales pour la détection du paramètre d'intérêt (pour revue, voir Sanford and Palmer 2017).

Les biosenseurs-FRET ont l'avantage de présenter des propriétés ratiométriques, déterminées par le rapport entre les pics d'émission de l'accepteur et du donneur. La mesure ratiométrique permet d'amplifier la réponse mais également de normaliser et de quantifier de manière fiable le signal enregistré et ainsi de s'affranchir de nombreux biais expérimentaux tels que le mouvement, l'auto-fluorescence ou la sensibilité à certains paramètres exogènes non désirés.

### 1.3. Les biosenseurs composés d'une seule FP

Les biosenseurs conçus à partir d'une seule protéine fluorescente (**biosenseur-FP**) sont davantage polyvalents que les biosenseurs-FRET. Ils sont plus petits et occupent bien sûr une gamme de longueurs d'onde d'émission et d'excitation plus étroite que les biosenseurs-FRET ce qui permet de les complexer à d'autres types de molécules fluorescentes (ex. : indicateurs synthétiques, autre marquage protéique). Les fluorophores bien caractérisés telles que la EGFP, la ECFP, la EYFP, la Citrine et la Venus ont fourni la base de la conception initiale des biosenseurs-FP (pour revue, voir Sanford and Palmer 2017). Cependant, l'inconvénient majeur des biosenseurs-FP est qu'ils ne sont pas ratiométriques et permettent donc uniquement de détecter des variations relatives d'analytes. De plus, la sensibilité intrinsèque de nombreuses FPs, notamment au pH, est également un facteur qui peut limiter leur utilisation (voir par exemple Betolngar et al. 2015).

- **Sensibilité intrinsèque des FPs**

Les FPs dérivées de la GFP peuvent être utilisées seules en tant que biosenseur de par leur sensibilité intrinsèque à certains analytes.

De manière générale, la sensibilité intrinsèque d'une FP a lieu par modulation de ses spectres d'émission et d'excitation. Déjà évoqué plus haut, la protonation du chromophore entraîne un décalage du spectre d'absorption de la FP vers des longueurs d'onde plus courtes (décalage vers le bleu) et donc une diminution de la fluorescence qu'elle émet lorsqu'elle est excitée à sa longueur d'onde standard (Figure 31 A, B). L'introduction de mutations dans la séquence codant pour la GFP a permis de générer des variants (EGFP, ECFP, EYFP, pHluorine) aux pKa et spectres d'émission et d'excitation variés (Figure 31 A, B). Ce qui explique que les FPs aient initialement été utilisées comme

Type de biosenseurs		Applications	Spécificité	Exemple(s)
<b>Biosenseurs-FRET</b>		Ions	Ca <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Cl <sup>-</sup> pH	Caméléons, FIB-CB <sub>SM</sub> , TN-XXL CLY9-2His, Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub> Clomeleon, CL-sensor Tandem CFP-YFP
		Métabolites	AMPC GMPc Phosphoinositides IP3 Sucres Acides aminés	Epac, ICUE1 CGY, Cygnet, cGES-DE5 CAY LIBRA FLIP Arg sensor
		Activité kinase	PKA PKB, Akt PKC PKD ERK	ART, AKAR 1-3 Aktus, BKAR CKAR, KCP-1 DKAR EAS, Erkus
		Autres activités enzymatiques	Protéase Phosphatase	FP donneur-substrat-FP accepteur CaNAR1 (calcineurine)
		Potentiel et rédox	<b>Potentiel</b> rédox	<b>Mermaid*</b> , VSFP2 HyPer, HSP-FRET
		Activation protéique et changements de conformation	GTPase Akt PKB CaMKII	Raichu-Ras, -Rap1, RhoA biosensor GFP-Akt-YFP GFP-PKB-RFP Camu $\alpha$ , CYCaMI $\alpha$
<b>Biosenseurs basés sur une FP</b>	<b>Sensibilité intrinsèque</b>	Ions et statut rédox	pH Halogénés (Cl <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> ) rédox	pHluorine YFP-H814Q cpYFP
	<b>Sensibilité extrinsèque (détecteur)</b>	Ions	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>GCaMP*</b> , Camgaroo, Pericam
			Rapport ATP/ADP Potentiel de membrane	Perceval FlaSH, SPARC, ASAP

**Tableau I : Différentes applications pour les biosenseurs-FRET et les biosenseurs-FP**

Ce tableau dresse une liste non-exhaustive des différents domaines d'application des biosenseurs basés sur le FRET ou sur une seule FP et donne également des exemples.

Les lignes en orange correspondent aux deux processus cellulaires qui m'ont particulièrement intéressés au cours de ma Thèse et les étoiles indiquent les types de biosenseur que j'ai utilisés.

Modifié, d'après Frommer et al. (2009)

biosenseurs pour la détection des variations de pH (Kneen et al. 1998; Llopis et al. 1998; Miesenböck et al. 1998). De plus, les variations de l'environnement peuvent changer l'état de protonation du chromophore, c'est notamment le cas des fortes concentrations en ions  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{I}^-$ , ce qui explique que certaines FPs soient également utilisées comme biosenseurs sensibles à ces espèces ioniques (Wachter et al. 2000). Enfin, d'autres variants mutés de la GFP sont utilisés comme biosenseurs fluorescents sensibles au cuivre (Lei et al. 2015) ou au mercure (Jiang et al. 2015; Ravikumar et al. 2016) (Figure 31).

- **Les biosenseurs basés sur une FP**

Certains biosenseurs sont conçus par fixation de domaines d'interaction à la FP. Dans ce cas, c'est généralement la version mutée cp (pour *circularly permuted*) de la protéine fluorescente (cpFP) qui est utilisée pour la conception du biosenseur. Les cpFPs sont générées par 1) clivage des extrémités N- et C-terminales de la FP d'origine qui sont ensuite inter-changées et jointes par une courte séquence d'acides aminés et 2) création de nouvelles extrémités N- et C-terminales (Baird et al. 1999). Les changements de conformation du biosenseur-cpFP modulent l'accessibilité de l'analyte ou l'état de protonation du chromophore et entraînent une variation de la réponse fluorescente (Nagai et al. 2001; Nakai et al. 2001). La tolérance des protéines fluorescentes au processus de permutation circulaire et leur fusion à des domaines d'interaction est étonnement robuste et fonctionnelle (Baird et al. 1999) (Figure 31 C).

#### 1.4. Autres types de biosenseurs

Il existe également les biosenseurs fluorescents de translocation, de complémentation et de dimérisation dont les mécanismes d'activation ne seront pas décrits ici (pour revue, voir Sanford et Palmer 2017).

#### 1.5. Types de cibles et applications

La grande variété de FPs, la multitude de domaines sensibles et les diverses stratégies de conception existantes ont permis de générer de nombreux biosenseurs fluorescents applicables à un champ d'étude très large (Tableau I) pour la détection:

- des variations de **concentrations ioniques** tel que le  $\text{Ca}^{2+}$  par les biosenseurs de type GCaMP (Nakai et al. 2001; Chen et al. 2013),
- des variations de **concentrations de métabolites** tel que l'AMPC par les biosenseurs de type Epac (Klarenbeek et al. 2011; Polito et al. 2013; Blirando et al. 2015) ou le GMPc par les biosenseurs de type Cygnet (Polito et al. 2013),
- de l'**activité enzymatique** telle que celle de la PKA par les biosenseurs de type AKAR (Polito et al. 2014)



GECI	Variant	Domaine sensible au Ca <sup>2+</sup>	Protéine(s) fluorescente(s)	Rendement *	Décroissance (en ms) **	Dépendance au Ca <sup>2+</sup> (Kd, en μM)
Caméléon	Caméléon 1	CaM-M13	BFP - EGFP	0.7		0.07 et 11
	YC 3	CaM <sup>E104Q</sup> -M13	ECFP - EYFP			4.4
	YC 2.1	CaM-M13	ECFP - EYFP <sup>V68L/Q69K</sup>	2	350	0.1 et 4.3
	YC 3.3	CaM <sup>E104Q</sup> -M13	ECFP - Citrine	1.8		1.5
	YC 3.6	CaM <sup>E104Q</sup> -M13	ECFP - cpVénus	6.6	2940	0.25
	D1	mCaM-M13	ECFP - Citrine			0.8 et 60
	D2cpv	mCaM-mM13	ECFP - cpVénus	5.3		0.03 et 3
	D3cpv	mCaM-mM13	ECFP - cpVénus	5.1		0.6
Camgaroo	D4cpv	mCaM-mM13	ECFP - cpVénus	3.8		64
	Camgaroo 1	CaM	cpEYFP	7		7
Péricam	Camgaroo 2	CaM	cp-Citrine	7		5.3
	F-péricam	CaM <sup>E104Q</sup> -M13	cpEYFP <sup>T203H</sup>	8		0.7
	I-péricam	CaM <sup>E104Q</sup> -M13	cpEYFP <sup>V68L/Q69K/H148H/T203F</sup>	6.7	940	0.2
GCaMP	R-péricam	CaM <sup>E104Q</sup> -M13	cpEYFP <sup>V68L/Q69K/H148T/T203F</sup>	10		1.7
	GCaMP1	CaM-M13	cpEGFP	3.5	330	0.24
	GCaMP2	CaM-(6His)M13	m-cpEGFP	5.1	260	0.15
	GCaMP3	CaM-RS20	cpEGFP	12.3	700	0.41
	GCaMP5G	m-CaM-M13	m-cpEGFP	33	680	0.46
	GCaMP6s	m-CaM-M13	m-cpEGFP	63	1800	0.15
Troponine C	GCaMP6f	m-CaM-M13	m-cpEGFP	52	400	0.38
	TN-L15	Troponine C	ECFP - Citrine	2.4	1330	1.2
	TN-XL	m-Troponine C	ECFP - cpCitrine	5	240	2.5
CatchER	TN-XXL	m-Troponine C	ECFP- cpCitrine	3.30	620	0.8
			EGFP <sup>S147E/S202D/Q204E/F223E/T225E</sup>	1.8	1.5	180

**Tableau II. Caractéristiques *in vitro* des principaux biosenseurs fluorescents Ca<sup>2+</sup>-dépendants**

Toutes les valeurs correspondent à des données obtenues sur des cellules en culture.

\* Rendement (ou amplitude relative maximale de variation de fluorescence) exprimée en  $\Delta F_{\max}/F_0$  lorsqu'une seule protéine fluorescente est présente, ou en  $\Delta R_{\max}/R_0$  si c'est un couple de FRET qui compose le GECI.

\*\* La décroissance correspond au T50, c'est-à-dire le temps nécessaire à la décroissance de 50% de l'amplitude du signal.

La lettre « m-» signifie que plus de deux mutations ont été introduite dans la protéine excepté pour le variant muté de la cpEYFP des protéines Péricams et pour l'EGFP composant CatchER où l'ensemble des mutations introduites sont précisées.

- la détection de changements de conformation, tels que ceux de la protéine Akt par le biosenseur ReAktion (Ananthanarayanan et al. 2007), d'activation ou d'interaction protéique,
- la mesure de l'**état rédox** telle que la détection de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par le biosenseur de type HyPer (Belousov et al. 2006),
- la mesure du **potentiel membranaire** par les biosenseurs de type Mermaid (Tsutsui et al. 2008; Tsutsui et al. 2013a, 2013b)

*Considérant le caractère démesuré des données et progrès constants concernant le développement et l'utilisation des biosenseurs fluorescents il serait d'une part prétentieux et d'autre part hors de propos d'envisager en faire ne serait-ce même qu'une synthèse approximative. Pour cette raison, j'ai limité mon ambition dans le présent manuscrit à ne présenter que les données principales concernant les biosenseurs fluorescents que j'ai utilisés, afin d'explorer deux processus biologiques précis qui font l'objet des prochaines parties de ce chapitre :*

- 1) la signalisation calcique (section IV.2. Les biosenseurs fluorescents sensibles au Ca<sup>2+</sup>)
- 2) le potentiel de membrane (section IV.3. Les biosenseurs fluorescents sensibles au potentiel).

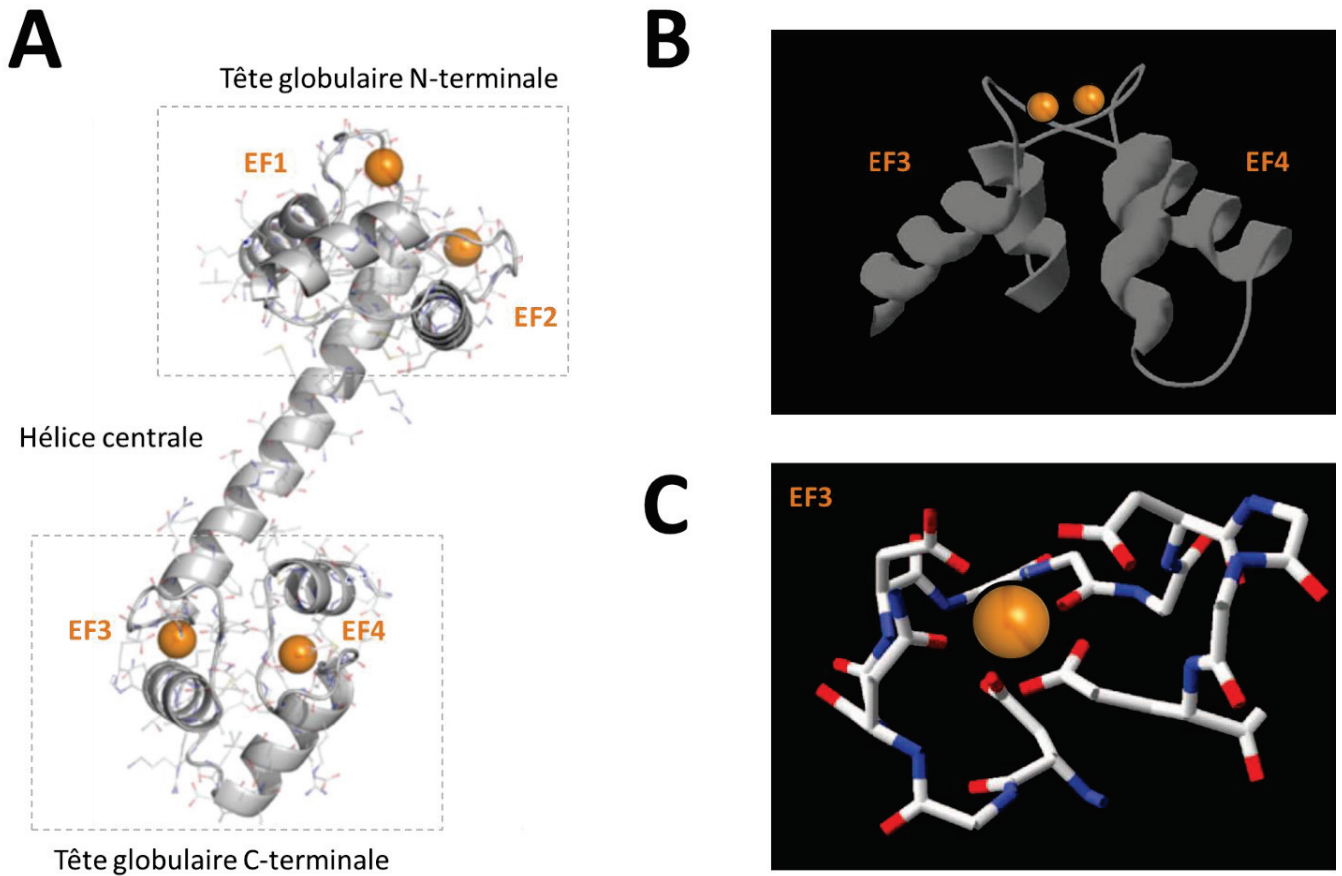
## 2. Les biosenseurs fluorescents sensibles au Ca<sup>2+</sup> (ou GECIs)

Trois étapes importantes ont précédé l'avènement des biosenseurs fluorescents sensibles au Ca<sup>2+</sup> codés génétiquement (ou GECIs pour *genetically encoded calcium indicators*):

- la découverte de la GFP (Shimomura et al. 1962),
- le développement de variants mutés de la GFP, présentant différents spectres d'excitation et d'émission et donc adaptés au mécanisme de FRET (Heim et Tsien 1996),
- les études biochimiques de liaison du Ca<sup>2+</sup> à la calmoduline (CaM) et du complexe Ca<sup>2+</sup>-CaM au peptide M13 (Porumb et al. 1994). Le peptide M13 (26 résidus) étant le domaine de liaison au complexe Ca<sup>2+</sup>-CaM de la kinase de la chaîne légère de myosine de muscle squelettique.

Ces découvertes ont mené au développement des deux premiers types de GECIs: FIP-CB<sub>SM</sub> et Caméléon. Depuis, les progrès dans le développement, la conception et l'application des GECIs ne cessent d'augmenter. Ainsi, de nombreuses protéines sont aujourd'hui disponibles incluant les biosenseurs basés sur une ou deux FP(s), sur une cpFP ou sur le remplacement de la CaM par la troponine C. Plus récemment, un GECl nommé CatchER de très petite taille a été développé sur la base de l'EGFP (pour revues, voir Mank et Griesbeck 2008; Palmer et al. 2011; Koldenkova et Nagai 2013).

*Dans son sens le plus strict, le terme de GECl inclue également les protéines bioluminescentes telle que l'aequorine. Cependant, mon travail de thèse s'étant uniquement focalisé sur l'utilisation et la*



**Figure 32. Structure de la calmoduline (CaM) et de la troponine C (TnC), protéines de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$**

- La calmoduline et la troponine C sont des protéines en forme d'haltère constituées de 4 motifs « main-EF » (EF1-4). Les motifs EF sont regroupés par paire et forme les deux têtes globulaires de la protéine (N- et C-terminales) réunies par une hélice  $\alpha$  centrale. Ces protéines possèdent donc 4 motifs EF et sont ainsi capables de fixer 4 ions  $\text{Ca}^{2+}$  au total.
- Structure d'une tête globulaire C-terminale reconstituée à partir de la troponine C du muscle squelettique de poulet. Une tête globulaire est composée de deux motifs « main-EF » (EF3 et EF4). Chaque « main EF » a une structure en hélice-boucle-hélice capable de fixer un ion  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Agrandissement de la coordination de la structure du domaine «main-EF » 3 lors de sa fixation au  $\text{Ca}^{2+}$ .

Modifié d'après Mank et Griesbeck (2008)

*caractérisation de biosenseurs fluorescents, le terme de GECl sera utilisé pour identifier ce type de protéines seulement.*

## 2.1. Caractéristiques des GECl et stratégies d'optimisation

Un très grand nombre de biosenseurs fluorescents sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  est disponible à l'heure actuelle et chacun comporte une combinaison d'avantages et d'inconvénients qui lui est propre (Tableau II). Il n'existe donc pas de biosenseur  $\text{Ca}^{2+}$  universel capable de répondre de manière unanime à toutes les applications possibles. Au lieu de cela, de nombreux critères sont à considérer (capacité à chélater le  $\text{Ca}^{2+}$ , affinité et cinétique de réponse, rendement, sélectivité, ...) pour déterminer la protéine la plus appropriée à une condition expérimentale donnée.

### 2.1.1. Capacité à complexer le $\text{Ca}^{2+}$

Puisque les FPs connues sont insensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  lorsqu'elles sont sous leur forme native, la capacité à complexer le  $\text{Ca}^{2+}$  des GECl – prérequis essentiel à leur fonction – est permise par la présence d'une protéine de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ . La nature de ces sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  détermine les propriétés du biosenseur et les stratégies à mettre en place pour sa conception. Le domaine sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  choisi pour la conception des deux grands types de GECl est soit la calmoduline (CaM) soit la troponine C (TnC). Ces deux protéines sont des tampons  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires (voir aussi *section II.2.3. Tampons calciques cytoplasmiques*) dont le domaine de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  est constitué de motifs « main-EF ». Chaque motif est composé d'environ 30 acides aminés repliés en structure hélice-boucle-hélice capable de fixer un ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Kretsinger et Nockolds 1973). La CaM et la TnC sont des petites protéines (~17-18 kDa) en forme d'haltère capables de fixer 4 ions  $\text{Ca}^{2+}$  au total car chacune de leurs deux têtes globulaires est formée par deux motifs « main-EF » (Figure 32). Plus précisément, la CaM et la TnC sont apparues comme domaines sensibles de choix pour les GECl car elles changent de conformation lorsqu'elles fixent le  $\text{Ca}^{2+}$  (pour revue, voir Mank et Griesbeck 2008).

### 2.1.2. Affinité et cinétiques de réponse

- **Affinité / constante de dissociation à l'équilibre ( $K_D$ )**

Il est essentiel d'adapter l'affinité du biosenseur aux valeurs et à l'étendue des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  attendues dans le système d'application. L'affinité d'un GECl donné peut être caractérisée par son  $K_D$  qui correspond à la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  pour laquelle la saturation de l'indicateur est de 50 % et donc, dans le cas le plus simple, pour laquelle il répond avec une variation d'amplitude atteignant 50% de sa réponse maximale, soit  $(\Delta F_{\text{max}}/F_0)/2$ . Comme c'est le cas pour tous les types d'indicateurs, pour qu'un biosenseur  $\text{Ca}^{2+}$  soit capable de détecter des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  de manière fiable, la valeur de son  $K_D$  doit être compatible avec la gamme de changement de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  attendue dans

le système étudié (pour revue, voir Koldenkova et Nagai 2013). Ainsi, un GECl ayant forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (typiquement,  $K_D < 1 \mu\text{M}$ ) sera approprié à l'étude de faibles variations de  $\text{Ca}^{2+}$  (voir par exemple Tallini et al. 2006). En revanche, un GECl présentant une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10 > K_D > 100 \mu\text{M}$ ) sera adapté à l'étude de systèmes dans lesquels les niveaux de variation  $\text{Ca}^{2+}$  sont très importants (voir par exemple Tang et al. 2011).

- **Cinétiques de réponse et constantes de temps ( $\tau$ )**

Les cinétiques de réponse du biosenseur à une variation de  $\text{Ca}^{2+}$  dépendent bien évidemment des cinétiques de variation de  $\text{Ca}^{2+}$  mais également de la vitesse :

- des changements conformationnels impliqués dans l'association (*on*) et la dissociation (*off*) du  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- et/ou de l'interaction (*on*) et de la dissociation (*off*) du complexe CaM-M13,
- et/ou des mécanismes d'interaction allostérique impliqués dans le FRET.

L'ensemble de ces phénomènes contribuent à ralentir la réponse des biosenseurs et explique qu'ils présentent des cinétiques plus lentes que les indicateurs fluorescents de synthèse les plus rapides (ex : rhod-2, fluo-4-ff, Oregon Green 488 BAPTA-5N).

Les propriétés cinétiques sont à prendre en compte afin de se représenter au mieux la réalité cinétique de l'évènement  $\text{Ca}^{2+}$  ayant généré le changement de fluorescence détecté. Ainsi, minimiser le nombre et la durée des changements conformationnels intramoléculaires, impliqués dans la transduction du signal  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse fluorescente, est une des stratégies développées pour améliorer ces propriétés (ex : CatchER, Tang et al. 2011).

### 2.1.3. Rendement

L'amplitude relative maximale (ou *dynamic range* ou rendement) de la réponse est une propriété particulièrement importante des GEClS (Figure 37 B). En effet, plus l'amplitude relative de la réponse vis-à-vis des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  est importante, plus le rapport signal/bruit est favorable.

Dans la littérature, le rendement des biosenseurs calciques est exprimée le plus souvent comme le rapport de l'intensité maximale et minimale du signal fluorescent en conditions respectives de concentration saturante (max) et d'absence (min) de  $\text{Ca}^{2+}$  :  $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}$  ou  $(F_{\text{max}}-F_{\text{min}})/F_{\text{min}}$  aussi indiqué comme  $\Delta F_{\text{max}}/F_{\text{min}}$  qui correspond simplement à  $(F_{\text{max}}/F_{\text{min}}) - 1$ . Cependant les valeurs de  $F_{\text{max}}$  et  $F_{\text{min}}$  ne sont pas toujours faciles à mesurer et l'on trouve aussi beaucoup de résultats dans la littérature pour lesquels le rendement est exprimée comme l'intensité de fluorescence  $F$  (ou  $\Delta F$ ) du signal rapportée à l'intensité de fluorescence au repos  $F_0$  dans la cellule qui exprime le biosenseur, en réponse à une stimulation donnée (par exemple un certain nombre de potentiels d'action) :  $F/F_0$  ou  $(F-F_0)/F_0$ . Ces valeurs sont aussi parfois exprimées en pourcentage. Les mêmes principes sont appliqués aux

biosenseurs pour lesquels un rapport (R) d'intensité de fluorescence à deux longueurs d'onde est quantifié :  $R_{\max}/R_{\min}$ ,  $(R_{\max}-R_{\min})/R_{\min}$ ,  $\Delta R/R_0$  ...

Le rendement d'un GECl peut être augmentée par :

- remplacement du couple de FPs (ex : ECFP-EYFP au lieu de EBFP-EGFP; Miyawaki et al. 1997)
- mutagenèse dirigée dans une FP (ex : mutations cpEGFP<sup>K78H</sup> ; Chen et al. 2013) ou dans le domaine de fixation au Ca<sup>2+</sup> (ex : mutations au niveau de la TnC; Mank et al. 2006)
- modification de l'interface CaM-M13 (Palmer et al. 2004, 2006)

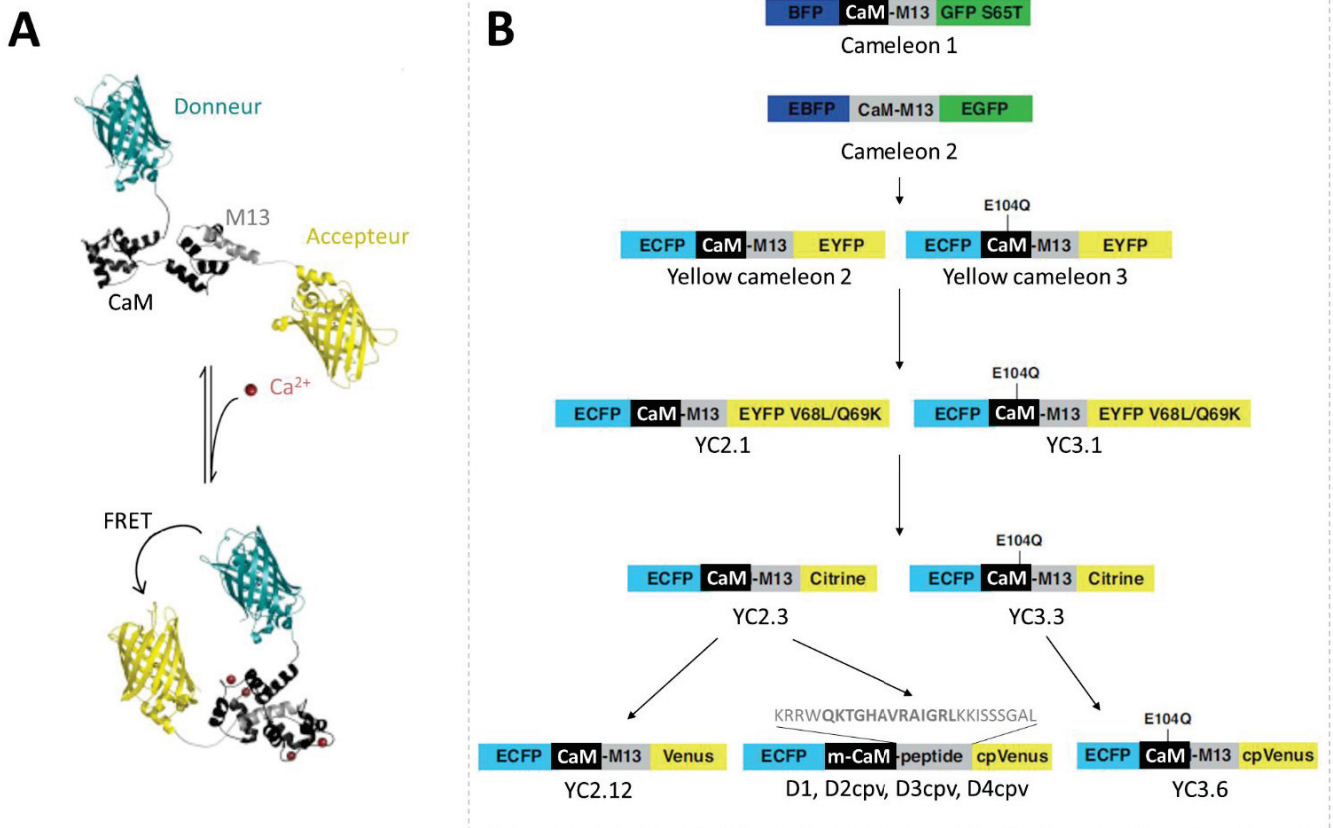
#### 2.1.4. Sélectivité

Dans une cellule au repos, les concentrations intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> libre sont faibles (10-100 nM). En revanche, un autre ion divalent, le Mg<sup>2+</sup> présent à des concentrations proches du mM (0.1-1 mM), peut entrer en compétition avec le Ca<sup>2+</sup>. La sensibilité au Mg<sup>2+</sup> est surtout retrouvée chez les GEClis basés sur la troponine C et a pu être abolie grâce l'introduction de mutations au niveau des motifs EF3 et EF4 (Mank et al. 2006).

En raison de l'interaction étroite entre les propriétés spectrales d'une FP et l'état de protonation de son chromophore, le pKa du biosenseur ainsi que les variations de pH dans les conditions expérimentales d'application doivent également être caractérisés afin d'éviter les contaminations des signaux enregistrés. Heureusement, la mutagenèse dirigée des FPs a permis de générer de nombreux variants pour s'affranchir de la sensibilité des biosenseurs Ca<sup>2+</sup> aux faibles variations de pH intracellulaire (voir par exemple Miyawaki and Tsien 2000).

#### 2.1.5. Niveau d'expression

De fortes concentrations intracellulaires de GEClis peuvent améliorer le rapport signal/bruit. En revanche, lorsqu'ils sont exprimés à des niveaux trop élevés, ils peuvent jouer le rôle de tampon calcique, ralentir les cinétiques des transitoires Ca<sup>2+</sup> et ainsi modifier la signalisation intracellulaire (Miyawaki et al. 1999). De plus, le domaine détecteur composant le biosenseur (ex : CaM, M13) peut interférer avec des protéines endogènes et/ou être perturbé par celles-ci (Heim et Griesbeck 2004). La conception de GEClis à partir de protéines mutées (Palmer et Tsien 2006) ou avec des protéines de liaison au Ca<sup>2+</sup> qui ne sont pas typiquement retrouvées dans le système d'application (Heim et Griesbeck 2004) sont des stratégies ayant été développées afin de s'affranchir de telles interférences.



**Figure 33. Les protéines Caméléons : biosenseurs fluorescents  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants basés sur la CaM**

- A.** Les protéines Caméléons sont des biosenseurs-FRET composés de deux FP (donneur en bleu et accepteur en jaune), du domaine de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  de la CaM de Xénope (en noir) et du peptide M13 (en gris). Lors de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  à la CaM, le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM interagit avec le peptide M13 induisant un rapprochement des deux partenaires de fluorescence et donc une augmentation du FRET. Modifié d'après McCombs et Palmer (2008)
- B.** Evolution des biosenseurs de type Caméléon. La mutation E104Q dans les protéines YC3.X diminue l'affinité au  $\text{Ca}^{2+}$ . Les protéines D1 et DXcpv ont été conçues par modification de l'interface CaM/M13 par insertion de mutations dans la CaM et création d'un peptide M13 hybride (séquence en gris : KRRWQKTGHAVRAIGRLKKISSSGAL). Les extrémités du peptide hybride (KRRW et KISSSGAL) proviennent de la kinase de la chaîne légère de myosine du muscle squelettique. La région centrale (lettres en gras, QKTGHAVRAIGRL) de la séquence peptidique provient de la kinase de la chaîne légère de myosine du muscle lisse. Modifié d'après Palmer et al. (2011)

## 2.2. Les différents types de GECIs

### 2.2.1. GECIs basés sur la calmoduline (CaM)

#### 2.2.1.1. Les biosenseurs-FRET

- **La protéine FIP-CB<sub>SM</sub>**

Le biosenseur FIP-CB<sub>SM</sub> est le premier GECI à avoir été conçu. Il est composé du peptide M13 et des deux protéines fluorescentes BGFP et RGFP (Romoser et al. 1997). Cependant, il s'est avéré être davantage capable de rapporter la force de l'interaction entre le peptide M13 et le complexe Ca<sup>2+</sup>-CaM que de rendre compte, de manière fiable, des variations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire.

- **Les GECIs de type Caméléon**

En parallèle de la conception de la protéine FIP-CB<sub>SM</sub>, une autre approche a permis de générer les biosenseurs-FRET sensibles au Ca<sup>2+</sup> de type Caméléon par fusion du complexe CaM-M13 à deux FPs (Figure 33) (Miyawaki et al. 1997). Toutes les protéines de ce type ont été conçues pour changer de conformation en présence de Ca<sup>2+</sup> et ainsi être capables de convertir la détection de Ca<sup>2+</sup> en signal fluorescent. En effet, lors de l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, la CaM fixe le Ca<sup>2+</sup> et le complexe Ca<sup>2+</sup>-CaM formé interagit avec le peptide M13 voisin ce qui induit un changement de conformation de la protéine recombinante et donc une augmentation de l'efficacité du FRET entre les deux partenaires de fluorescence.

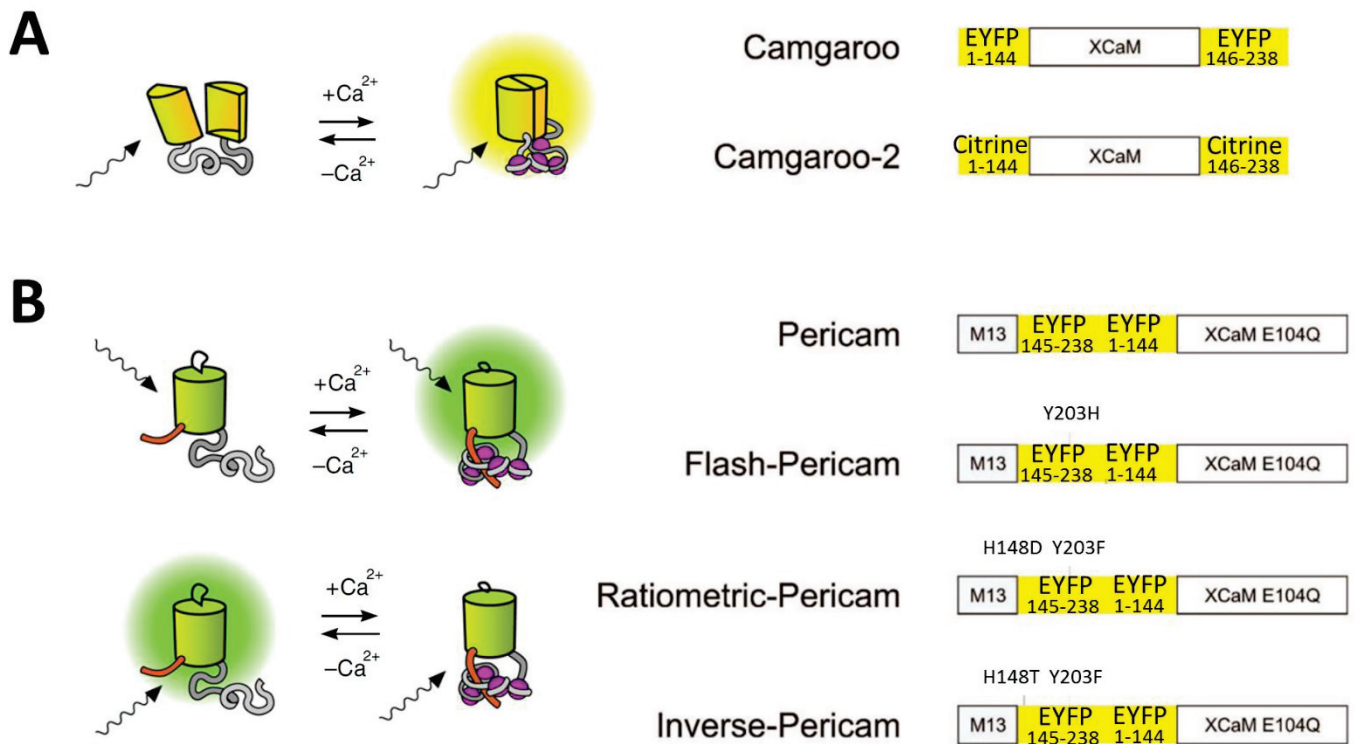
La calibration de la réponse fluorescente de la première protéine conçue, **Caméléon 1** (couple de fluorescence BFP-GFP<sup>S65T</sup>), fournit une mesure précise des variations de Ca<sup>2+</sup> libre *in vitro*. Cependant, ce construit est inadapté aux enregistrements sur cellules vivantes en raison de la faible brillance et de la photo-instabilité de la BFP (Miyawaki et al. 1997).

Des variants de la protéine Caméléon 1 ont donc été générés ensuite en remplaçant le couple de fluorescence BFP-GFP<sup>S65T</sup> par le couple EBFP-EGFP (**Caméléon 2**) ou ECFP-EYFP (**YC2** pour *yellow cameleon 2*) (Miyawaki et al. 1997). Finalement, le biosenseur YC2 fournit un meilleur rapport signal/bruit que les protéines Caméléons 1 et 2 en raison du chevauchement spectral plus important de la ECFP et de la EYFP.

La protéine Caméléon 1 présente des sites « main-EF » de haute (K<sub>D</sub>1= 0.07 μM) et de faible (K<sub>D</sub>2=11 μM) affinités pour le Ca<sup>2+</sup>. L'introduction d'une mutation (E104Q) dans le domaine chélateur de Ca<sup>2+</sup> du motif EF3 a permis d'éliminer la composante de haute affinité et de concevoir le variant nommé **YC3** de plus faible affinité (K<sub>D</sub>= 4.4 μM) donc davantage adapté à la détection de fortes concentrations de Ca<sup>2+</sup> (Miyawaki et al. 1997).

Toujours dans le but d'améliorer la réponse de ce type de biosenseur, la stratégie d'optimisation s'est ensuite centrée sur la sensibilité au pH. Le pKa de la EYFP est centré autour de 7 ce qui lui confère une sensibilité maximale à de légères variations de pH intracellulaire (pH cytosolique =6.8 - 7.3) (Llopis et





**Figure 34. Les protéines Camgaroos et Péricams : biosenseurs-FP  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants basés sur la CaM**

- A.** Les biosenseurs  $\text{Ca}^{2+}$  de type Camgaroo comprennent un variant de la YFP (EYFP ou Citrine) comme FP dans lequel la CaM de Xénope a été insérée à la place du résidu 145. Lors de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ , la CaM se replie induisant un rapprochement des deux portions de EYFP et ainsi une augmentation de la fluorescence émise.
- B.** Les biosenseurs  $\text{Ca}^{2+}$  de type Péricam sont formés à partir de la cpEYFP, de la CaM et du peptide M13. La nouvelle portion N-terminale (résidus 145 à 238) est fusionnée au peptide M13 et la nouvelle portion C-terminale (résidus 1 à 144) est fusionnée à la CaM. Les 3 variants Flash-, Ratiometric- et Inverse- Péricam ont été générés par introduction de mutations dans la portion C-terminale de la EYFP. Lors de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  à la CaM, le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -M13 interagit, entraînant un changement de conformation de la EYFP et donc un changement de l'environnement du chromophore à l'origine de l'augmentation de fluorescence émise (Flash-Péricam, schéma du haut). Dans le cas du variant Ratiometric-Péricam, la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne un décalage du spectre d'absorption et d'émission de la protéine via la déprotonation du chromophore donc l'augmentation de l'absorption à 490 nm et l'augmentation de la fluorescence émise à 530 nm. Enfin, lors de sa fixation au  $\text{Ca}^{2+}$ , le variant Inverse-Péricam répond par une diminution de la fluorescence (schéma du bas).

Modifié d'après Pérez Koldenkova et Nagai (2013) ; D'après Mank et Griesbeck (2008)

al. 1998; Miyawaki et al. 1999; Miyawaki et Tsien 2000). La mutagenèse dirigée de la EYFP (V68L/Q69K) portée par les construits YC2 et YC3 a permis de générer les variants **YC2.1** et **YC3.1** au pKa plus faible (pKa=6.1) et donc plus résistants aux variations physiologiques de pH intracellulaire (Miyawaki et Tsien 2000).

Puis, le remplacement de la EYFP mutée par d'autres FPs a permis d'améliorer encore les propriétés de réponse des protéines Caméléons. Les variants **YC2.3** et **YC3.3** (couple ECFP-Citrine) sont moins sensibles aux changements de l'environnement (pH, concentrations de Cl<sup>-</sup>, excitation laser) que les protéines YC2.1 et YC3.1 d'origine (Griesbeck et al. 2001; Nagai et al. 2002). Le variant **YC2.12** (couple ECFP-Vénus) a une sensibilité au Ca<sup>2+</sup> plus importante que la protéine YC2 (couple ECFP-EYFP) (Nagai et al. 2002). Enfin, le variant **YC3.6** (couple ECFP-cpVénus) présente une plus grande sensibilité au Ca<sup>2+</sup> en comparaison à YC3.3 (couple ECFP-Citrine) (Nagai et al. 2004).

L'interaction CaM-M13 a ensuite été repensée par création d'une nouvelle interface plus forte entre une CaM mutée et un peptide M13 muté (26 résidus) (Figure 33 B). La genèse de cette paire de protéines mutées a mené au développement d'une nouvelle génération de protéines Caméléons – nommées **D1** (pour *Design 1*), **D2cpv** (pour *Design 2 containing cpVenus*), **D3cpv** et **D4cpv** – qui, contrairement à leurs prédécesseurs, ne sont pas perturbées par un excès de CaM endogène (Palmer et al. 2004, 2006). Ceci a constitué une étape importante dans la conception des GECIs qui n'interfèrent pas avec les protéines endogènes ni ne sont perturbées par elles.

#### 2.2.1.2. Les biosenseurs-FP

- **Les GECIs de type Camgaroo**

Le remplacement du résidu 145 de la protéine fluorescente EYFP par la séquence d'acides aminés complète de la CaM de Xénope a permis de générer la protéine de fusion **Camgaroo 1** dont les propriétés de fluorescence sont modulées par les concentrations de Ca<sup>2+</sup> libre (Figure 34 A). Lors de sa liaison au Ca<sup>2+</sup>, la protéine Camgaroo 1 change de conformation, ce qui favorise la déprotonation du chromophore (forme anionique). Comme décrit précédemment, la déprotonation du chromophore entraîne un décalage du spectre d'absorption de la EYFP qui passe d'un pic à 400 nm en l'absence de Ca<sup>2+</sup> à un pic de 490 nm en présence de Ca<sup>2+</sup> en excès. Etant donné que c'est la forme anionique du chromophore qui contribue à la fluorescence de la EYFP ( $\lambda_{em} \sim 530$  nm), la présence de Ca<sup>2+</sup> entraîne donc une augmentation de la fluorescence émise par la protéine Camgaroo 1. En revanche, la sensibilité intrinsèque de la EYFP au pH (pKa= 7.1  $\mu$ M; Llopis et al. 1998) (Figure 32 B) fait de Camgaroo 1 un biosenseur de pH Ca<sup>2+</sup>-dépendant qui manque de visibilité à des concentrations basales de Ca<sup>2+</sup>. La version évoluée **Camgaroo 2**, dans laquelle la EYFP a été remplacée par la Citrine, est visible en

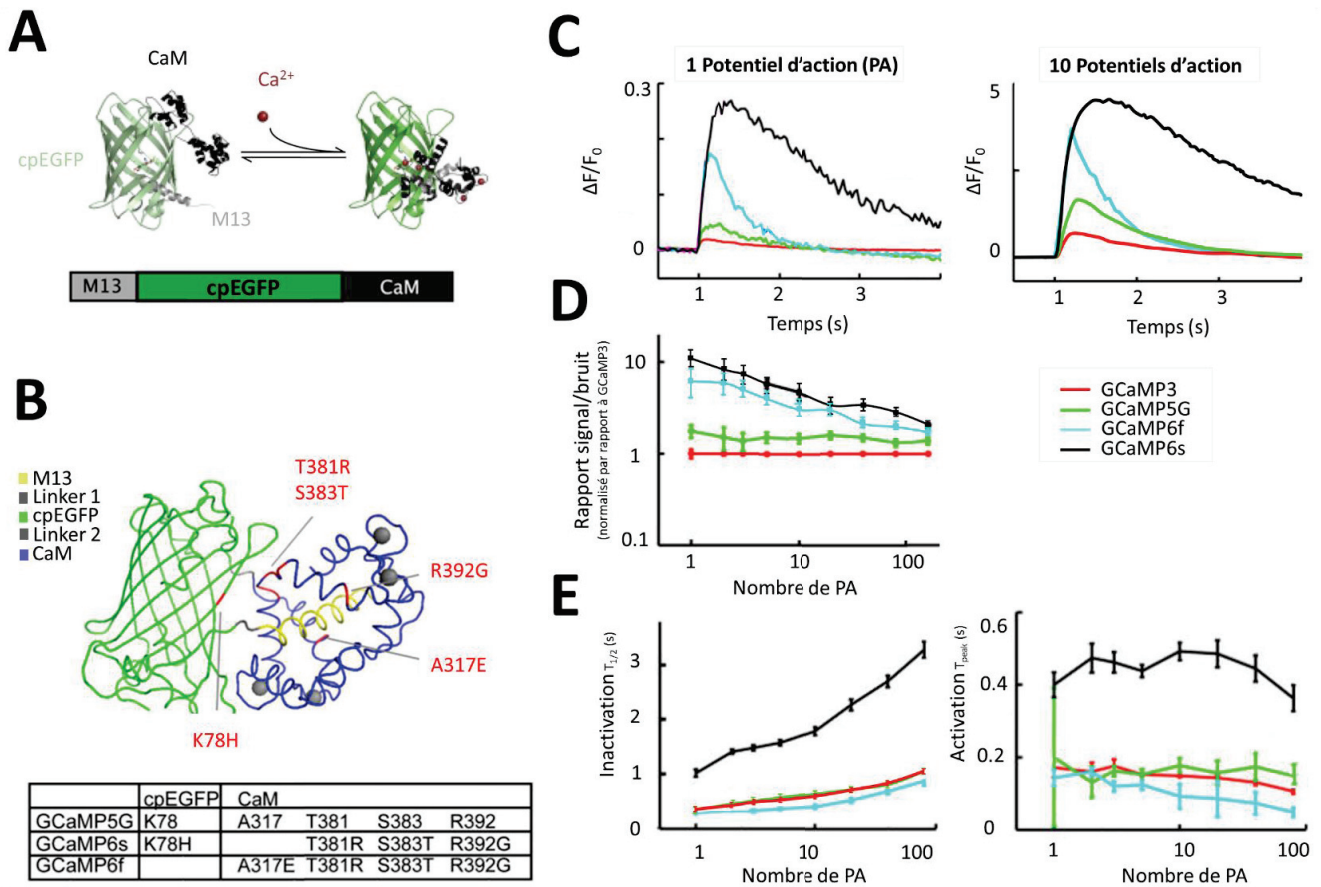
présence de faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  mais sa sensibilité au pH n'est pas supprimée (Griesbeck et al. 2001).

- **Les GECIs de type Pericam**

Dans les protéines Péricams, la permutation circulaire de la EYFP utilise 1) le résidu Y145 comme nouvelle extrémité N-terminale fusionnée au peptide M13 et 2) le résidu N144 comme nouvelle extrémité C-terminale fusionnée à la CaM (Figure 34 B). De plus, afin que ce type de GECI soit résistant aux variations physiologiques de pH et qu'il présente une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , des mutations – ayant déjà fait leurs preuves dans les protéines Caméléons de type YC3.X (Miyawaki et al. 1997, Miyawaki et Tsien 2000) - ont été introduites dans la EYFP (V68L/Q69K) et dans la CaM (E104Q) (Nagai et al. 2001). Enfin, la mutagénèse dirigée dans la séquence de la cpEYFP a conduit à la conception de trois protéines de forte sensibilité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . **Flash-Péricam** porte la mutation Y203H et présente une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D=0.7 \mu\text{M}$ ). **Ratiometric-Péricam** porte la double mutation H148D/Y203F qui induit un décalage du spectre d'absorption de 400 nm à 490 nm en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , par déprotonation du chromophore, et donc une augmentation de la fluorescence émise à 530 nm ( $K_D= 1.7 \mu\text{M}$  et  $\Delta F_{\text{max}}/F_0=10$ ). **Inverse-Péricam** porte la double mutation H148T/Y203F et sa fluorescence diminue en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  en excès ( $K_D=0.2 \mu\text{M}$  et  $\Delta F_{\text{max}}/F_0=6.7$ ) (Nagai et al. 2001).

- **Les GECIs de type GCaMP**

Les GECIs de type GCaMP (pour *GFP-calmoduline-M13 protein*) ont une structure similaire à celle des protéines Péricams et sont conçus à partir du peptide M13, de la cpEGFP et de la CaM (Figure 35 A). En raison de leur brillance, de leur photostabilité et de leur biostabilité, les GCaMPs constituent une famille de protéines très populaire dans le domaine des biosenseurs fluorescents sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . La conception du premier prototype **GCaMP1** a établi l'architecture fonctionnelle de base des protéines de type GCaMP : la permutation circulaire de l'EGFP utilise le résidu 149 comme nouvelle extrémité N-terminale fusionnée au peptide M13 et le résidu 144 comme nouvelle extrémité C-terminale fusionnée à la CaM (Nakai et al. 2001). Lors de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ , l'interaction du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM avec le peptide M13 entraîne un changement de conformation de la cpEGFP qui induit 1) l'augmentation de la contrainte appliquée sur les mouvements du chromophore par encombrement stérique, et 2) la déprotonation du chromophore. Ces deux phénomènes sont à l'origine de l'augmentation de la fluorescence émise à 510 nm par la protéine en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . GCaMP1 présente un rendement médiocre ( $F_{\text{max}}/F_0= 3.5$ ) et une forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D=0.24 \mu\text{M}$ ) appropriée à la détection de faibles variations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. En revanche, cette protéine se replie mal *in vivo*, présente une maturation lente à une température physiologique de 37°C et a une sensibilité élevée au pH ( $\text{pKa} \sim 7$ ) (Reiff et al. 2005).



**Figure 35. Les protéines GCaMPs : biosenseurs-cpFP Ca<sup>2+</sup>-dépendants basés sur la CaM**

- Les protéines de type GCaMP sont composées du peptide M13, de la cpEGFP et de la CaM. D'après McCombs et Palmer (2008)
- Les variants GCaMP6s et GCaMP6f ont été générés par l'introduction de mutations dans la séquence codant pour le variant GCaMP5G au niveau de la cpEGFP (position 78) et/ou de la CaM (positions 317, 381, 383 et/ou 392).
- Variations de la fluorescence émise ( $\Delta F/F_0$ ) par les variants de type GCaMP-3 (en rouge), 5G (en vert), 6f (en cyan) et 6s (en noir) à un (à gauche) ou dix (à droite) potentiels d'action (PA).
- Evolution du rapport signal/bruit des variants de GCaMP (3, 5G, 6s et 6f), normalisé par le rapport signal/bruit de GCaMP3, en fonction du nombre de stimulations (PA) imposées.
- Propriétés cinétiques des variants de GCaMP (3, 5G, 6f et 6s). L'activation correspond au temps nécessaire (en ms) pour atteindre l'amplitude maximale du signal en fonction du nombre de stimulations (PA). L'inactivation correspond au T50, temps nécessaire pour atteindre 50 % de la décroissance en fonction du nombre de PA.

Modifié d'après Chen et al. (2013)

Afin de résoudre ces problèmes, le variant **GCaMP2** a été généré par l'ajout d'un fragment poly-histidine en position N-terminale du peptide M13 et l'introduction de mutations dans les portions N- (cp144-238 : V163A, S175G et D180Y) et C- (cp1-144 : V93I) terminales de la cpEGFP. Finalement, GCaMP2 affiche des propriétés de brillance et d'expression à 37°C améliorées par rapport à son prédécesseur GCaMP1 (Tallini et al. 2006).

Le variant **GCaMP3** a été généré par délétion de 4 résidus et introduction du domaine de liaison à la CaM « RS20 », isolé de la chaîne légère de myosine du muscle lisse, à la place du peptide M13. Les propriétés de cette protéine dépassent celles des GCaMPs 1 et 2 en terme de photostabilité, de faible brillance de base et de sensibilité (Tian et al. 2009; Dombeck et al. 2010).

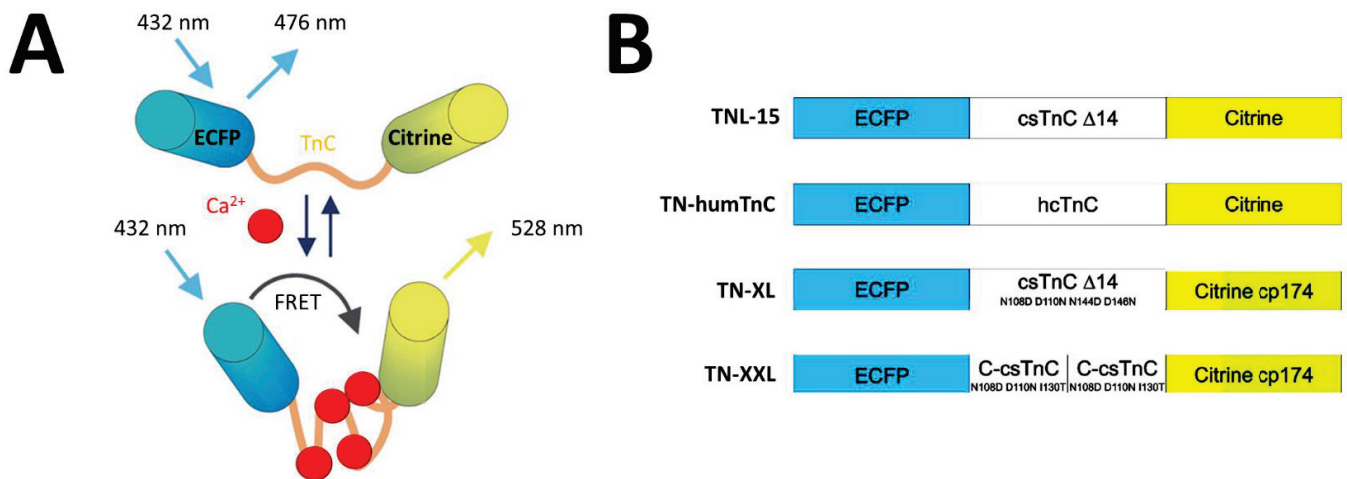
Puis, dans l'objectif de toujours optimiser les propriétés de réponse des biosenseurs Ca<sup>2+</sup> de type GCaMP, de nombreux variants ont été construits (pour revue, voir Badura et al. 2014): **GCaMP-HS** (Muto et al. 2011), **GCaMP5** (Akerboom et al. 2012), **GCaMP6** (Chen et al. 2013a), **GCaMP7** et **GCaMP8** (Ohkura et al. 2012; Muto et al. 2013; Dana et al. 2018).

**Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai pu travailler avec les variants de type GCaMP6.** Ces protéines recombinantes ont été conçues par Chen et al. (2013) à partir du variant GCaMP5G dans le but d'une détection de la signalisation Ca<sup>2+</sup> *in vivo* à forte résolution spatio-temporelle. La protéine GCaMP5G de haute sensibilité ( $\Delta F_{max}/F_0 = 33$ ) et de forte affinité ( $K_D = 0.46 \mu M$ ) pour le Ca<sup>2+</sup> est composée : du peptide M13, de la cpEGFP, de la CaM<sup>D380Y</sup> et porte les mutations T302L et T303P au niveau du *linker 2* connectant la cpEGFP et la CaM (Akerboom et al. 2012).

Afin d'améliorer encore le rendement de la protéine GCaMP5G, la mutagenèse a été dirigée au niveau de 16 résidus positionnés à l'interface entre la cpEGFP C-terminale et la CaM. De plus, afin de moduler l'affinité et donc les cinétiques de réponse de la protéine, 18 substitutions ont été testées au niveau des résidus intervenant dans l'interaction entre le peptide M13 et la CaM (notamment en positions 317 et 392). Finalement, les variants de type GCaMP6 ont été sélectionnés et caractérisés *in vitro* sur des neurones en culture avant d'être utilisés *in vivo* et en particulier les protéines GCaMP6s et GCaMP6f (Chen et al. 2013) :

- **GCaMP6s** (pour *slow kinetics*) est composé du peptide M13, de la cpEGFP<sup>K78H</sup> et de la CaM<sup>D380Y/T381R/S383T/R392G</sup>
- **GCaMP6f** (pour *fast kinetics*) est composé du peptide M13, de la cpEGFP et de la CaM<sup>D380H/A317E/T381R/S383T/R392G</sup> (Figure 35 B).

Ces deux biosenseurs ont une brillance de base similaire à GCaMP5G mais le rendement de leur réponse est augmenté. De plus, ils ont des propriétés cinétiques différentes : le plus sensible est le plus lent (GCaMP6s). En réponse à un petit nombre de PA, GCaMP6s produit un signal d'amplitude 7 fois plus importante que GCaMP5G (et >10 fois la réponse de GCaMP3) (Figure 35 C). De plus, son affinité



**Figure 36. Les biosenseurs-FRET  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendants basés sur la TnC**

- A.** Les biosenseurs basés sur la TnC sont composés du couple de FRET ECFP (donneur) – Citrine (accepteur). Lors de la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur les sites « main-EF » de la TnC, celle-ci change de conformation, ce qui entraîne un rapprochement des deux partenaires de fluorescence et donc une augmentation du FRET. D'après Garaschuk et al. 2007
- B.** Le variant **TN-L15** exploite une version tronquée de la TnC ( $\Delta 14$ ) isolée du muscle squelettique de poulet (cs pour *chicken skeletal*). Le variant **TN-humTnC** (pour human cardiac troponin C) est basé sur le domaine de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  de la TnC humaine. Le variant **TN-XL** utilise le couple de FRET ECFP-cpCitrine et une version mutée de la csTnC touchant les domaines EF3 et EF4 afin d'augmenter sa spécificité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans le variant **TN-XXL**, la portion N-terminale de la csTnC a été tronquée et la portion C-terminale a été dédoublée et mutée afin d'augmenter son affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . D'après Mank et Griesbeck 2008

pour le  $\text{Ca}^{2+}$  est 3 fois plus importante que GCaMP5G. GCaMP6f est le biosenseur le plus rapide, s'activant et s'inactivant, respectivement 2 et 1.7 fois, plus vite que la protéine GCaMP5G d'origine (Figure 36 E).

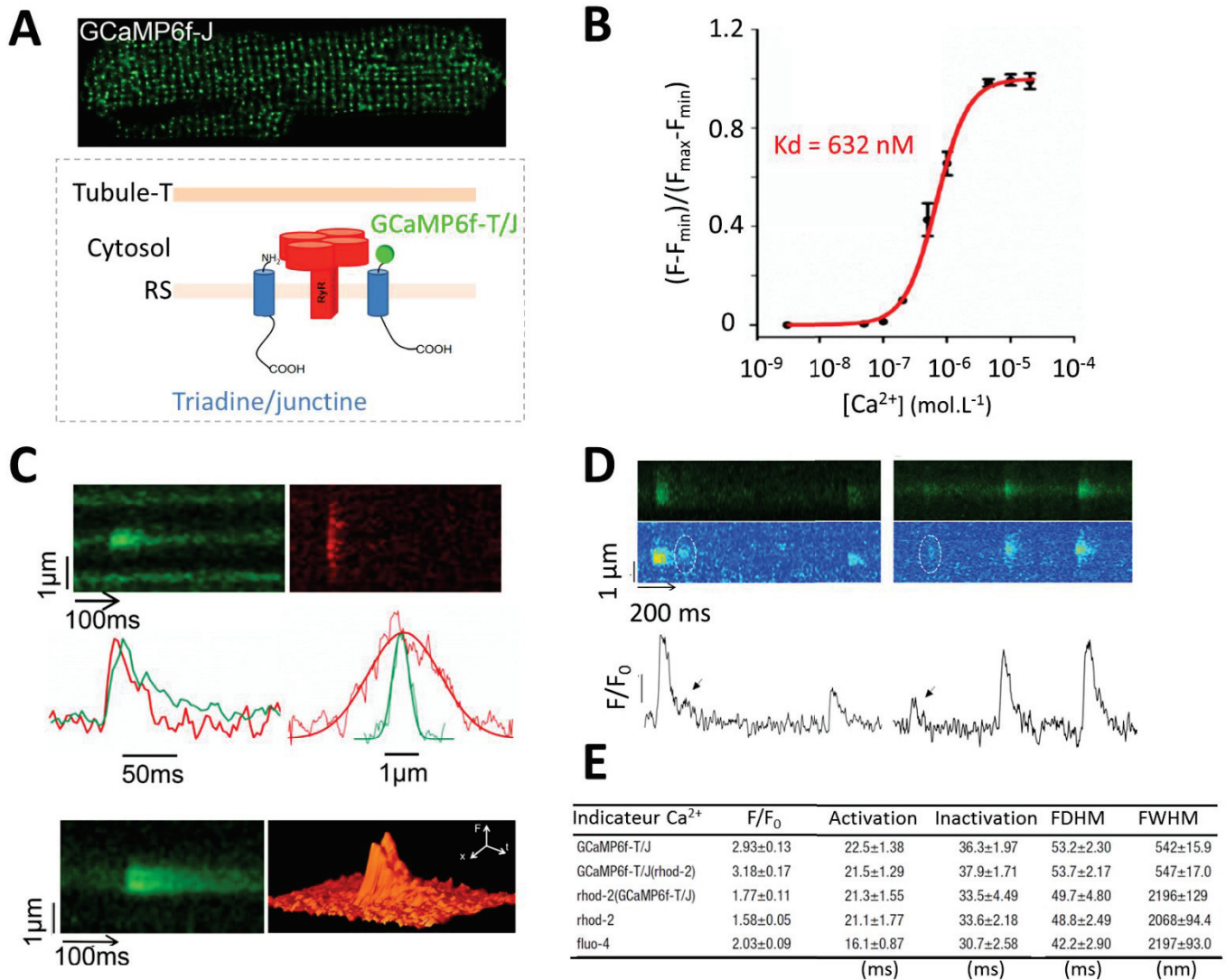
En résumé, les travaux de Chen et al. (2013) ont permis de développer un nouveau type de protéines aux propriétés nettement améliorées en comparaison à leurs prédécesseurs. En effet, les biosenseurs GCaMP6 présentent une sensibilité plus importante que certains indicateurs  $\text{Ca}^{2+}$  synthétiques (ex : OGB1) et sont capables de détecter des potentiels d'action *in vivo* avec une grande fiabilité.

### 2.2.2. GECIs basés sur la troponine C (TnC)

Les GECIs basés sur la TnC ont une structure similaire aux protéines Caméléons et exploitent le mécanisme de FRET entre le couple de fluorescence ECFP-Citrine (Figure 36). En revanche, c'est la TnC qui constitue le domaine sensible de ces biosenseurs (Garaschuk et al. 2007). Les premières protéines de ce type ont été conçues à partir de l'isoforme du muscle squelettique de poulet (**TN-L15**) ou du muscle cardiaque humain (**TN-humTnC**) et possèdent une affinité relativement forte pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D = 1.2 \mu\text{M}$  et  $0.47 \mu\text{M}$ , respectivement ; Heim et Griesbeck 2004). En revanche, les têtes C-terminales (EF3 et EF4) de la TnC lient également le  $\text{Mg}^{2+}$  par compétitivité, ce qui est à l'origine de changements conformationnels du biosenseur et donc de variations de FRET indépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . La conception du variant **TN-XL** (pour *FRET extra-large*) s'est donc basée sur l'introduction de mutations dirigées au niveau des domaines EF3 et EF4 afin d'abolir complètement cette sensibilité au  $\text{Mg}^{2+}$  et d'augmenter l'amplitude ( $\Delta F_{\text{max}}/F_0 = 400\%$ ) et les cinétiques de réponse ( $\tau_{\text{on}} = 240 \text{ ms}$ ) de la protéine aux variations de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mank et al. 2006). Enfin, le variant **TN-XXL**, qui possède une affinité relativement haute pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D = 0.8 \mu\text{M}$ ), a été généré dans le but de pouvoir détecter des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ordre de 100 à 500 nM. Pour cela, la structure de la TnC a été réarrangée par dédoublement et mutagenèse dirigée de la tête C-terminale de haute affinité puis délétion de la tête N-terminale de faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Mank et al. 2008).

### 2.2.3. Autre type de GECI

De manière intéressante, le dernier type de biosenseur sensible au  $\text{Ca}^{2+}$ , nommé CatchER, est un variant muté de l'EGFP qui présente une très faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D = 0.19 \text{ mM}$ ). Cette FP a été conçue dans le but de pouvoir détecter des variations de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum endoplasmique. Pour cela, Tang et al. (2011) ont introduit des résidus chargés négativement (D pour aspartate et E pour glutamate) en 5 positions bien précises (147, 202, 204, 223 et 225) de la protéine EGFP pour créer un site aux propriétés géométriques favorables à la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalement, lors de la fixation de CatchER au  $\text{Ca}^{2+}$ , seuls les changements conformationnels impliqués



**Figure 37. Le biosenseur Ca<sup>2+</sup> GCaMP6f adressé à la membrane du RS de cardiomyocytes**

- Pattern d'expression dyadique de la protéine de fusion GCaMP6f-Junctine dans un cardiomyocyte de rat adulte
- Courbe de calibration déterminée sur des cardiomyocytes perméabilisés à la saponine, exprimant le biosenseur GCaMP6f-T et exposés aux concentrations de Ca<sup>2+</sup> libre indiquées. Les intensités de fluorescence maximale (F<sub>max</sub>) et minimale (F<sub>min</sub>) émises par le biosenseur dyadique ont été mesurées respectivement en présence de 3.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup> et 2.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup>. La courbe en rouge a été obtenue par ajustement des points à l'aide de l'équation de Hill et a permis de déterminer le K<sub>D</sub>.
- Clichés de microscopie confocale en mode balayage de ligne montrant (en haut) un *nanospark* typique (en vert, à gauche) et un *spark* Ca<sup>2+</sup> enregistré simultanément avec l'indicateur Ca<sup>2+</sup> Rhod-2 (en rouge, à droite). Les tracés sous les images indiquent le déroulement (en ms) et l'étendue spatiale (en µm) de ces deux événements. En bas est représenté un exemple des sous-structures présentes dans certains *nanosparks* (en vert, à gauche) ainsi que l'évolution spatio-temporelle de ce signal intra-jonctionnel (en orange, à droite).
- Clichés de microscopie confocale qui montrent la libération de Ca<sup>2+</sup> spontanée au niveau d'une seule dyade (signal brut, F, en haut, et normalisé, F/F<sub>0</sub>, en bas). Les *nanosparks* générés sont d'amplitude variable. Les flèches indiquent l'apparition d'un *quark* durant la phase de déclin du *nanospark*.
- Comparaison des propriétés des *sparks* (rhod-2, fluo-4) et des *nanosparks* (GCaMP6f-T/J). L'activation correspond au temps au pic (en ms) et l'inactivation correspond au T50, temps pour atteindre 50 % de la décroissance.

D'après Shang et al. (2014)



dans son association et sa dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  sont à l'origine de la transduction du signal  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse fluorescente, d'où sa rapidité ( $\tau_{\text{off}} = 1.5$  ms, Tang et al. 2011).

## 2.3. Applications

### 2.3.1. Adressage subcellulaire

De nombreux GECIs ont été spécifiquement développés pour l'étude de la signalisation  $\text{Ca}^{2+}$  des compartiments subcellulaires (réticulum, appareil de Golgi, vésicules de sécrétion, mitochondrie, noyau) et ont ouvert une nouvelle ère dans le domaine de l'imagerie subcellulaire. En effet, la modulation de leur sensibilité et de leurs propriétés optiques ainsi que la possibilité de les fusionner à une séquence d'adressage spécifique ont contribué à mettre en évidence l'hétérogénéité spatiale des processus de signalisation  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (pour revue, voir Suzuki et al. 2016).

En particulier, d'importants efforts ont été fournis dans le développement des GECIs dans l'objectif d'accéder aux dynamiques calciques réticulaires (pour revues, voir Suzuki et al. 2016; Reddish et al. 2017). En effet, le RE/RS représente la source principale de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'origine de la signalisation  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les cellules excitables et non-excitables (contraction, plasticité synaptique, développement, sécrétion vésiculaire, ...).

Afin d'induire leur rétention dans la lumière du réticulum, les biosenseurs  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescents sont généralement fusionnés à une protéine luminale (ex : calréticuline) ou à la séquence -ER (résidu KDEL) (Kasai et Ide 1996; Canato et al. 2010; Kasai et al. 2004; Palmer et al. 2004; Tang et al. 2011; Niwa et al. 2016). Par exemple, Canato et al. (2010) ont exprimé le biosenseur D1-ER dans les fibres musculaires squelettiques de souris déficientes en calséquestrine et ont ainsi pu démontrer le rôle de cette protéine luminale dans la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$ .

De plus, des études montrent que la fusion d'un GECI (D4cpv, GCaMP2.2) à une protéine luminale (calséquestrine) ou d'interaction avec le RYR (FKBP12) permet d'étudier la signalisation  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire dans des cellules musculaires intactes avec des niveaux de résolution importants (Sztretye et al. 2011; Despa et al. 2014).

Les travaux de Shang et al. (2014) sur cardiomyocytes intacts de rat sont un exemple intéressant de l'utilité de l'adressage d'un biosenseur  $\text{Ca}^{2+}$  à la membrane jonctionnelle du RS. Pour cela, GCaMP6f a été fusionné à l'extrémité N-terminale d'une protéine réticulaire dyadique (la triadine, T ou la junctine, J) (Figure 37 A). Ainsi, la présence de GCaMP6f-T/J à proximité immédiate des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  RYR2 a permis d'observer des « *nanosparks* », transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  de forte amplitude, dans un volume optique 50 fois plus petit que les *sparks* observés avec des indicateurs conventionnels tel que le rhod-2 (Figure 37 C, D). De plus, les *nanosparks* présentent des cinétiques 4 fois plus rapides que les signaux observés

GEVI	VSD	Protéine(s) fluorescente(s) (λ émission)	Rendement	$\tau_{on}^{***}$ (rapide)	$\tau_{off}$	Dépendance au potentiel ( $V_{0.5}$ )
<b>FlaSh</b>	Canal Shaker K <sup>+</sup>	GFPΔC (510 nm)	5 %	15 ms	200 ms	- 40 mV
<b>SPARC</b>	Canal Na <sup>+</sup>	GFP (525 nm)	0.5 %	0.8 ms		- 52 mV
<b>VSFP1</b>	Canal K <sub>v</sub> 2.1	CFP (432 nm) / YFP (>530 nm) ou cp-GFP (>590 nm)	1.8 %	1 ms	1 ms	
<b>VSFP2.1</b>	<i>Ci</i> -VSP	Cerulean (480 nm) / Citrine (>530 nm)	6.8 %	15 ms	75 ms	- 70 mV
<b>VSFP2.3</b>	<i>Ci</i> -VSP	Cerulean (480 nm) / Citrine (>530 nm)	22 %	30 ms	80 ms	- 50 mV
<b>VSFP2.4</b>	<i>Ci</i> -VSP	Citrine (530 nm) / mKate2 (633 nm)	20.5 %	30 ms	50 ms	- 54 mV
<b>VSFP3.1</b>	<i>Ci</i> -VSP	Cerulean (475 nm)	2.2 %	1.8 ms	105 ms	
<b>Mermaid*</b>	<i>Ci</i> -VSP	mUKG (490 nm) / mKOκ (> 560 nm)	40 %	7.3 ms	130 ms	- 36 mV
<b>Mermaid2**</b>	<i>Ci</i> -VSP	CFP (432 nm) / YFP (>530 nm)	50 %	0.93 ms	10.3 ms	- 32 mV
<b>ArLight</b>	<i>Ci</i> -VSP	Super ecliptic pHluorin (525 nm) pHluorin A227D (510 nm)	35 % 18.1 %	14.5 ms 10 ms	44.6 ms 273 ms	- 20 mV -26 mV
<b>ASAP1</b>	Chicken-VSP	cpGFP (505 nm)	20 %	2.1 ms	2 ms	
<b>ASAP2f</b>	Chicken-VSP	cpGFP	45 %	2.9 ms	2.4 ms	
<b>ASAP2s</b>	Chicken-VSP	cpGFP	38 %	5.2 ms	24 ms	
<b>ArchD95N</b>	Arch	Cofacteur rétinien (715 nm)	33 %	<1 ms	< 1 ms	
<b>QuasAr1</b>	Arch	Cofacteur rétinien (715 nm)	32 %	0.05 ms	0.07 ms	

**Tableau III. Caractéristiques des principaux biosenseurs fluorescents voltage-dépendants**

\* valeurs obtenues sur des préparations d'ovocyte de xénope (Tsutsui et al. 2008)

\*\* valeurs obtenues sur des préparations de cellule HEK293 (Tsutsui et al. 2013b)

\*\*\* composante rapide

Le rendement correspond au pourcentage maximum d'augmentation du signal (fluorescence, rapport de fluorescence) de base ( $F_0$ ,  $R_0$ )

avec le biosenseur d'origine non adressé GCaMP6f. De manière spectaculaire, cette approche a permis de mettre en évidence l'existence de sous-groupes de canaux RYR qui s'activeraient simultanément au sein d'une même dyade (Figure 37 C) (Shang et al. 2014).

### 2.3.2. Expression tissu-spécifique

L'autre avantage majeur des GECIs est de pouvoir être exprimés de manière tissu-spécifique dans un organisme vivant (pour revue, voir Whitaker 2010). Initialement, le biosenseur de type Caméléon YC2.1 a été exprimé spécifiquement dans le muscle pharyngéal du ver *C-elegans*, ce qui a permis suivre les dynamiques  $Ca^{2+}$  pendant la contraction du pharynx chez le ver vivant (Kerr et al. 2000). Puis des GECIs ont été exprimés dans les neurones de projection des antennes de drosophiles pour observer leur réponse à des stimuli odorants (Diegelmann et al. 2002) ou dans un type spécifique de neurones du poisson-zèbre afin d'étudier leur implication dans le comportement de fuite (Higashijima et al. 2003). Finalement, grâce aux GECIs on est aujourd'hui capable d'accéder à l'activité de réseaux de neurones (ex : cortex visuel) chez la souris vivante (voir par exemple Chen et al. 2013).

## 3. Les biosenseurs fluorescents sensibles au potentiel (ou GEVIs)

### 3.1. Caractéristiques des GEVIs et stratégies d'optimisation

Depuis leur découverte il y a une vingtaine d'année, de nombreux laboratoires travaillent sur les défis associés à la conception des GEVIs en s'efforçant de toujours améliorer leur expression membranaire, leur rendement ainsi que le rapport signal/bruit tout en adaptant les vitesses et les gammes de potentiel auxquels ils sont sensibles en fonction des besoins expérimentaux. Chaque GEVI présente ses propres avantages et inconvénients et peut être approprié ou non en fonction de la question biologique (Tableau III). Il est donc difficile d'envisager un biosenseur idéale et unanime qui fournirait la solution à toutes les demandes. L'objectif du perfectionnement des GEVIs est plutôt d'accumuler un maximum d'outils disponibles afin de potentialiser les bénéfices de leurs usages (pour revues, voir Yang et St-Pierre 2016; Kannan et al. 2019).

Parmi les propriétés importantes des GEVIs qui nécessitent d'être considérées, on insistera en particulier dans ce manuscrit sur :

- l'intensité relative du signal pour une dépolarisation donnée
- la sensibilité au potentiel : potentiel de demi-« activation » ( $V_{0.5}$ )
- les cinétiques de réponse : le plus souvent caractérisées par les constantes de temps respectives de changement du signal fluorescent en réponse à l'application d'un créneau de dépolarisation-imposée ( $\tau_{on}$ ) et à la rupture de ce créneau ( $\tau_{off}$ ).

### 3.1.1. Capacité à détecter des changements de potentiel

Les protéines fluorescentes sensibles au potentiel (ou GEVIs pour *genetically encoded voltage indicators*) ont été élaborées et conçues ces vingt dernières années et ne cessent d'évoluer depuis. Initialement, la stratégie de conception des GEVIs s'est basée sur la fusion de FP(s) à tout ou partie d'un canal ionique voltage-dépendant (pour revue, voir Baker et al. 2008). En particulier, la région d'intérêt de ces protéines est le domaine sensible au potentiel (VSD) composé de 4 domaines transmembranaires (S1-S4) et dont le segment S4 est porteur de résidus chargés positivement capables de se déplacer à l'intérieur de la membrane sous l'influence du champ électrique. Ainsi, lors de changements de potentiel membranaire, le déplacement des résidus chargés du VSD entraîne le réarrangement structural de la protéine de fusion à l'origine de la variation de fluorescence émise par le(s) chromophore(s).

Deux limitations principales ont cependant émergé de l'utilisation des GEVIs basés sur les canaux ioniques voltage-dépendants : 1) la non-fonctionnalité potentielle du VSD dans la membrane plasmique sans le support structural de l'ensemble de la protéine membranaire et 2) l'influence de la polymérisation obligatoire des canaux ioniques sur le trafic à la membrane des VSD (pour revue, voir Mutoh et al. 2012). Ces problèmes ont été résolus avec la découverte de la *Ci-VSP*, phosphatase sensible au potentiel, clonée à partir de l'organisme marin *Ciona intestinalis* (Murata et al. 2005). La *Ci-VSP* est composée d'une enzyme cytosolique dotée d'une activité phosphatase et d'un VSD constitué de 4 segments transmembranaires (S1-S4). Puisque la *Ci-VSP* agit en configuration monomérique et que la portion non sensible au potentiel est cytosolique, le VSD de la *Ci-VSP* est devenu une alternative prometteuse pour le développement des GEVIs (pour revue, voir Perron et al. 2009). Plus récemment, les GEVIs basés sur la rhodopsine microbienne ont été développés.

### 3.1.2. Localisation à la membrane plasmique

Pour être capable de rapporter des changements de potentiel de la membrane plasmique, les GEVIs doivent être insérés dans cette membrane, dans les cellules dans lesquelles ils sont exprimés. Pour cela, ils empruntent la voie intracellulaire de trafic des protéines membranaires (pour revue, voir Lippincott-Schwartz et al. 2000). Les protéines sécrétoires (futurs protéines membranaires) sont synthétisées et assemblées dans le réticulum endoplasmique puis sont exportées vers l'appareil de Golgi où elles continuent leur maturation. Finalement, elles deviennent matures dans des vésicules bourgeonnant du Golgi et sont transloquées à la membrane plasmique via le réseau de microtubules. Parfois, les protéines mal repliées peuvent se retrouver piégées dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi où elles forment des agrégats. En contribuant à la fluorescence de fond non sensible au potentiel, ces agrégats peuvent atténuer le rapport signal/bruit lors de l'enregistrement des signaux voltage-dépendants (Baker et al. 2007). L'ajout du motif d'exportation « ER » et du peptide

signal de trafic membranaire du canal  $K_{ir}2.1$  rectifieur entrant (« TS ») à l'extrémité C-terminale des GEVIs est l'une des alternatives utilisée pour réduire les agrégats intracellulaires et ainsi augmenter l'insertion des protéines à la membrane plasmique des cellules de mammifère (Gradinaru et al. 2008, 2010).

A l'inverse, la surexpression du GEVI dans la membrane plasmique peut avoir des effets néfastes sur les propriétés de la membrane et donc sur les processus physiologiques qui découlent de son activité électrique. C'est la raison pour laquelle, lors du développement de nouveaux indicateurs, les concepteurs s'assurent du maintien des propriétés passives de la membrane et de sa capacité à générer des PA.

### 3.1.3. Rendement

Le rendement est un paramètre important qui détermine la performance des GEVIs notamment parce que 1) il contribue à améliorer le rapport signal/bruit, 2) il permet de réaliser des enregistrements sur des préparations épaisses et 3) il favorise la possibilité de répétition des mesures sur un même échantillon afin de pouvoir moyenniser les réponses (pour revue, voir Kannan et al. 2019).

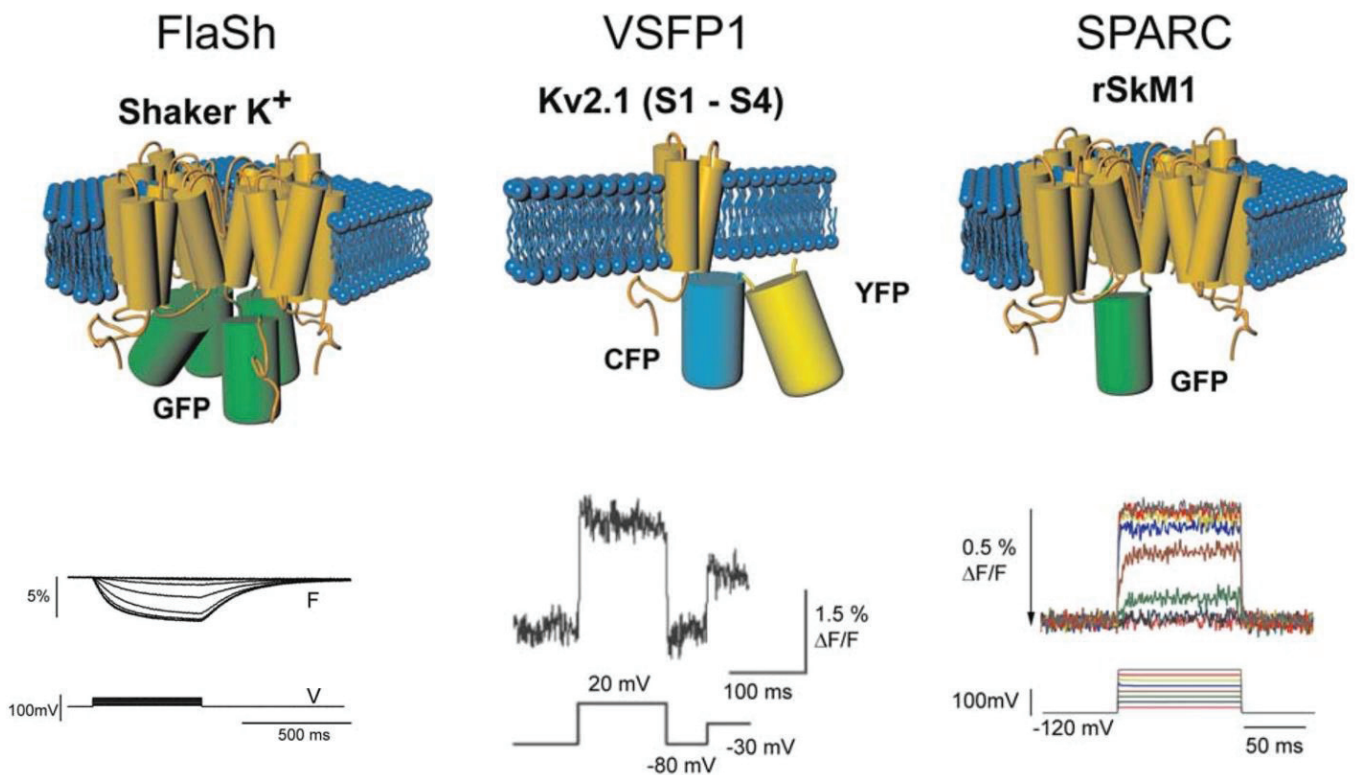
La stratégie la plus largement utilisée à l'heure actuelle afin d'augmenter le rendement d'un GEVI donné est d'introduire une ou plusieurs mutation(s) dans la séquence codant pour :

- le chromophore (ex : mutation A227D de la pHluorine ; Jin et al. 2012),
- le VSD (ex : mutation R415Q du S4; Chamberland et al. 2017),
- le linker entre le VSD et le donneur de fluorescence (ex : mutations A147S  $\Delta$ A148 du *linker* situé entre le S3 du VSD et la protéine fluorescente; Yang et al. 2016).

### 3.1.4. Rapport signal/bruit

Un rapport signal/bruit important permet de 1) détecter clairement des variations subtiles de fluorescence et 2) éviter le recours à la répétition des enregistrements pour obtenir un signal moyenné approprié à l'analyse et à l'interprétation.

L'augmentation du rapport signal/bruit dépend des propriétés intrinsèques du GEVI et sera d'autant plus important que la brillance, le rendement quantique et la photostabilité du chromophore seront élevés. Des facteurs extrinsèques au GEVI interviennent également dans l'enregistrement d'un signal à haut rapport signal/bruit, c'est le cas de son niveau d'expression et de son trafic à la membrane évoqués précédemment. De plus, la qualité de l'instrumentation optique choisie est également à prendre en compte pour l'obtention d'enregistrements de qualité (pour revue, voir Kannan et al. 2019).



**Figure 38. Les biosenseurs fluorescents voltage-dépendants (VD) basés sur les canaux ioniques VD**

**FlaSh** (panneau de gauche) est composé de la portion C-terminale du canal potassique Shaker de la drosophile (cylindres dorés) et de la GFP (cylindre vert). La combinaison des techniques de potentiel-imposé et de la microscopie à fluorescence dans l'ovocyte de Xénope permet d'enregistrer les changements de fluorescence de la protéine membranaire FlaSh (tracés du haut, F) en réponse aux changements de potentiel-imposé à la membrane de l'ovocyte (tracés du bas, V). La fluorescence (F) de la protéine diminue en réponse aux dépolarisations membranaires de manière réversible.

**VSFP1** (panneau du milieu) est composé du VSD isolé du canal potassique Kv2.1 (cylindres dorés) et du couple de fluorescence CFP (cylindre bleu) – YFP (cylindre jaune). Les enregistrements du bas ont été obtenus sur des cellules HEK et montrent que la protéine VSFP1 répond aux dépolarisations membranaires par une augmentation réversible du signal de FRET ( $\Delta R/R_0$ ).

**SPARC** (panneau de droite) est composé du canal sodique rSkM1 de rat (cylindres dorés) et de la GFP (cylindre vert) introduite entre les domaines I et II du tétramère. Les enregistrements du bas ont été obtenus sur ovocytes de Xénope et montrent que la protéine SPARC répond aux dépolarisations membranaires par une augmentation réversible de sa fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ).

D'après Baker et al. (2008)

### 3.1.5. Cinétiques de réponse

Des cinétiques de réponse ( $\tau_{on}$  et  $\tau_{off}$ ) rapides confèrent aux GEVIs la capacité de détecter des événements aussi rapides que les PA. Elles représentent donc une propriété importante dans de nombreuses conditions expérimentales, notamment dans le domaine des neurosciences.

La très grande majorité des GEVIs est conçue à partir d'un VSD. Les études structurales montrent que l'activation voltage-dépendante du VSD entraîne une mobilisation des charges positives du S4 à l'origine de son glissement ( $\sim 5 \text{ \AA}$ ) vers le feuillet externe de la membrane et de sa rotation d'environ  $60^\circ$  (Li et al. 2014) (voir aussi, *section II.1.2.1. Le récepteur aux dihydropyridines (DHPR)*). Ce sont ces changements conformationnels qui sont présumés imprégner les chromophores et moduler la fluorescence qu'ils émettent. En effet, il existe une forte similarité entre la dépendance au potentiel des variations de fluorescence de la protéine et la courbe d'activation des mouvements de charge du VSD (Lundby et al. 2008).

En revanche, en ce qui concerne les GEVIs basés sur la rhodopsine, leur sensibilité au potentiel ne dépend pas des mouvements de la protéine mais plutôt des changements dans l'état de protonation du chromophore rétinale (pour revue, voir St-Pierre et al. 2015).

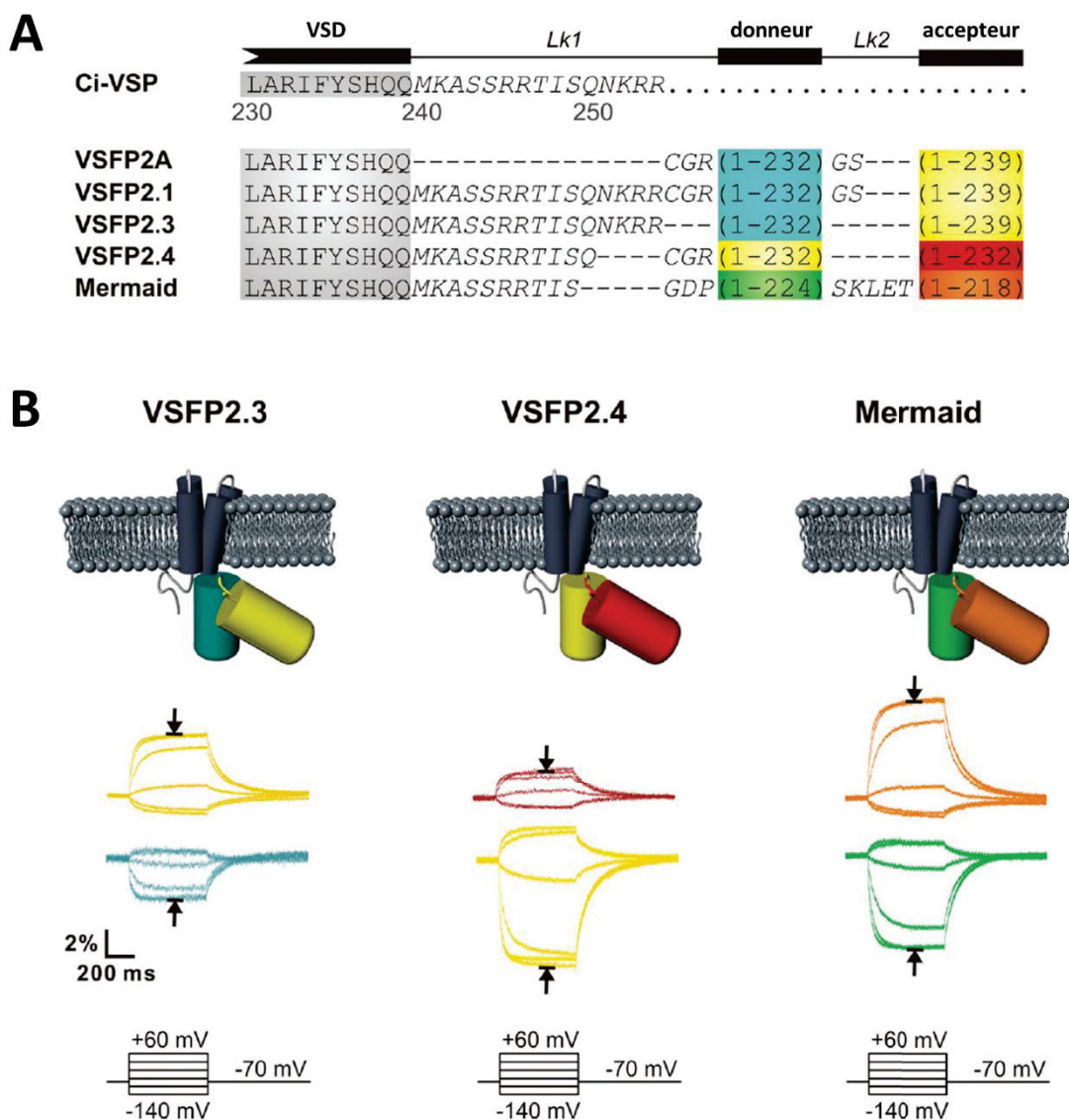
### 3.1.6. Sensibilité (ou dépendance) au potentiel

L'activité électrique de la membrane plasmique des cellules de mammifère évoluant d'un potentiel hyperpolarisé d'environ  $-100 \text{ mV}$  à un potentiel dépolarisé d'environ  $+40 \text{ mV}$ , il est important qu'un GEVI 1) donne accès à la mesure absolue des variations de potentiel membranaire et 2) puisse fonctionner dans une gamme de potentiels appropriée. Mais encore une fois, la gamme de sensibilité au potentiel d'un GEVI donné est une propriété à prendre en compte et à adapter en fonction du contexte expérimental. A l'instar de leurs cinétiques de réponse, les propriétés de dépendance au potentiel des GEVIs sont déterminées par les propriétés du VSD. Si nécessaire, il est possible de modifier la dépendance au potentiel du GEVI en introduisant des mutations dans le VSD (voir par exemple Dimitrov et al. 2007 ; Tsutsui et al. 2008, 2014).

## 3.2. Les différents types de GEVIs

### 3.2.1. Les GEVIs basés sur les canaux ioniques voltage-dépendants

La première génération de GEVIs a été conçue par fusion d'une ou deux FP(s) au VSD d'un canal ionique voltage-dépendant. Trois prototypes ont été développés par trois laboratoires différents (Figure 38). **FlaSH** (pour *fluorescent shaker*) est le premier GEVI à avoir été généré par fusion de la GFP à l'extrémité C-terminale du canal  $K^+$  voltage-dépendant de la drosophile (Siegel et Isacoff 1997). La protéine **VSFP1** (pour *voltage sensitive fluorescent protein*) a été conçue quelques années plus tard par fusion du VSD du canal  $K^+$  voltage-dépendant  $K_v2.1$  à un couple de FRET (Sakai et al. 2001) ou à une cpFP (Knöpfel et



**Figure 39. Les biosenseurs fluorescents voltage-dépendants basés sur la *Ci-VSP***

- A. Alignement des séquences d'acides aminés des variants de la protéine VSFP2.1.** Les résidus C-terminaux du VSD et le domaine en aval du VSD de la *Ci-VSP* sont indiqués, respectivement, en gris et en lettres italiques. Les protéines fluorescentes sont la mCerulean (en bleu), la Citrine/mCitrine (en jaune), la mKate2 (en rouge), mUKG (en vert) et mKOok (en orange).
- B.** Les variations de fluorescence de l'accepteur (tracés du haut) et du donneur (tracés du bas) ont été enregistrées sur des cellules PC12, maintenues à un potentiel de repos de -70 mV, en réponse à des hyperpolarisations et des dépolarisations membranaires d'amplitude croissante (entre -140 mV et +60 mV) et d'une durée de 500 ms. Les flèches indiquent les signaux enregistrés lors de la dépolarisation à +60 mV.

D'après Perron et al. (2009)



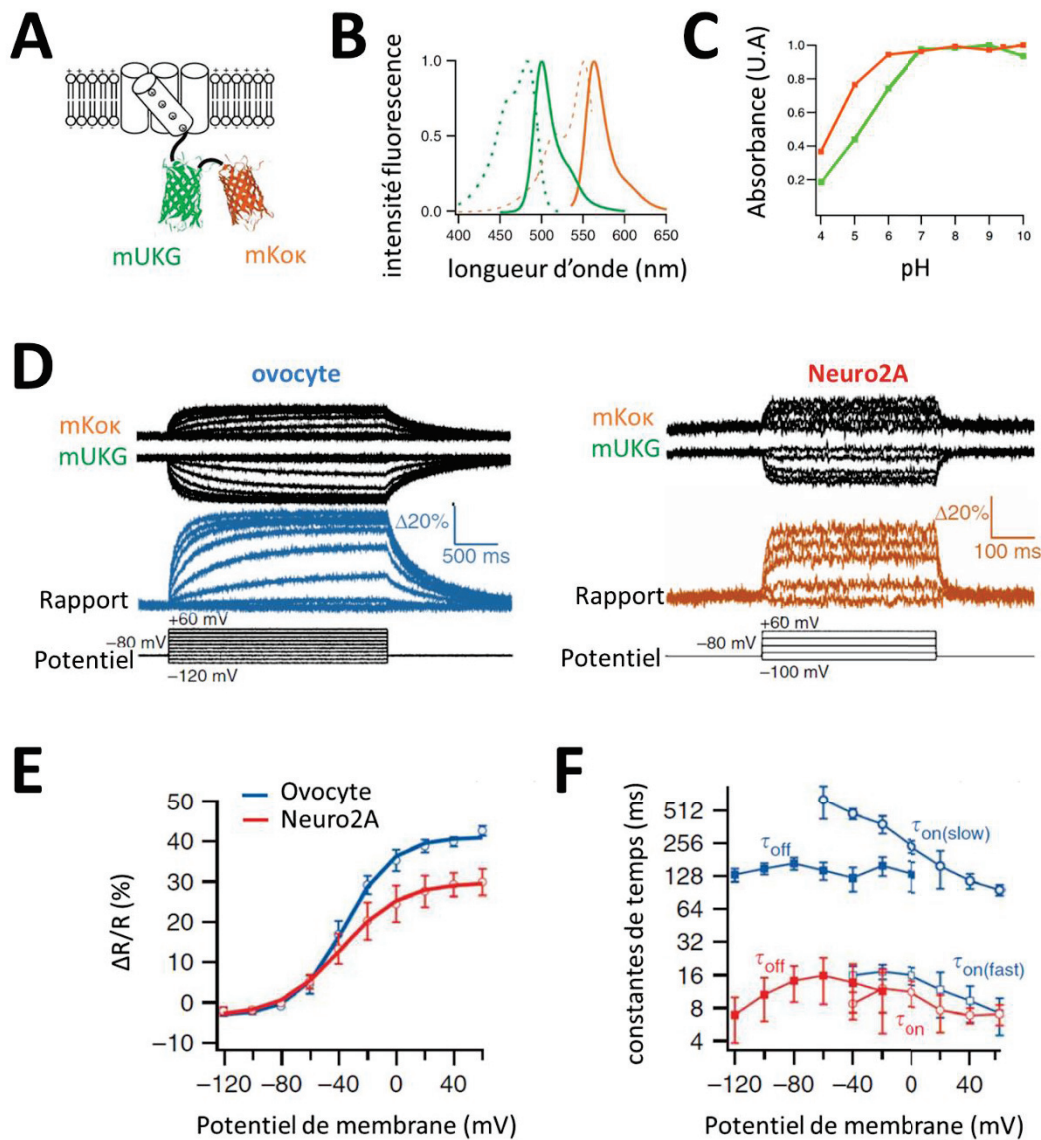
al. 2003). Le troisième prototype est **SPARC** (pour *sodium channel protein based activity reporting construct*), il est composé d'une seule FP, la GFP, qui est insérée entre les domaines I et II du canal tétramérique Na<sup>+</sup> voltage-dépendant du muscle squelettique de rat (Ataka et Pieribone 2002). Chacun de ces trois prototypes a constitué une preuve de principe très encourageante. En revanche, leur application s'est rapidement retrouvée limitée en raison de leur faible rendement ( $\Delta F_{\max}/F_0 < 5\%$  pour  $\Delta V=100$  mV), de leurs cinétiques lentes (10-200 ms) et de leur faible insertion dans la membrane (pour revue, voir Baker et al. 2008). Leur trafic à la membrane étant seulement partiel, ils s'accumulent dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de golgi (Sakai et al. 2001; Baker et al. 2007).

### 3.2.2. Les GEVIs basés sur la Ci-VSP

- **Les variants de type VSFP2.1**

La protéine **VSFP2.1** est composée du VSD de la Ci-VSP fusionné à un couple de FRET. Dans le segment S4 du Ci-VSD, une arginine, résidu chargé positivement, est remplacée par une glutamine, résidu neutre, en position 217 (R217Q) (Dimitrov et al. 2007). Cette neutralisation de charge dans le VSD induit un décalage de la sensibilité de la protéine vers des potentiels plus négatifs ( $V_{0.5}$  décalé vers la gauche).

Les variants **VSFP2.3** et **VSFP2.4** sont nés de l'optimisation de la longueur des *linkers* entre le VSD et le donneur de fluorescence et/ou entre les deux partenaires du couple de FRET (Figure 39). Cette mise au point a permis d'améliorer l'efficacité du mécanisme de FRET mais pas les cinétiques de réponse (Mutoh et al. 2009; Akemann et al. 2010). Cette lenteur est due à la faiblesse de couplage entre le VSD (mouvement de charges,  $\sim 1$  ms) et la réponse fluorescente (100 ms) (Lundby et al. 2008). Plus particulièrement, le ralentissement de la réponse de ces biosenseurs est dû au mécanisme de FRET. En effet, la diminution de la taille du *linker* entre le VSD et le donneur de fluorescence (CFP) induit une accélération de la réponse de la CFP ( $\tau_{on} \sim 7$  ms) mais pas de celle de l'accepteur (YFP,  $\tau_{on} \sim 171$  ms). De plus, la photodestruction (*photobleaching*) complète de la YFP entraîne – non seulement l'augmentation de la fluorescence de base de la CFP et l'abolition du FRET, mais également – l'augmentation de la vitesse ( $\tau_{on} \sim 5$  ms) et de l'amplitude de réponse de la CFP à des variations de potentiel membranaire (Lundby et al. 2008). Ces résultats ont mené à la construction du variant **VSFP3.1** dans lequel la YFP est absente. VSFP3.1 présente effectivement des cinétiques de réponse très rapides ; cependant, l'absence de la YFP induit une diminution de l'amplitude de réponse par rapport aux protéines VSFP2.3 et VSFP2.4 (Villalba-Galea et al. 2009).



**Figure 40. Propriétés du biosenseur-FRET voltage-dépendant Mermaid**

- La protéine transmembranaire Mermaid est composée du couple de protéines fluorescentes mUKG (donneur) et mKOk(accepteur) et position C-terminale du VSD de la *Ci-VSP*.
- Spectres d'excitation (pointillés) et d'émission (traits pleins) de mUKG (en vert) et mKOk.(en orange).
- pH-dépendance de l'absorption de lumière des protéines purifiées mUKG (en vert) et mKOk (en orange) exprimées seules dans des cellules Hela.
- Variations de l'intensité de fluorescence émise par mKOk et mUKG (tracés noirs) et du rapport de fluorescence ( $R=F_{mKOk}/F_{mUKG}$ ) en réponse aux changements de potentiel membranaire imposés à des ovocytes de Xénope (à gauche, ratio en bleu) et à des cellules Neuro2A (à droite, ratio en pourpre) maintenues à un potentiel de repos de -80 mV.
- Variations du rapport de fluorescence ( $\Delta R/R$ ) en fonction du potentiel de la protéine Mermaid exprimée dans l'ovocyte de Xénope (en bleu) ou dans les cellules Neuro2A (en pourpre). Les courbes représentent l'ajustement des données avec une fonction de Boltzmann.
- Dépendance au potentiel des constantes de temps d'activation rapide ( $\tau_{on}$  (fast)) et lente ( $\tau_{on}$  (slow)) et de déclin ( $\tau_{off}$ ) de la réponse de la protéine Mermaid exprimée dans les ovocytes de Xénope (tracés bleus) ou dans les cellules Neuro2A (tracés pourpres).

Modifié d'après Tsutsui et al.(2008)

- **Les variants de type Mermaid**

Idéalement, le mécanisme de FRET devrait être robuste en regard des facteurs environnementaux. Cependant, les sensibilités intrinsèques des FPs dérivées de la GFP (CFP et YFP) génèrent des signaux non-désirés qui se révèlent problématiques lors de variations subtiles de FRET. Afin de concevoir des GEVIs à moindre sensibilité au pH, Tsutsui et al. (2008) ont dérivé deux protéines fluorescentes de coraux collectés dans la mer d'Okinawa. Les deux protéines monomériques fluorescentes ont été clonées et des mutations ciblées ont été introduites dans leur séquence afin d'augmenter leur brillance :

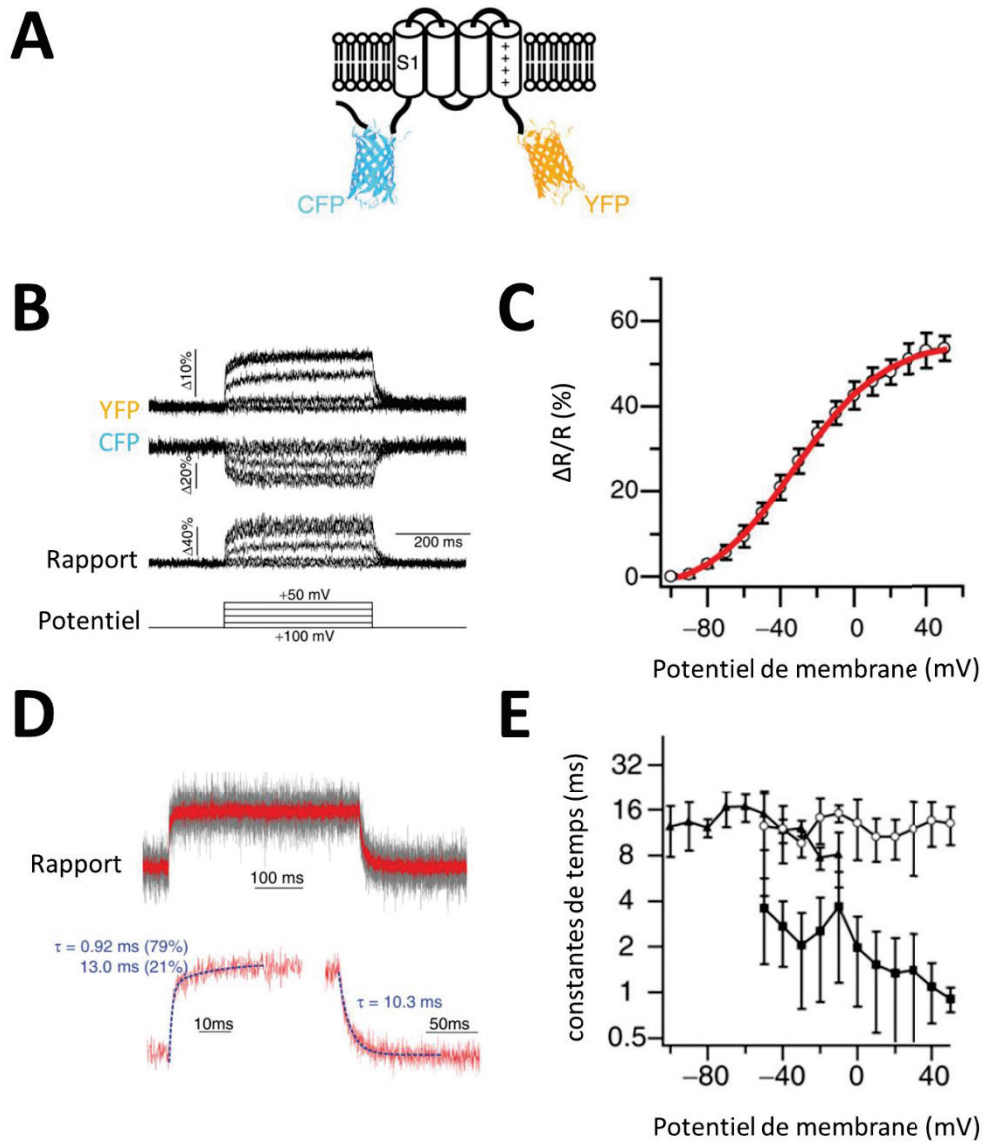
- *monomeric Umi-Kinoko* (mUKG) émet dans le vert avec un pic d'absorption à 483 nm, un pic d'émission à 499 nm et un pKa = 5.2 (Figure 40 A-C),

- *monomeric Kusabira Orange* (mKOK) émet dans l'orange avec un pic d'absorption à 551 nm, un pic d'émission à 563 nm et un pKa = 4.2 (Figure 40 A-C).

Les FPs mUKG et mKOK apparaissent donc comme un couple idéal pour l'efficacité du FRET (distance de Förster = 5.5 nm), relativement résistants aux variations de pH et aux propriétés de photostabilité comparables à celles des protéines connues. La fusion de ce couple de fluorescence mUKG-mKOK à l'extrémité C-terminale de la *Ci-VSP* donne naissance au GEVI nommé **Mermaid**. A l'instar des données obtenues sur la protéine VSFP2.1, les auteurs ont introduit la mutation R217Q dans le S4 du VSD dans le but de décaler la sensibilité de la protéine Mermaid ( $V_{1/2} = +75$  mV) vers des potentiels plus négatifs et donc davantage physiologiques.

Les propriétés de dépendance au potentiel de la protéine Mermaid ont été étudiées dans deux systèmes d'expression : l'ovocyte de Xénope à 19°C et la cellule de neuroblastome de souris (lignée Neuro2A) à 33°C (Tsutsui et al. 2008). Lorsqu'elle est exprimée dans l'ovocyte de Xénope, Mermaid répond à une large gamme de potentiel (avec un potentiel de demi-activation,  $V_{0.5} = -35.8$  mV) avec une variation maximale du rapport de FRET de l'ordre de 40 % (pour une  $\Delta V = +100$  mV) (Figure 40 E). L'activation de la protéine (« on ») est dépendante du potentiel. Pour des valeurs de dépolarisation supérieures à -40 mV, une composante rapide ( $\tau_{on (fast)} = 7.3-17.4$  ms) suivie d'une composante plus lente ( $\tau_{on (slow)} = 98-638$  ms) apparaissent et sont d'autant plus rapides que l'amplitude de la dépolarisation augmente. Lors de la repolarisation membranaire, le signal décroît avec un  $\tau_{off}$  de l'ordre de 130 ms (Figure 40 F). Les cinétiques de la réponse de Mermaid sont plus rapides lorsque les expérimentations sont menées dans des conditions de température plus élevées (physiologiques) sur les cellules Neuro2A (Figure 40 F).

En 2014, Tsutsui et al. identifient le variant **Mermaid**<sup>D129E</sup>, dans lequel la mutation D129E touche le S1 du VSD, qui possède une sensibilité décalée vers des potentiels plus positifs ( $V_{0.5} = +20$  mV).



**Figure 41. Propriétés du biosenseur-FRET voltage-dépendant Mermaid2**

- A.** La protéine transmembranaire Mermaid2 est composée du couple de protéines fluorescentes CFP (donneur) et YFP (accepteur) en positions N- et C-terminale du VSD de la *Ci*-VSP.
- B.** Variations de l'intensité de fluorescence émise par la CFP et la YFP (tracés noirs) et du rapport de fluorescence ( $R = F_{YFP}/F_{CFP}$ ) en réponse aux changements de potentiel membranaire imposés à des cellules HEK (à gauche, rapport en bleu) maintenues à un potentiel de repos de -80 mV.
- C.** Variations du rapport de fluorescence ( $\Delta R/R$ ) en fonction du potentiel de la protéine Mermaid2 exprimée dans les cellules HEK293. La courbe rouge représente l'ajustement des points avec une fonction de Boltzmann.
- D.** Rapports de fluorescence enregistrés sur 5 cellules HEK en réponse à une dépolarisation de +50 mV. La moyenne est représentée en rouge. Les constantes de temps d'activation rapide ( $\tau_{on(fast)} = 0.92$  ms) et lente ( $\tau_{on(slow)} = 13.0$  ms) sont calculées via l'ajustement d'une double fonction exponentielle croissante (pointillés, phase de montée) et le déclin ( $\tau_{off} = 10.3$  ms) à l'aide d'une exponentielle simple décroissante (pointillés, phase de décroissance).
- E.** Dépendance au potentiel des constantes de temps d'activation rapide (carrés plein) et lente (cercles vides) et d'inactivation (triangles pleins) de la protéine Mermaid2 exprimée dans les cellules HEK.

D'après Tsutsui et al. (2013b)

De manière intéressante, la position du couple de FRET en N- ou C- terminale ne semble pas avoir d'effet sur la sensibilité au potentiel de la protéine. En effet, le variant **Reverse-Mermaid** – qui possède les deux partenaires du couple de FRET en position N-terminale du VSD – a les mêmes propriétés que la protéine native Mermaid (Tsutsui et al. 2013a). Ces propriétés sont à tel point semblables que la mutation R217Q du VSD induit le même décalage de la sensibilité des protéines Mermaid et Reverse-Mermaid vers des potentiels plus négatifs.

Toujours dans le but d'augmenter les performances de leurs GEVIs, Tsutsui al. (2013b) proposent un autre variant, **Mermaid 2**, dans lequel la CFP et la YFP sont situées respectivement en positions N- et C-terminales du VSD de la *Ci*-VSP (Figure 41 A). Lorsqu'elle est exprimée dans les cellules HEK293, la protéine Mermaid2 répond à une large gamme de potentiel (avec un potentiel de demi-activation,  $V_{0.5} = -32\text{mV}$ ) avec une variation maximale de fluorescence de l'ordre de 48.5 % (pour  $\Delta V = 100\text{ mV}$ ) (Figure 41 B, C). Les composantes rapide ( $\tau_{\text{on (fast)}} = 0.93\text{ ms}$ ) et lente ( $\tau_{\text{on (slow)}} = 10.3\text{ ms}$ ) de changement du signal de Mermaid2 en réponse à une dépolarisation sont beaucoup plus rapides que celles de la protéine native Mermaid. Lors de la repolarisation membranaire, la constante de temps de retour un  $\tau_{\text{off}}$  de est de l'ordre de 10 ms (Figure 41 D, E).

**L'ensemble de ces données font des protéines Mermaid un outil très intéressant pour l'étude de l'activité des membranes biologiques. J'ai eu la chance de les utiliser au cours de ma thèse.**

- **Les variants de type ArcLight**

Afin de tester l'effet de l'utilisation d'autres FPs, Jin et al. (2012) ont remplacé le couple de FRET de la protéine Mermaid (mUKG/mKOκ) par la pHluorine écliptique (Miesenböck et al. 1998) ou par la pHluorine super-écliptique (Sankaranarayanan et al. 2000). Ces deux protéines fluorescentes ont été initialement conçues pour la détection de variations de pH intracellulaire par introduction de mutations dans la séquence codante pour la GFP. A l'instar de la majorité des GEVIs basés sur une seule FP, le GEVI contenant la pHluorine écliptique ou super-écliptique montre une sensibilité au potentiel limitée ( $\sim 1.3\%$ ). En revanche, les GEVIs de type **ArcLight**, conçus à partir de la fusion du *Ci*-VSD à l'une ou l'autre de ces deux protéines fluorescentes mutées en position 227 (A227D), présentent une sensibilité au potentiel fortement augmentée (14 fois pour la pHluorine écliptique<sup>A227D</sup> avec  $\Delta F_{\text{max}}/F_0 \sim 18\%$  ; 27 fois pour la pHluorine super-écliptique<sup>A227D</sup> avec  $\Delta F_{\text{max}}/F_0 \sim 35\%$ ). En revanche, cette mutation n'a pas d'effet sur les GEVIs basés sur la GFP sauvage (Jin et al. 2012). Le mécanisme par lequel la mutation A227D améliore la sensibilité au potentiel n'est pas connu. Il a été tout de même suggéré que le potentiel aurait un effet sur la fluorescence en altérant la capacité de la pHluorine à

s'associer à la membrane ou en empêchant la dimérisation entre chromophores de différentes molécules ArcLight (Jin et al. 2012).

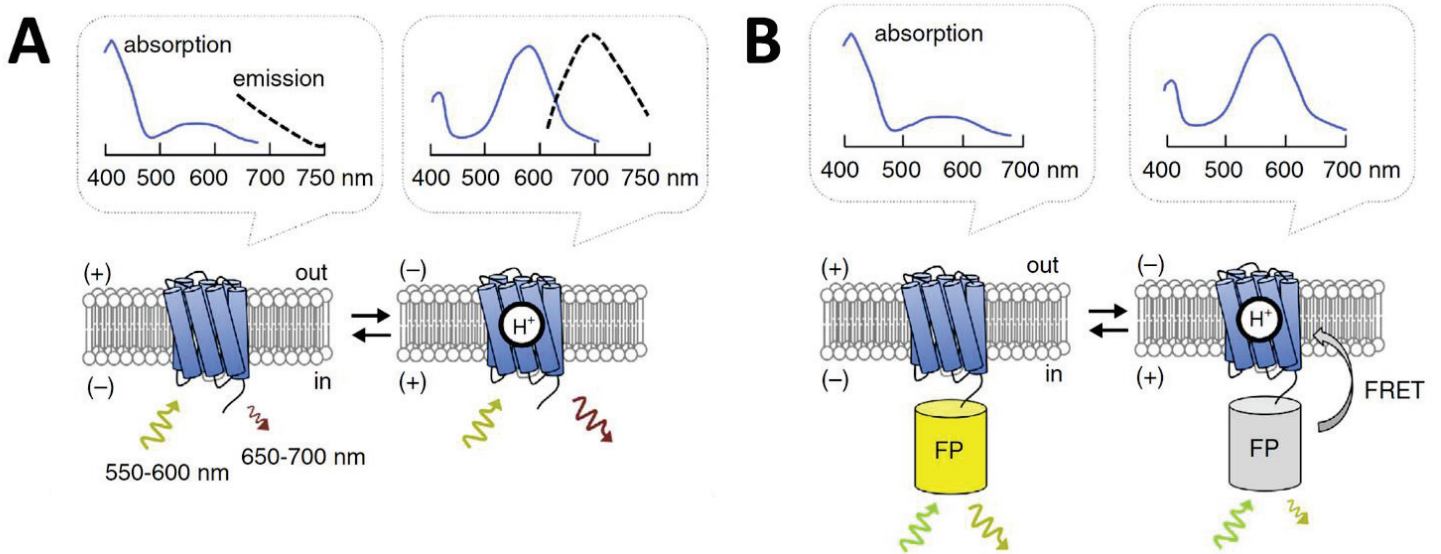
- **Les variants de type ASAP**

Les cpFPs ont également été suggérées comme moyen de coupler directement les changements conformationnels du VSD à la fluorescence et ainsi d'augmenter la vitesse de réponse potentiel-dépendante. Cependant, les premiers GEVIs de ce type couplant une cpFP à l'extrémité C-terminale du *Ci*-VSD présentaient de faibles rendements vis-à-vis des changements de potentiel. Par exemple, les GEVIs basés sur la cpGFP sont rapides (<2 ms) mais produisent une réponse maximale de faible amplitude (< 2%) (Barnett et al. 2012). Pire encore, les GEVIs basés sur la cpRFP sont à la fois lents et peu sensibles (Gautam et al. 2009). L'alternative a été de concevoir un GEVI nommé **ASAP1** (*pour accelerated sensor of action potentials 1*) dans lequel la cpGFP est insérée au niveau de la boucle extracellulaire S3-S4 du VSD de la VSP de poulet (St-Pierre et al. 2014). ASAP1 présente un meilleur rendement (18-29%) sur une très large gamme de potentiel (de -120 mV à +40 mV) et des cinétiques très rapides en réponse un créneau de changement de polarisation ( $\tau_{on} \sim 2$  ms) et à la rupture de ce créneau ( $\tau_{off} \sim 2$  ms). Cependant les mécanismes impliqués dans cette amélioration de la réponse fluorescente due à la position de la cpGFP sont inconnues. Il a tout de même été suggéré que les changements conformationnels dans la boucle S3-S4 induits par les changements de potentiel auraient un impact sur l'état de protonation du chromophore à l'origine de variation de ses propriétés d'absorption (pour revue, voir St-Pierre et al. 2015).

**ASAP2f** (*pour fast*) contient une substitution et une délétion impliquant deux acides aminés (A147S  $\Delta$ A148) dans le *linker* situé entre le S3 du VSD et la cpGFP d'ASAP1. Ce variant ASAP2f présente un rendement vis-à-vis des changements de potentiel fortement amélioré ( $\Delta F_{max}/F_0 \sim 45$  %) mais des cinétiques semblables à celles de la protéine d'origine ASAP1 (Yang et al. 2016). Le variant **ASAP2s** (*pour slow*) contient la mutation R415Q dans le S4 du VSD. Cette protéine a un meilleur rendement augmenté ( $\Delta F_{max}/F_0 = 38.7$  %) mais des cinétiques d'activation ( $\tau_{on} = 5.2$  ms) et d'inactivation ( $\tau_{off} = 24$  ms) ralenties par rapport à la protéine d'origine ASAP1 (pour revue, voir Chamberland et al. 2017).

### 3.2.3. Les GEVIs basés sur la rhodopsine microbienne

La rhodopsine microbienne est une protéine photosensible composée de 7 segments transmembranaires. De par son activité de pompe à protons photosensible, la rhodopsine est classiquement utilisée pour le contrôle optogénétique du potentiel de membrane. Mais cette protéine peut également être utilisée comme GEVI. En effet, lorsqu'il est protoné, le chromophore rétinol contenu dans la rhodopsine fluoresce légèrement à des longueurs d'onde proches de l'infrarouge. Ainsi, lors de changements de potentiel membranaire, le potentiel électrochimique des protons varie



**Figure 42. Les biosenseurs fluorescents voltage-dépendants basés sur la rhodopsine microbienne**

- A.** Représentation schématique d'un GEVI basé sur la rhodopsine. La dépolarisation membranaire favorise la protonation de la rhodopsine qui entraîne l'augmentation de l'absorption à 600 nm et l'augmentation de la fluorescence émise entre 650 nm et 700 nm.
- B.** Représentation schématique d'un GEVI basé sur la fusion entre la rhodopsine et une protéine fluorescente émettant à 600 nm. Au cours de la dépolarisation membranaire, la superposition entre le spectre d'émission de la protéine fluorescente et le spectre d'absorption de la rhodopsine entraîne une augmentation du FRET et un quenching de la fluorescence émise par la protéine fluorescente.

D'après St-Pierre et al. (2015)

localement et régule l'état de protonation du chromophore de la rhodopsine se traduisant par des variations de la fluorescence qu'il émet (pour revue, voir St-Pierre et al. 2015) (Figure 42 A). Le premier GEVI basé sur la rhodopsine a été conçu par Kralj et al. (2011a) et se nomme PROPS (*proteorhodopsin optical proton sensor*), variant muté de la protéorhodopsine qui absorbe dans le vert. Quand il est exprimé chez *Escherichia coli*, PROPS révèle que la bactérie génère des potentiels d'action spontanés (Kralj et al. 2011a). Cependant, PROPS n'a pas pu être utilisé comme GEVI chez le mammifère car il ne parvient pas à s'insérer dans la membrane plasmique des cellules eucaryotes.

En revanche, **Arch** (*archaéorhodopsin 3*) isolée de la bactérie *Halorubrum sodomense* est une pompe à protons photosensible qui s'exprime et s'insère dans la membrane des cellules de mammifère (Chow et al. 2010). Cette protéine est capable de détecter des PA dans les neurones *in vitro* (Kralj et al. 2011b) car elle présente des cinétiques de réponse de l'ordre de la ms et un bon rendement ( $\Delta F_{\max}/F_0 = \sim 35\%$ ). Avec la mutation D95N, Arch est capable de détecter le potentiel et perd son activité de pompe à protons photosensible (Chow et al. 2010). De plus, la mutagenèse dirigée a permis d'obtenir des variants (Archers et QuasArs) présentant une brillance, des cinétiques et une sensibilité améliorée par rapport à la protéine Arch d'origine. Dans le but d'améliorer encore la résolution spatiotemporelle des variations de potentiel membranaire *in vivo*, les variants d'Arch ont été couplés à une FP pour induire un mécanisme de FRET où la rhodopsine jouerait le rôle d'accepteur de fluorescence (ex : QuasAr2-mOrange2, QuasAr2-Citrine, MacQ-mCitrine) (pour revues, voir St-Pierre et al. 2015; Xu et al. 2017) (Figure 42 B).

### 3.3. Applications

Initialement, les GEVIs ont été conçus dans l'objectif de visualiser directement l'activité dynamique des circuits neuronaux. Le perfectionnement des caractéristiques des GEVIs permet l'étude *in vivo* de l'activité électrique de neurones dans de nombreux organismes modèles : la mouche (Cao et al. 2013), le ver (Flytzanis et al. 2014), le poisson-zèbre (Kibat et al. 2016) et la souris (Akemann et al. 2012). De plus, il est aujourd'hui possible, grâce à certains GEVIs, d'accéder directement à l'activité synaptique de larges populations définies de neurones dans la souris vivante (Akemann et al. 2013). Cette fonctionnalité est cruciale dans le domaine des neurosciences car elle représente l'unique opportunité de pouvoir disséquer les éléments du réseau qui gouvernent la coordination de l'activité des neurones dans différentes fonctions cérébrales comme l'intégration sensori-motrice, la perception, la cognition ou la mémoire.

Les nombreux avantages présentés par les GEVIs pourrait étendre leur champ d'application à l'étude de l'activité membranaire de nombreux autres tissus tel que le muscle cardiaque (Kaestner et Lipp 2011; Herron et al. 2012) ou squelettique voire d'autres compartiments membranaires tel que le réticulum endoplasmique.



# SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE

## SYNTHESE ET PROBLEMATIQUE

La cascade d'évènements permettant la contraction de la fibre musculaire striée squelettique en réponse à l'activité électrique de sa membrane plasmique est regroupée sous le terme de couplage excitation-contraction (EC). Le réticulum sarcoplasmique (RS) y joue un rôle crucial car il fournit le stock calcique intracellulaire nécessaire à la contraction.

Le couplage EC a lieu au niveau des triades, domaines nanoscopiques au niveau desquels les invaginations transversales de la membrane plasmique (tubules-T) sont en contact étroit avec deux citernes terminales adjacentes de RS. Lors de l'excitation nerveuse d'une fibre musculaire, la dépolarisation (potentiel d'action) se propage dans toute la surface de la membrane plasmique et en profondeur de la cellule via les tubules-T. Cette dépolarisation y est détectée par les récepteurs aux dihydropyridines (DHPRs ou  $Ca_v1.1s$ ) qui en retour, par couplage mécanique, déclenchent l'ouverture des canaux calciques du RS que sont les récepteurs de la ryanodine de type 1 (RYR1s). Ceci est à l'origine de l'augmentation massive de  $Ca^{2+}$  intracellulaire qui déclenche la contraction.

Les triades sont le lieu de la fibre musculaire où s'accumulent un grand nombre de protéines dites « triadiques ». Parmi elles, on retrouve  $Ca_v1.1$  et RYR1 mais également **la triadine** qui est une petite protéine (95 kDa) d'interaction avec le RYR1 et dont les 306 premiers résidus (**T306**) sont nécessaires et suffisants à son insertion dans les citernes terminales de RS (Rossi, et al. 2014b).

Le couplage EC implique donc des évènements électrochimiques au niveau des deux systèmes membranaires triadiques : le réseau tubulaire-T et les citernes terminales de RS. Les propriétés électriques et ioniques de la membrane tubulaire-T ainsi que son rôle dans l'activation du couplage EC sont aujourd'hui bien connues. En revanche, les propriétés électrochimiques de la membrane du RS sont encore ignorées en raison de son inaccessibilité électrique *in vivo*. Ainsi, de nombreuses informations essentielles sont manquantes quant aux mécanismes de contrôle, de régulation et de synchronisation de l'ouverture des canaux RYR1. En particulier, peu voire aucune donnée concluante n'est disponible en ce qui concerne l'activité unitaire des RYR1s et les flux ioniques qui y sont associés dans la fibre musculaire intacte. Or ces informations sont essentielles à la compréhension de la fonction musculaire squelettique normale et pathologique.

Grâce à l'avènement d'une large gamme de biosenseurs fluorescents et à la possibilité de les fusionner à une séquence d'adressage spécifique, on est aujourd'hui capable d'avoir accès *in vivo* à l'activité de compartiments subcellulaires avec des niveaux de résolution spatio-temporels de plus en plus importants.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté en l'adressage et la caractérisation de **biosenseurs fluorescents adressés à la membrane du RS de fibres musculaires différenciées**. Grâce à la combinaison de techniques d'électrophysiologie et d'imagerie sur fibres musculaires isolées, j'ai pu étudier l'activité du RS au cours de l'activation musculaire. Plus particulièrement, mon projet de Thèse aborde deux problèmes biologiques principaux : le potentiel de membrane du RS et la signalisation calcique du RS au cours du couplage EC.

Mon premier objectif a été de **caractériser les changements de potentiel de la membrane du réticulum sarcoplasmique pendant l'activité musculaire**. Pour cela, j'ai utilisé les protéines fluorescentes sensibles au potentiel (GEVIs) de type Mermaid composées 1) du domaine sensible au potentiel (VSD) de la *Ci-VSP* capable de s'insérer dans les membranes biologiques et 2) d'un couple de FRET composé d'un donneur (mUKG ou CFP) et d'un accepteur (mKOk ou YFP) de fluorescence (Tsutsui et al. 2008). La première étape a consisté en la caractérisation du variant de Mermaid le plus approprié à l'étude de l'activité électrique du RS. La seconde étape a été de fusionner le variant d'intérêt à T306, par biologie moléculaire, pour induire la rétention du biosenseur dans la membrane des citernes terminales du RS. La dernière étape a consisté en l'étude et la caractérisation des signaux émis par le biosenseur inséré dans la membrane du RS au cours de l'activation du couplage EC.

Mon deuxième objectif a été de **détecter les variations de concentration calcique à proximité immédiate des canaux  $Ca^{2+}$  RYR1**. Pour cela, j'ai utilisé les protéines fluorescentes sensibles au  $Ca^{2+}$  (GECIs) de type GCaMP6f (Chen et al. 2013b) composées 1) du domaine de liaison au  $Ca^{2+}$  de la calmoduline (CaM), 2) de la protéine fluorescente GFP, et 3) du domaine de liaison au complexe  $Ca^{2+}$ -CaM du peptide M13 (kinase de la chaîne légère de myosine). Dans un premier temps, j'ai pu construire par biologie moléculaire le plasmide codant pour la protéine de fusion T306-GCaMP6f et vérifier son insertion spécifique dans la membrane des citernes terminales de RS. Ensuite, la calibration de la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des construits GCaMP6f et T306-GCaMP6f a été effectuée. Enfin, différentes conditions expérimentales ont été testées dans le but de caractériser les propriétés des signaux triadiques.

# MATERIEL ET METHODES

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Constructions plasmidiques

Les séquences de Mermaid, de GCaMP6f et de leurs variants ont toutes été insérées dans le vecteur plasmidique modifié pCS2<sup>+</sup> pour une expression chez le rongeur (et en particulier chez la souris).

#### 1.1. La sonde Mermaid et ses variants

Les ADNc codant pour Mermaid, Reverse-Mermaid (Rv-Mermaid), Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> nous ont été gracieusement fournis par le laboratoire de Y. Okamura (Japon) et celui de la triadine par le laboratoire de V. Sorrentino (Italie). Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> et Mermaid2<sup>D129E</sup> sont respectivement des variants des biosenseurs Mermaid et Mermaid2 (Tsutsui et al. 2008; Tsutsui et al. 2013a; Tsutsui et al. 2013b) qui présentent – lorsqu'ils sont exprimés dans les œufs de Xénope – une valeur de  $V_{1/2}$  proche de +10mV (H. Tsutsui, communication personnelle).

##### 1.1.1. Mermaid

Dans l'ADNc codant pour Mermaid, les séquences d'ADNc codant pour le couple de protéines fluorescentes mUKG et mKOκ sont situées en 3' de la séquence du VSD.

##### 1.1.2. Reverse-Mermaid

Rv-Mermaid est un variant de Mermaid dans lequel les séquences correspondant au couple de FRET des protéines mUKG et mKOκ sont fusionnées à l'extrémité 5' de la séquence du VSD.

##### 1.1.3. Reverse-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>

*Cette construction plasmidique a été réalisée par J. Perrot, anciennement ingénieur d'étude dans l'équipe, sous la supervision de C. Berthier.* La séquence du VSD<sup>D129E/Y235R</sup> a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pCS2-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> en insérant les sites de restrictions EcoRI et XbaI en 5' et 3' de l'amplicon. Après purification (Isolate PCR®, Bionline), l'amplicon a subi une double restriction enzymatique EcoRI/XbaI. Le plasmide pCS2-Rv-Mermaid a subi la même restriction enzymatique pour exciser la séquence du VSD. Après purification et quantification, les produits de digestion ont été fusionnés par ligation (toute la nuit à 4°C) dans un mélange réactionnel de composé des ADNs vecteur et insert, de T4 ligase et de tampon de ligation (Promega). Afin d'augmenter les chances de ligation, trois conditions ont été testées selon trois ratios insert/vecteur (1:3, 1:1 et 3:1). La formule suivante: quantité d'insert (ng)=[quantité de vecteur (ng)/taille insert (kb) x ratio insert/vecteur] a permis de déterminer les volumes de vecteur et d'insert. Les produits de ligation ont été ensuite amplifiés,

purifiés, vérifiés par restriction enzymatique et enfin séquencés selon le protocole détaillé dans la *section 1.3. (Amplification et purification)*.

#### 1.1.4. T306-Reverse-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>

Pour induire la rétention du biosenseur Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> dans la membrane jonctionnelle du RS, la séquence correspondant aux 306 premiers acides aminés de la triadine (T306) a été fusionnée *in frame*, c'est-à-dire en conservant les cadres de lecture, à l'extrémité 3' de la séquence de Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. La séquence de T306 a été amplifiée par PCR en insérant les sites de restriction XbaI et SacII respectivement en 5' et 3' de l'amplicon. L'amplicon purifié a subi une double restriction enzymatique XbaI/SacII. Cette séquence a ensuite été insérée en 3' de la séquence de Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> grâce à ces sites de restriction et à une réaction de ligation utilisant le même mode opératoire que pour Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (*section 1.1.3.*).

#### 1.1.5. T306-Reverse-Mermaid

Pour induire la rétention du biosenseur Rv-Mermaid dans la membrane jonctionnelle du RS, la séquence T306 a également été fusionnée *in frame* à l'extrémité 3' de la séquence de Rv-Mermaid. Le plasmide pCS2-Rv-Mermaid a été linéarisé par simple restriction enzymatique XbaI. La séquence de T306 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pCS2-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> en insérant le site de restriction XbaI en 5' et 3' de l'amplicon. L'amplicon purifié a subi une restriction enzymatique avec XbaI et a été fusionnée en 3' de la séquence de Rv-Mermaid grâce à une réaction de ligation (voir *section 1.1.3.*).

#### 1.1.6. ER-Mermaid2<sup>D129E</sup>

Dans l'ADNc codant pour Mermaid2<sup>D29E</sup> (Tsutsui et al. 2013b), les séquences d'ADNc codant pour le couple de protéines fluorescentes CFP et YFP sont situées respectivement en 5' et en 3' de la séquence du VSD<sup>D129E</sup>. Pour induire sa rétention dans toute la membrane du RS, le motif di-arginine (-ER) (Sharma et al. 2010) a été fusionné *in frame* à l'extrémité 5' de la séquence de Mermaid2<sup>D239E</sup>

### 1.2. La sonde GCaMP et ses variants

#### 1.2.1. GCaMP6f

Dans le plasmide pEGFP-GCaMP6f (Addgene), les séquences d'ADNc codant pour le domaine M13 et la CaM sont situées respectivement aux extrémités 5' et 3' des deux portions de séquence codant pour la cpEGFP.

### 1.2.2. T306-GCaMP6f

Pour induire la rétention du biosenseur GCaMP6f dans la membrane jonctionnelle du RS, la séquence codant pour T306 a été fusionnée *in frame* à l'extrémité 3' de GCaMP6f. La séquence de T306 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pCS2-T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> en insérant les sites de restriction BamHI et NotI respectivement en 5' et 3' de l'amplicon. L'amplicon purifié a subi une double restriction enzymatique BamHI/NotI et a été fusionnée en 3' de la séquence de GCaMP6f grâce à une réaction de ligation en utilisant le même mode opératoire que pour Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (section 1.1.3.).

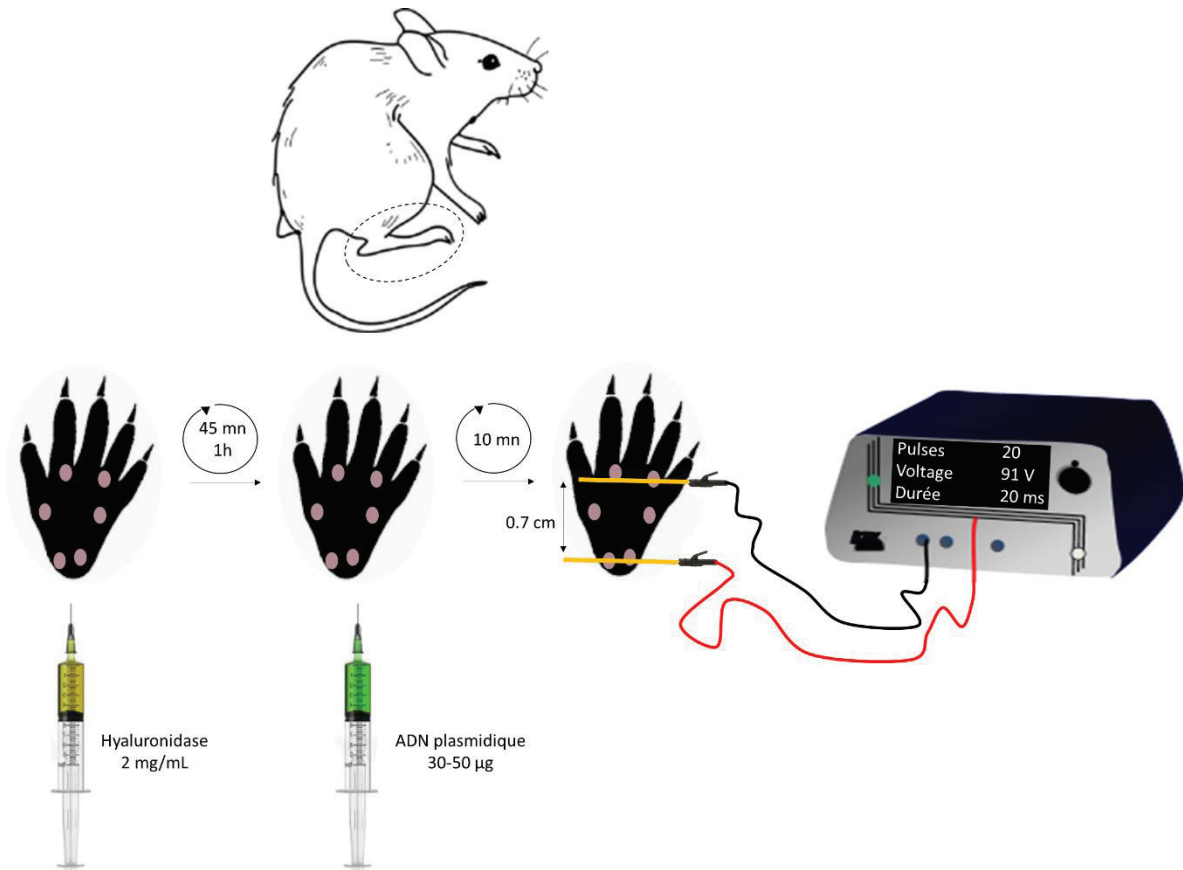
### 1.3. Amplification et purification

Les différentes constructions plasmidiques ont été amplifiées par transformation bactérienne (*E. coli* XL-10 Ultracompetent cells, Stratagene), puis sélectionnées sur boîtes de Pétri par incubation une nuit à 37°C sur du milieu *Liquid Broth Agar* (LB Agar ; 100 µg/mL d'ampicilline). Une pré-culture d'une quinzaine de colonies résistantes a ensuite été réalisée pendant une nuit à 37°C dans une 4 mL de LB liquide additionné d'ampicilline (100 µg/mL). Des aliquots de 1.5 mL de pré-culture ont été centrifugés et les culots bactériens ont été purifiés selon un protocole de « minipréparation » d'ADN. Ce protocole a consisté tout d'abord à resuspendre le culot bactérien dans du tampon P1 (25mM Tris pH8 ; 10mM EDTA) puis à lyser les bactéries avec du tampon P2 (0.2 NaOH ; 1% SDS). Après ajout de P3 (3 M acétate de potassium, pH 5.5), une centrifugation a permis de récupérer l'ADN dans le surnageant. L'ADN a été précipité par de l'éthanol 100%, centrifugé, lavé à l'éthanol 70% puis resuspendu dans du tampon Tris-EDTA et 100 µg/mL de RNase A. Une analyse de restriction a été réalisée en utilisant les enzymes adéquates (Promega) afin d'identifier les échantillons contenant le plasmide d'intérêt. Les échantillons d'ADN ainsi présélectionnés ont été séquencés (GATC Biotech). Puis les séquences ont été analysées et vérifiées (grâce aux logiciels Serial Cloner et Benchling), et une « maxipréparation » a ensuite été effectuée afin d'isoler et de purifier l'ADN plasmidique à l'aide d'un kit commercial (Endofree® Plasmid Mega Kit, Qiagen).

## 2. Transfert de gènes *in vivo*

### 2.1. Modèles animaux et muscles utilisés

Des souris mâles de souche OF1 (Oncins France 1) de 8 à 16 semaines (Charles River Laboratory) ont été utilisées pour les protocoles d'expérimentation qui ont tous été approuvés par le comité d'éthique. Les muscles squelettiques interosseux (IO) et *Flexor Digitorum Brevis* (FDB), présents dans la plante des pattes arrière de souris, ont été prélevés pour l'ensemble des expérimentations sur fibre musculaire isolée.



**Figure 43. Protocole d'électroporation *in vivo***

L'injection de hyaluronidase est effectuée sur la souris anesthésiée et permet de dégrader le tissu conjonctif et de faciliter l'accès du plasmide aux fibres musculaires

L'électroporation est également effectuée sur la souris anesthésiée, une dizaine de minutes après l'injection de l'ADN plasmidique, et consiste en l'envoi de courtes impulsions électriques entre les deux électrodes connectées à l'électroporateur. Cette technique provoque des instabilités locales au niveau de la membrane des fibres musculaires et la formation réversible de pores qui permettent l'entrée transitoire de l'ADN plasmidique dans la cellule.



## 2.2. Electroporation plasmidique

Les constructions plasmidiques ont été transfectées dans les fibres musculaires squelettiques par électroporation des muscles IO et FDB selon la méthode décrite par Lefebvre et al. 2011 (Figure 43). En résumé, les souris ont d'abord été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (3%) via un évaporateur (Univentor 400 Anesthesia ; Univentor). Les souris anesthésiées ont ensuite subi une injection de hyaluronidase (2 mg/mL NaCl 9‰) dans chaque patte afin de dégrader le tissu conjonctif et de faciliter l'accès du plasmide aux cellules musculaires. Après 1 h d'incubation de l'enzyme et une seconde anesthésie, l'ADN plasmidique (30 à 50 µg/ par patte) qsp 20 µL de NaCl (9‰) a été injecté aux souris. Les deux injections ont été réalisées à l'aide d'aiguilles hypodermiques stériles (Terumo, Belgique). La concentration d'isoflurane a progressivement été portée à 4.5 % pendant 10 min d'incubation. Puis l'ADN a été transféré aux cellules par application de 20 pulses unipolaires de 130 V/cm d'amplitude, d'une durée de 20 ms, délivrés à une fréquence de 2 Hz à l'aide d'aiguilles d'acupuncture connectées à un électroporateur (ECM 830, BTX ; Harvard apparatus, Holliston, MA, USA). Les souris ont ensuite été installées dans la salle de quarantaine de l'animalerie du laboratoire et les muscles ont été prélevés après 3 à 14 jours d'expression (en fonction du plasmide).

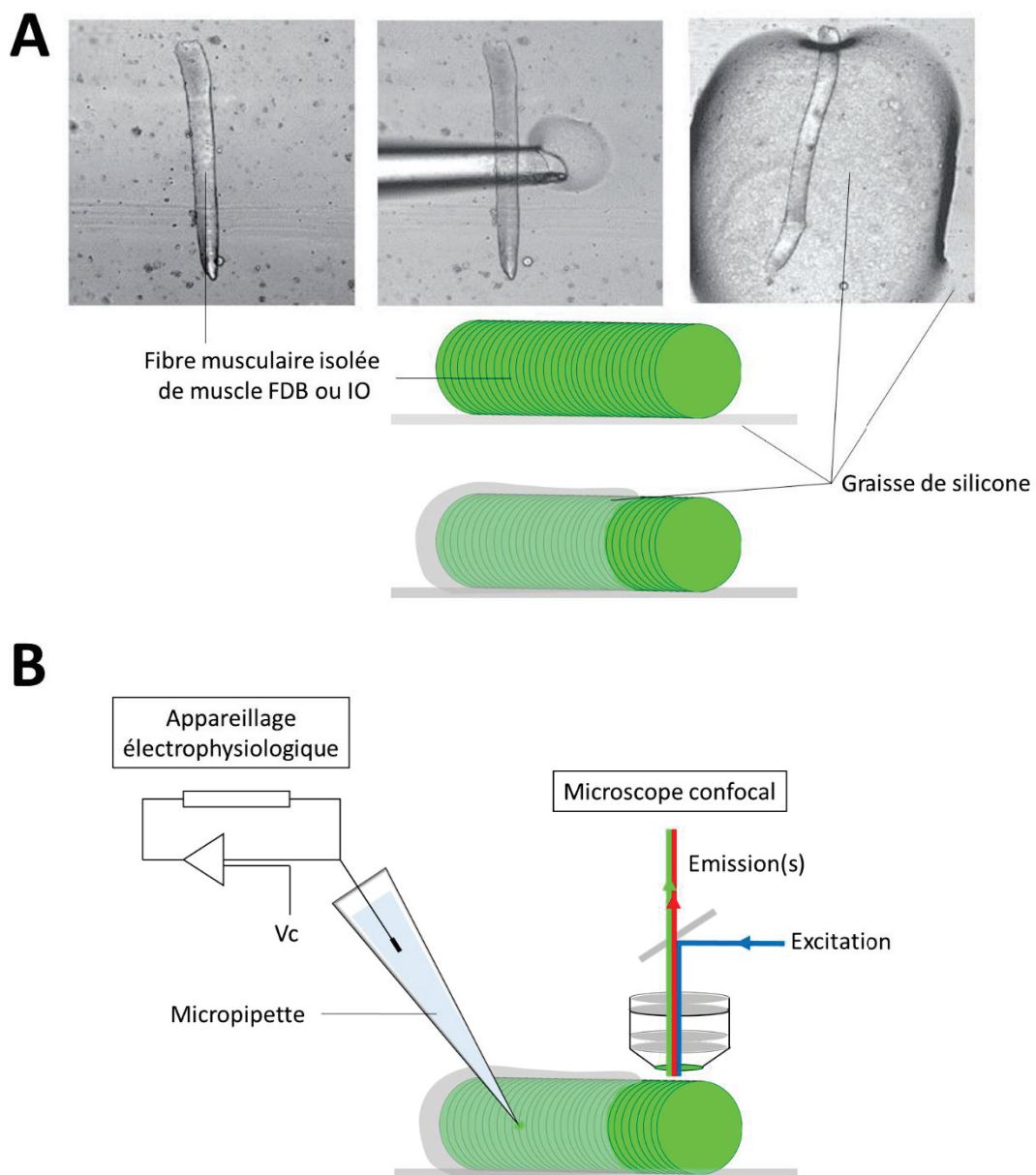
## 3. Electrophysiologie

### 3.1. Digestion enzymatique

En fin d'après-midi (17h00), les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale puis les muscles IO et FDB de chaque patte arrière ont été prélevés et incubés pendant 1h à 37°C dans une solution de Tyrode contenant de la collagénase de type I à 2 mg/mL. Le traitement des muscles à la collagénase a pour but de dégrader le collagène des différentes couches conjonctives du muscle. Après digestion enzymatique, les muscles prélevés ont été conservés toute la nuit à 4°C dans une solution de Tyrode.

### 3.2. Principe de la technique de silicone-clamp

Les fibres musculaires squelettiques isolées à partir des muscles IO et FDB de souris adultes ont une longueur de l'ordre de 0.3 à 1 mm et un diamètre compris entre 30 et 50 µm. La surface de membrane plasmique correspondante est amplifiée par le système tubulaire-T qui représente 4 à 5 fois la surface apparente du sarcolemme (Jacquemond 1997). Ceci limite considérablement la possibilité d'imposer un potentiel uniforme à l'intégralité de la membrane avec une simple micropipette de *patch-clamp*. Historiquement, différentes techniques de potentiel imposé ont été développées pour la fibre musculaire, basées sur l'utilisation de deux ou trois micro-électrodes ou sur l'utilisation de cuves expérimentales présentant un système de compartiments isolés électriquement (techniques de *vaseline-gap*) (pour revue, voir Hernández-Ochoa et Schneider 2012). Cependant, ces techniques sont



**Figure 44. Montage expérimental et dispositif d'enregistrement**

- A.** Après digestion enzymatique (collagénase de type I, 2mg/mL), les muscles FDB et IO sont placés dans une chambre de culture, dont le fond est recouvert par de la graisse de silicone, et triturés mécaniquement afin d'isoler les fibres musculaires. La fibre isolée est ensuite recouverte partiellement (80-90%) par de la graisse de silicone (photographies de microscopie, en haut, et schéma, en bas).
- B.** Une micropipette contenant une solution interne est insérée dans la portion recouverte de fibre. Les protocoles de potentiel-imposé sont démarrés tout de suite ou après 30 mn de dialyse en fonction de la composition de la solution interne. La fluorescence du biosenseur fluorescent est enregistrée simultanément aux protocoles d'électrophysiologie au niveau de la portion de fibre non recouverte.

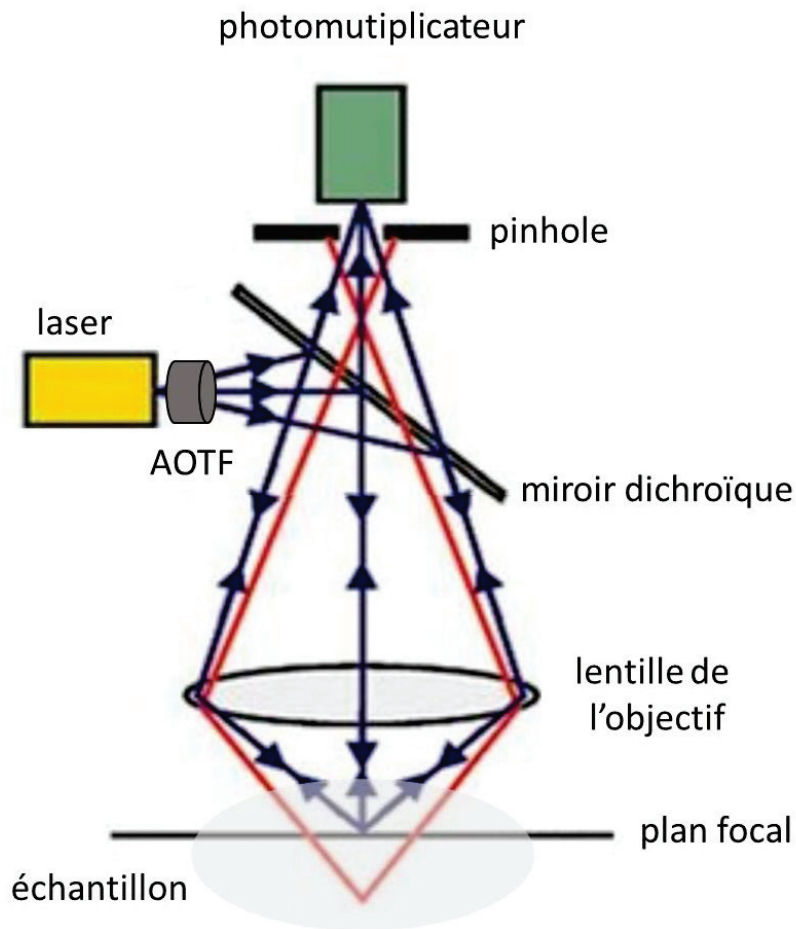
complexes à mettre en place et en œuvre, en particulier sur des fibres musculaires dissociées enzymatiquement.

Le *silicone voltage-clamp*, est l'alternative développée et utilisée en routine au laboratoire (Jacquemond 1997; Collet et al. 2004). Cette technique est adaptée à des fibres musculaires de petite taille (IO et FDB) et consiste à isoler électriquement une portion de fibre en la recouvrant partiellement par de la graisse de silicone (704028, Rhodia). Ainsi, la surface membranaire de la fibre est artificiellement réduite, ce qui permet d'appliquer un potentiel uniforme à une portion restreinte (non recouverte) de fibre avec une simple micropipette connectée à un amplificateur de *patch-clamp*.

### 3.3. Montage expérimental et dispositif d'enregistrement

Les muscles digérés ont été placés dans une chambre de culture (Ibidi, Munich, Germany) contenant du milieu de culture (MI199, Eurobio) et 10 % de sérum de veau fœtal, et dont le fond a été préalablement recouvert d'une fine couche de graisse de silicone. La dissociation des fibres musculaires a été effectuée par trituration mécanique. Puis, les fibres isolées exprimant la sonde d'intérêt ont été recouvertes sur 80-90 % de leur longueur par de la graisse de silicone. Lorsque les fibres sont transfectées avec un plasmide codant pour une protéine triadique de type T306-, l'expression n'est pas homogène (voir par exemple, Legrand et al. 2008; Lefebvre et al. 2013). Bien évidemment, pour ces fibres, la graisse de silicone a été appliquée sur la portion n'exprimant pas la sonde d'intérêt.

Le milieu de culture a ensuite été remplacé par une solution externe de composition basée sur un sel de TEA-MeSO<sub>3</sub> afin de bloquer les conductances chlorure et potassique et d'augmenter la résistance de membrane (voir *section 6. Solutions*). Une micro-pipette étirée à partir d'un capillaire de verre (*Borosilicate glass capillaries*, Harvard) a été remplie d'une solution interne mimant la composition du milieu intracellulaire (2-3 MΩ de résistance) (voir *section 6. Solutions*) puis son extrémité a été insérée dans la cellule, au travers de la couche de silicone (Figure 44). En fonction des contraintes expérimentales, la solution interne peut contenir également un marqueur fluorescent sensible au Ca<sup>2+</sup> (rhod-2 ou fluo-4FF) et/ou un chélateur de Ca<sup>2+</sup> permettant de bloquer la contraction (EGTA ou BAPTA). Dans ce cas, une dialyse intracellulaire de 30 mn a été nécessaire ; période pendant laquelle la cellule a été maintenue à un potentiel de repos de -80 mV. La micro-pipette et l'électrode de référence immergée dans le bain extracellulaire sont reliées à un amplificateur de patch-clamp RK400 (Bio-logic, Claix, France) connecté à un convertisseur AD/DA (Digidata 1440A, Molecular Devices, CA, USA) contrôlé par un ordinateur doté du logiciel pCLAMP9 (Molecular devices, CA, USA), permettant l'application de potentiels de commande et l'acquisition des signaux électrophysiologiques. Avant de réaliser l'acquisition des données, la compensation analogique de résistance série a été ajustée. La fréquence d'échantillonnage était réglée à 10 kHz durant l'acquisition.



**Figure 45. Principe de la microscopie confocale à balayage laser**

Le laser (Argon ou Hélium-Néon) émet un faisceau de lumière monochromatique qui passe à travers un premier *pinhole* puis par un filtre d'excitation. Le signal filtré est reflété sur le miroir dichroïque et concentré sur un point précis de l'échantillon par la lentille de l'objectif. La fluorescence émise par l'échantillon provient du plan focal (en bleu) et des régions adjacentes (en rouge), retraversent le miroir dichroïque et passe par un filtre d'émission. Le deuxième *pinhole* dans le plan de l'image intermédiaire élimine la fluorescence parasite et ainsi seule la fluorescence du plan focal est captée par le photomultiplicateur (PMT)

Les stimulations ont été appliquées à partir d'un potentiel de repos imposé de -80 mV (condition de couplage EC-activé) ou de 0 mV (condition de couplage EC-inactivé).

#### 4. Microscopie confocale à balayage laser

Au cours de ma Thèse, l'ensemble des images fluorescentes ont été acquises avec un microscope confocal à balayage laser (LSM 5 Exciter - Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) équipé d'un laser Argon multi-raies (458, 476, 488 et 514 nm), de deux lasers Hélium-Néon (543 et 633 nm) et d'un objectif à immersion (x63, d'ouverture numérique 1.4).

##### 4.1. Principe

Le principe de la microscopie confocale à balayage laser (Figure 45) est de pratiquer des coupes virtuelles de l'échantillon observé en enregistrant seulement la fluorescence émise dans le plan focal (en théorie ~400 nm d'épaisseur). Ce type de microscopie offre donc une bien meilleure résolution en Z que la microscopie à fluorescence conventionnelle à champ large.

Plus précisément, à la sortie du laser, le faisceau lumineux est transmis vers un cristal AOTF (pour *acousto-optic tunable filter*) dont le rôle est de moduler l'intensité et/ou de sélectionner/changer la longueur d'onde excitatrice. Le faisceau est ensuite reflété sur un miroir dichroïque puis dirigé vers l'objectif qui condense le faisceau lumineux sur un point défini de la cellule musculaire d'intérêt.

Lors de l'impact du faisceau exciteur, le biosenseur fluorescent dans la cellule musculaire émet des photons. Ceux-ci sont collectés par la lentille de l'objectif et passent à travers le miroir dichroïque puis traversent un filtre d'émission. Le signal filtré est capté par un photomultiplicateur (PMT) qui convertit et amplifie (gain) les photons en électrons. Afin de détecter correctement des signaux lumineux de différentes intensités, il est possible de jouer sur le gain du PMT (0-1000 V). En revanche, l'augmentation du gain conduit à un bruit électronique plus important et à une dégradation du rapport signal/bruit.

Un *pinhole* (ou trou d'aiguille), situé devant le PMT permet d'éliminer la fluorescence parasite des plans adjacents et de ne sélectionner que celle provenant du plan focal, ce qui offre la résolution en Z. L'épaisseur de la tranche optique varie en fonction de l'état d'ouverture du *pinhole*.

Le signal reçu est enfin converti en signal numérique permettant ainsi la reconstruction de l'image point par point par balayage du champ analysé à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse. Le mode « **balayage x,y** » permet l'acquisition d'images en deux dimensions (en routine 512 x 512 pixels) et a été utilisé pour caractériser la distribution des biosenseurs fluorescents dans les fibres musculaires ou pour les études de calibration (dépendances au potentiel, au pH ou au Ca<sup>2+</sup>).

<b>BIOSENSEURS MERMAID</b>	EXCITATION LASER		EMISSION	
	Donneur	Accepteur	Donneur	Accepteur
Configuration confocale	488 nm	543 nm	> 505 nm	> 560 nm
Configuration non-confocale/FRET	458 nm	–	500 ± 25 nm	> 560 nm

*\*avec donneur: mUKG ou CFP, et accepteur: mKOk ou YFP*

<b>BIOSENSEURS GCaMP6f</b>	EXCITATION LASER	EMISSION
Potentiel-imposé et calibration	488 nm	> 505 nm
GCaMP6f	488 nm	505 -530 nm
+ rhod-2	543 nm	> 560 nm

**Figure 46 : Les différentes configurations de fluorescence**

Le mode « **balayage  $x,t$**  » consiste à balayer une même ligne (en routine en mode « zoom  $\times 2$  » :  $51 \mu\text{m}$  / 512 pixels) plusieurs centaines/milliers de fois, ce qui permet de maintenir l'accès à des informations spatiales ( $x$ ) avec une résolution temporelle compatible avec les phénomènes étudiés. Cette configuration a été systématiquement utilisée simultanément aux protocoles de potentiel-imposé.

#### 4.2. Dispositifs d'enregistrement et réglages

##### 4.2.1. Biosenseurs Mermaid

L'imagerie de fluorescence des biosenseurs de type Mermaid a été réalisée dans deux types de configuration du microscope : confocale et non-confocale (Figure 46).

- **Configuration confocale standard**

Le mode confocal a été essentiellement utilisé pour caractériser la localisation des biosenseurs dans les cellules en mode balayage  $x,y$  avec une excitation laser à 488 nm (muKG ou CFP) ou 543 nm (mKOk ou YFP) et une détection respective aux longueurs d'ondes supérieures à 505 nm ou supérieures à 560 nm.

- **Configuration non-confocale pour les mesures en réponse à l'application de protocoles de potentiel-imposé**

La détection du signal émis par les deux partenaires de fluorescence des protéines Mermaid a été réalisée par utilisation d'une configuration non-confocale (*pinhole* d'émission complètement ouvert) du microscope afin d'augmenter l'intensité de la fluorescence recueillie. Le signal de FRET est obtenu par excitation laser à 458 nm et détection simultanée à  $500 \pm 25\text{nm}$  (muKG ou CFP) d'une part et à des longueurs d'onde supérieures à 560 nm d'autre part (mKOk ou YFP).

Les mesures de fluorescence en configuration FRET et mode balayage de ligne  $x,t$  ont été effectuées sur une durée totale de 2 à 20 s selon la durée du protocole de potentiel-imposé, à raison d'une ligne ( $x,t$ ) toutes les 1,15 ms. Afin de caractériser et de corriger les effets du *photobleaching* et autres changements éventuels de fluorescence indépendants de la réponse aux variations de potentiel, une détection du signal de FRET dans les fibres musculaires a aussi été réalisée en l'absence d'application de protocole de potentiel-imposé comme contrôle.

- **Cas particulier du *photobleaching* de l'accepteur**

Afin d'étudier l'effet du *photobleaching* de mKOk sur le mécanisme de FRET, une excitation prolongée à 543 nm a été réalisée sur une région restreinte de fibre musculaire (par balayage  $x,y$ ) exprimant les biosenseurs Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> ou T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> jusqu'à ce que la fluorescence émise

aux longueurs d'onde supérieures à 560 nm soit complètement abolie. Puis, le signal de FRET a été enregistré en configuration non-confocale (par balayage  $x,t$ ) simultanément à l'application de créneaux de potentiel-imposé selon le protocole décrit précédemment.

#### 4.2.2. Biosenseurs GCaMP6f

- **Conditions de potentiel imposé et calibration**

L'imagerie de fluorescence des biosenseurs de type GCaMP6f a été réalisée en configuration confocale standard par excitation laser à 488 nm et détection simultanée aux longueurs d'onde supérieures à 505 nm (Figure 46). Au cours des protocoles de potentiel-imposé, les enregistrements ont été effectués sur une durée totale de 2 s, à raison d'un balayage de ligne ( $x,t$ ) rapide (1.15 ms) ou lent (7.67 ms).

- **Mesure simultanée de la fluorescence du rhod-2**

Dans les fibres exprimant le biosenseur GCaMP6f et dialysées avec le rhod-2, indicateur calcique fluorescent de synthèse, une configuration d'excitation à 488 nm et de détection à 505-530 nm a été utilisée pour le signal de GCaMP6f, tandis qu'une excitation à 543 nm et une détection à des longueurs d'onde supérieures à 560 nm a été utilisée pour le rhod-2 (Figure 46). Les enregistrements étaient effectués sur une durée totale de 2 s, à raison d'un balayage de ligne ( $x,t$ ) toutes les 1.15 ms, simultanément aux protocoles de potentiel imposé.

#### 4.2.3. Autres sondes fluorescentes

- **Transitoires calciques cytosoliques détectés avec le fluo-4 FF**

Dans le cas particulier de la détection de la fluorescence émise par le fluo-4 FF, indicateur calcique fluorescent de synthèse, des fibres musculaires non transfectées ont été excitées à 488 nm et la fluorescence émise a été détectée aux longueurs d'onde supérieures à 505 nm simultanément au protocole de potentiel-imposé.

- **Marquage du réseau tubulaire transverse et di-8anepps**

Le di-8-anepps est une sonde qui fluoresce lorsqu'elle s'incorpore dans les environnements lipidiques telles que les membranes biologiques et qui permet donc de visualiser l'organisation structurale du système tubulaire transverse. Afin de caractériser la localisation du biosenseur ER-Mermaid2<sup>D129E/Y235R</sup>, les fibres musculaires ont été incubées pendant 1h avec une solution contenant 20  $\mu$ M de di-8-anepps. Les images ( $x,y$ ) de fluorescence ont été obtenues par excitation à 488 nm ou 543 nm et détection aux



longueurs d'onde supérieures à 560 nm pour la visualisation respective du di-8-anepps ou de ER-Mermaid2<sup>D129E/Y235R</sup>.

## 5. Analyses des images de fluorescence

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

### 5.1. Biosenseurs Mermaid

Pour chaque fibre musculaire exprimant un biosenseur d'intérêt et maintenue avec succès en conditions de potentiel-imposé, l'étude du transfert d'énergie entre les deux partenaires du couple de FRET a été réalisée via le calcul du rapport normalisé  $R/R_0$ , désigné comme rapport de FRET, avec  $R = F_{>560}/F_{500}$  (accepteur/donneur) et  $R_0$  la valeur de  $R$  au potentiel de maintien de la fibre musculaire (-80 ou 0 mV en fonction du protocole de potentiel imposé).

Les courbes de variation du rapport de FRET en fonction du potentiel ont été construites à partir des valeurs maximales de variation de  $R/R_0$  pour chaque valeur de potentiel-imposé. L'ensemble des valeurs obtenu pour chaque fibre musculaire a été ajusté avec une fonction de Boltzmann :

$$\text{Max}/\{1+\exp[(V_{0.5}-V)/k]\}$$

Avec Max la variation maximale du rapport de FRET,  $V_{0.5}$  le potentiel de demi-activation,  $V$  le potentiel de membrane et  $k$  la pente.

Les valeurs des constantes de temps de croissance ( $\tau_{on}$ ) et décroissance ( $\tau_{off}$ ) ont été obtenues par ajustement du rapport de FRET (respectivement à la mise en place et après la rupture du créneau de potentiel) avec une fonction exponentielle pour chaque valeur de potentiel-imposé.

### 5.2. Biosenseurs GCaMP6f

Pour chaque fibre musculaire exprimant un biosenseur d'intérêt et maintenue avec succès en conditions de potentiel imposé, les variations de fluorescence ont été quantifiées par le rapport  $F/F_0$  avec  $F$  la fluorescence maximale émise pendant le pulse et  $F_0$  la fluorescence au potentiel de maintien de -80 mV. Les variations moyennes de  $F/F_0$  dans les fibres musculaires exprimant le biosenseur GCaMP6f ou T306-GCaMP6f ont été obtenues en moyennant la réponse sur toute la longueur de la ligne de scan (51  $\mu\text{m}$ ). Les variations locales de  $F/F_0$  ont été déterminées sur des régions de 0.5  $\mu\text{m}$  de large centrées sur les pics du profil d'expression triadique de la fluorescence de base  $F_0$ .

## 6. Solutions

- **Tyrode**

La solution de Tyrode contient (en mM) 140 NaCl, 5KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES. Le pH est ajusté à 7.2 avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH).

### 6.1. Conditions de potentiel-imposé

- **Solution extracellulaire**

La solution utilisée pour les enregistrements de silicone-clamp est pauvre en Cl<sup>-</sup> et dépourvue de Na<sup>+</sup> et de K<sup>+</sup> afin de limiter le flux de ces ions, d'augmenter la résistance de membrane et de favoriser le contrôle du potentiel. Elle est composée (en mM) de 140 tétraéthylammonium (TEA)-MeSO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 TEA-HEPES, 0.002 tétrodotoxine (TTX), 1 4-aminopyridine (4-AP). Le TEA et la 4-AP sont utilisés pour bloquer la conductance K<sup>+</sup> et la TTX pour bloquer la conductance Na<sup>+</sup> dépendante du potentiel. Le pH de la solution a été équilibré à 7.2 avec de l'acide méthane-sulfonique (MeSO<sub>3</sub>).

Dans certaines conditions expérimentales, le BTS (50 μM) a été ajouté à la solution externe afin de bloquer la contraction à la place de l'EGTA ou du BAPTA.

- **Solution intracellulaire**

La solution de dialyse mime le milieu intracellulaire. Sa composition de base est (en mM) 120 K-glutamate, 5 Na<sub>2</sub>-ATP, 5 Na<sub>2</sub>-phosphocreatine, 5.5 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 5 HEPES. Le pH a été ajusté à 7.2 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH).

Dans certaines conditions expérimentales, la solution interne contient également (en mM) un indicateur calcique de synthèse, 0.1 rhod-2 ou 0.2 fluo-4FF, et/ou un chélateur calcique, 10-15 EGTA ou 20 BAPTA. L'EGTA (acide bis-(aminoéthyl)-glycoléther-N,N,N',N'-tétraacétique) et le BAPTA (acide 1,2-bis-(o-aminophénoxy)-éthane- N,N,N',N'-tétraacétique) sont utilisés pour bloquer la contraction et sont saturés à 40 % avec du CaCl<sub>2</sub> de manière à maintenir une concentration en calcium libre proche de 100 nM.

### 6.2. Perméabilisation et calibration

Les différentes calibrations ont été effectuées dans le but de caractériser la sensibilité des biosenseurs à certains ions (H<sup>+</sup> pour le biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> et Ca<sup>2+</sup> pour les biosenseurs de type GCaMP6f).

- **Dépendance au pH du biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>**

Afin de caractériser la dépendance au pH de T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, les fibres musculaires ont été traitées successivement avec différentes solutions extracellulaires contenant (en mM) 0.01 nigéricine,

140 K-Glutamate, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES dont le pH était ajusté à différentes valeurs (6 – 6,5 – 7 - 7,5 - 8) avec du KOH ou du MeSO<sub>3</sub>.

Dans ces conditions expérimentales, la réponse du couple de fluorescence (muKG-mKOk) de T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> a été enregistrée en configuration FRET par balayage x,y à raison d'une image par seconde.

- **Dépendance au Ca<sup>2+</sup> des biosenseurs de type GCaMP6f**

La construction de la courbe de calibration du Ca<sup>2+</sup> pour le biosenseur T306-GCaMP6f a été réalisée sur fibres musculaires préalablement perméabilisées avec une solution extracellulaire contenant 0.05% de saponine et (en mM) 140 K-MeSO<sub>3</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA et 5 HEPES. Après perméabilisation, la solution externe a été remplacée par une solution de type interne dépourvue de Ca<sup>2+</sup> – afin de déterminer la valeur F<sub>min</sub> – contenant (en mM) 140 KCl, 10 EGTA, 5 PIPES, 0.05 BTS, 2 2,3-butanedione monoxime (BdM). Les fibres ont ensuite été complètement enrobées dans de la graisse silicone et le milieu interne dialysé successivement à travers la pointe de micropipettes remplies de la solution interne précédemment décrite et contenant des concentrations croissantes de CaCl<sub>2</sub> (en mM) 2, 5, 7, 9, 9.5, 9.9, 10, puis 11 (pour déterminer la valeur de F<sub>max</sub>). Le temps d'équilibration de chaque concentration était de 30 min. Le pH de toutes les solutions a été ajusté à 7.

Dans ces conditions expérimentales, l'acquisition d'images x,y – moyennées 4 fois afin d'augmenter le rapport signal/bruit – a été réalisée au début de l'expérience et à la fin de chaque dialyse.

La construction de la courbe de calibration du Ca<sup>2+</sup> pour le biosenseur GCaMP6f a été réalisée sur une fibre musculaire équilibrée successivement en présence des mêmes solutions décrites ci-dessus contenant également de la ionomyicine (0.01 mM).

La dépendance des valeurs de fluorescence en fonction des concentrations en calcium libre dans chaque solution a été ajustée avec l'équation de Hill.

## **7. Analyses statistiques**

Les données ont été analysées avec le logiciel Origin 7/8 (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± écart à la moyenne (SEM) pour le nombre *n* indiqué de fibres musculaires.

## **8. Culture cellulaire et immunomarquage**

*La culture cellulaire et l'immunomarquage ont été réalisés par T. Hilaire, étudiant en M1 au laboratoire, sous la supervision de C. Berthier.* Les cellules COS-7 et HeLa ont été cultivées en milieu de culture DMEM (Eurobio) supplémenté de 10-15 % de sérum de veau fœtal, 100 mM de pyruvate de sodium, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère de culture contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont ensuite étéensemencées sur des lamelles de verre la veille de la transfection puis transfectées avec les plasmides d'intérêt en utilisant les réactifs FuGENE HD (Promega) ou Polyfect (Qiagen). L'immunomarquage a été effectué dans les 48 à 72h suivant la transfection. Pour cela, les cellules ont été fixées avec 2 % de paraformaldéhyde dilué dans du PBS additionné 300 mM de MgCl<sub>2</sub> et 30 mM de CaCl<sub>2</sub> (PBS-CaMg) et perméabilisées avec 0.1 % de Triton X-100/50 mM de glycine dilué dans du PBS-CaMg. Les sites non spécifiques ont été bloqués avec 1% de BSA dans du PBS-CaMg. Puis, les cellules ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants dilués dans du PBS-CaMg contenant 1 % de BSA : anti-GM130 monoclonal (clone 35 ; 1 :1000 ; transduction BD) pour marquer l'appareil de Golgi, anti-KDEL monoclonal (10C3 ; 1 :250 ; Abcam) pour marquer le réticulum endoplasmique, ou anti-GRP78-BIP polyclonal (1 :200 ; Abcam) pour marquer la lumière du réticulum endoplasmique. Une seconde étape de blocage a été réalisée avec du PBS-CaMg contenant 1 % de sérum de chèvre normal. Ensuite, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires IgG anti-souris conjugués au Fluor647 Hilyte (Anaspec) ou anti-lapin conjugués à l'Alexa Fluor 594 (Molecular Probes), pendant 1h à température ambiante. L'ensemble des incubations a été effectué dans une chambre humidifiée et les cellules ont ensuite été abondamment rincées avec du PBS-CaMg après chaque incubation. Les échantillons immunomarqués ont ensuite été montés dans un milieu de montage (Vectashield ; Vector Laboratories ; ou Dako) et imagés en microscopie confocale à balayage laser  $x,y$ .

## **9. Modélisation des variations de Ca<sup>2+</sup> le long du sarcomère**

Afin de tester la crédibilité des résultats comparant la réponse des biosenseurs GCaMP6f et T306-GCaMP6f, une simulation des variations de concentration en Ca<sup>2+</sup> et des variations correspondantes de calcium complexé à chacune des deux sondes, le long du sarcomère a été réalisée par le Pr. Laszlo Csernoch (Université de Debrecen, Hongrie). Il est bien entendu que le détail des procédures et calculs utilisés sont du ressort exclusif de la compétence du Pr. Csernoch. Le modèle est basé sur un flux de Ca<sup>2+</sup> synthétique reproduisant les propriétés physiologiques présumées du flux de Ca<sup>2+</sup> du RS en réponse à une dépolarisation. L'espace cytoplasmique le long d'un quart de sarcomère (0.5 µm) est subdivisé en volumes (voxels) de 1000 nm<sup>3</sup>. Sur la base du flux d'entrée restreint au premier voxel, le modèle calcule le changement de concentration en Ca<sup>2+</sup> dans chaque voxel suivant, au cours du temps,

en prenant en compte la diffusion du  $\text{Ca}^{2+}$  et les propriétés de l'espace cytoplasmique en termes de tampons calciques (parvalbumine, troponine C), transport dans le RS (par l'ATPase SERCA), et complexation au biosenseur GCaMP6f ou T306-GCaMP6f, en prenant en compte l'affinité et les contraintes cinétiques déterminées respectivement à partir des calibrations et des comparaisons entre les transitoires calciques mesurés simultanément avec GCaMP6f et l'indicateur rhod-2. En imposant la présence de T306-GCaMP6f exclusivement à la zone du flux calcique, le modèle permet d'estimer les différences prédictibles de décours des variations de fluorescence des deux biosenseurs.

# RESULTATS

## Section 1.

### ADRESSAGE D'UN BIOSENSEUR-FRET SENSIBLE AU POTENTIEL A LA MEMBRANE DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE DANS LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

Article 1 : **Sanchez, C.**, Berthier, C., Allard, B., Perrot, J., Bouvard, C., Tsutsui, H., Okamura, Y. and Jacquemond, V. (2018). Tracking the sarcoplasmic reticulum membrane in muscle with a FRET biosensor. *J Gen Physiol*.

#### Introduction

Les flux d'ions à travers les membranes cellulaires génèrent une activité électrique cruciale pour la fonction des cellules excitables et non-excitables. En particulier, des canaux, pompes et transporteurs ioniques présents dans la membrane du RE/RS sont à l'origine de flux ioniques importants. Plus spécifiquement dans le muscle squelettique, l'ouverture des canaux RYR1 au cours du couplage EC est à l'origine d'une augmentation massive de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Les données actuelles tendent à établir de manière dogmatique que des contre-flux ioniques concomitants à la libération de  $Ca^{2+}$  permettraient de maintenir le potentiel de membrane du RS à des valeurs proches de 0 mV (donc éloignées de  $E_{Ca^{2+}} = +120$  mV) et donc de maintenir l'efflux calcique (A. V. Somlyo et al. 1981; J. S. Smith et al. 1988; Oetliker 1989; Fink et Veigel 1996; Gillespie et Fill 2008b). En revanche, aucune donnée expérimentale n'a permis jusqu'à présent de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse à l'échelle d'une fibre musculaire intacte en raison de l'inaccessibilité à une mesure fiable du potentiel de membrane du RS. Ainsi, la possibilité que des variations transitoires ou chroniques du potentiel de membrane du RS puissent se développer au cours de l'activité musculaire normale, en conditions de fatigue ou pathologique reste inexplorée.

Afin de contourner le problème, nous avons adressé des biosenseurs-FRET (couple de fluorescence mUKG-MKOk) sensibles au potentiel (VSD de la *Ci-VSP*) de type Mermaid (Tsutsui et al. 2008c) spécifiquement à la membrane du RS de fibres musculaires différenciées.

#### Résultats

##### ***Calibration de la sensibilité au potentiel du signal de FRET des biosenseurs de type Mermaid***

En l'absence de séquence d'adressage, les biosenseurs Mermaid (couple de FRET en 5' du VSD), Rv-Mermaid (couple de FRET en 3' du VSD) et Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (couple de FRET en 3' du VSD muté en positions 129 et 235) s'insèrent, en majorité, par défaut dans les tubules-T des fibres musculaires.

Ceci a permis de calibrer leur réponse au potentiel et ainsi de sélectionner le variant le plus approprié à notre question expérimentale.

De manière générale, les biosenseurs Mermaid et Rv-Mermaid répondent à une dépolarisation membranaire par une augmentation du rapport de FRET (mKOk/mUKG) et à une hyperpolarisation membranaire par une diminution du rapport de FRET.

De manière intéressante, la réponse de FRET du variant Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> diffère de celle de Mermaid et Rv-Mermaid. En effet, des stimulations dépolarisantes entre -40 et -20 mV génèrent une variation négative du rapport de FRET. De plus, en réponse à des dépolarisations d'amplitude plus importante, une composante positive – similaire à celle observée avec Mermaid et Rv-Mermaid – vient se superposer à cette composante négative du signal de FRET. Cette complexité du signal enregistré est variable d'une fibre à l'autre et résulte sans doute de l'existence de deux populations de biosenseurs Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> : l'une présente dans la membrane des tubules-T, l'autre dans la membrane d'un compartiment subcellulaire dotée d'une activité électrique distincte de celle des tubules-T.

Cette mixité est visible en conditions d'activation du couplage EC, c'est-à-dire lorsque les dépolarisations sont imposées à des fibres musculaires maintenues à un potentiel de repos de -80 mV. Afin de s'affranchir de cette contamination, de conserver uniquement la réponse des biosenseurs insérés dans la membrane des tubules-T et ainsi de pouvoir calibrer la réponse du variant Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, les stimulations ont été imposées à des fibres musculaires maintenues à un potentiel de 0 mV, conditions d'inactivation du couplage EC. Finalement, en raison de sa sensibilité centrée autour de 0 mV, Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> s'est avéré être le variant le plus adapté à l'étude de l'activité électrique potentielle de la membrane du RS.

### ***Signal de FRET des biosenseurs de type Mermaid adressés au RS au cours du couplage EC***

L'adressage du variant d'intérêt Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> à la membrane jonctionnelle du RS a été réalisé avec succès grâce à sa fusion à l'extrémité N-terminale de la séquence T306 (correspondant au 306 premiers résidus de la triadine). De manière intéressante, dans les fibres musculaires, la réponse du biosenseur adressé T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> est unique et ne montre aucun signe, quel qu'il soit, d'une contribution des tubules-T. Cette réponse est dépendante du potentiel ( $V_{0.5} = -26.2$  mV) et se caractérise par une diminution du rapport de FRET ( $\Delta R_{\max}/R_0 = -6\%$ ) lorsque des dépolarisations sont imposées à la membrane des tubules-T.

Le *photobleaching* complet de l'accepteur (mKOk) du biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> entraîne une abolition du mécanisme de FRET et une augmentation de la fluorescence de base du donneur



(mUKG) via un processus de dé-*quenching*. Ces données indiquent que le signal détecté avec le biosenseur adressé est bel et bien un signal de FRET.

Afin de confirmer l'existence d'un signal de FRET potentiel-dépendant spécifique à la membrane du RS, nous avons testé la réponse du variant Mermaid2<sup>D129E</sup> (couple de FRET CFP-YFP et VSD muté en position 129) fusionné à la séquence d'adressage -ER. Comme attendu, ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> est inséré dans toute la longueur de la membrane du RS (jonctionnelle et non jonctionnelle). En revanche, sa réponse aux variations de potentiel imposé en conditions d'inactivation du couplage (potentiel de maintien de 0 mV) indique qu'il est également présent dans la membrane des tubules-T. Cette mixité d'adressage a compliqué la caractérisation des signaux provenant du RS et a donc limité l'utilisation du biosenseur ER-Mermaid2<sup>D129E</sup>. Ces résultats montrent que la séquence -ER n'est pas aussi efficace que la séquence -T306 pour induire l'adressage strict du biosenseur à la membrane du RS.

De manière surprenante, lorsque le variant Rv-Mermaid ( $V_{0.5} = -70$  mV) est adressé à la membrane du RS grâce à sa fusion à l'extrémité N-terminale de T306 (T306-Rv-Mermaid), il répond également aux dépolarisations imposées par une diminution du rapport de FRET et ceci de manière quasiment identique ( $\Delta R_{\max}/R_0 = -7.5$  % et  $V_{0.5} = -26.4$  mV) au biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. Cette similarité de réponse obtenue avec deux variants de Mermaid, aux sensibilités différentes vis-à-vis du potentiel, suggère qu'un autre mécanisme que la voltage-dépendance entre en jeu lorsque les biosenseurs sont insérées dans la membrane du RS.

### ***Sensibilité au pH du signal de FRET des biosenseurs de type Mermaid***

Bien que Tsutsui et al. (2008) se soient préalablement assurés de la résistance au pH des partenaires de fluorescence mUKG et mKOK, nous avons testé la sensibilité au pH du biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> par traitement des fibres musculaires avec la nigéricine (ionophore H<sup>+</sup>) et équilibration en présence de solutions à différentes valeurs de pH. Les résultats indiquent que, dans notre système, le signal de FRET est sensible au pH et la diminution maximale de 6% du rapport de FRET enregistrée en réponse à une dépolarisation pourrait correspondre en fait à une diminution de pH intracellulaire de 7.2 à ~7. Dans nos conditions expérimentales standard, les fibres musculaires sont dialysées avec de larges concentrations d'EGTA (20 mM) afin de bloquer la contraction. Or, l'EGTA libère des protons lors de sa complexation au Ca<sup>2+</sup>. L'ensemble de ces données suggèrent que le signal de FRET enregistré avec le biosenseur adressé est très probablement un signal de pH.

### ***Signal de FRET des biosenseurs de type Mermaid adressés au RS au cours du couplage EC dans des conditions de limitation des variations de pH intracellulaire***

Afin de nous affranchir des variations de pH induites par la présence de l'EGTA, nous avons étudié la réponse du biosenseur adressé T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> en présence d'autres bloqueurs de la contraction (BAPTA ou BTS). En présence de BAPTA dans le milieu intracellulaire, la libération de Ca<sup>2+</sup> par le RS déclenchée par des stimulations dépolarisantes n'est pas accompagnée d'une diminution du rapport de FRET. Au contraire, une légère augmentation du signal de FRET est enregistrée ( $\Delta R/R_0 < 1.5\%$ ) compatible soit avec un changement de potentiel de la membrane du RS soit une légère alcalinisation intracellulaire ( $\Delta pH \approx 0.06$ ).





Cependant, en présence de BTS extracellulaire, le rapport de FRET des biosenseurs T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> et T306-Rv-Mermaid augmente avec une amplitude similaire ( $\Delta R/R_0 \approx 3\%$ ) en réponse à des trains de potentiels d'action. Ces données similaires obtenues avec les deux variants de Mermaid présentant une sensibilité au potentiel distincte tendent à démontrer, ici encore, que le signal enregistré n'est sûrement pas une variation de potentiel, mais plutôt un signal pH.

### **Conclusion**

La fusion des biosenseurs fluorescents sensibles au potentiel de type Mermaid à la séquence T306 offre l'opportunité unique d'avoir accès à l'activité électrique de la membrane du RS dans des fibres musculaires intactes. En présence d'EGTA, les biosenseurs adressés T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> et T306-Rv-Mermaid sont capables de détecter des variations locales de pH au cours de la libération de Ca<sup>2+</sup>. En revanche, en l'absence d'EGTA, aucun changement significatif du signal de FRET n'est détecté ce qui suggère que le RS ne connaît pas de variation substantielle de son potentiel de membrane au cours de l'activation du couplage EC.

RESEARCH ARTICLE

# Tracking the sarcoplasmic reticulum membrane voltage in muscle with a FRET biosensor

Colline Sanchez<sup>1</sup>, Christine Berthier<sup>1</sup> , Bruno Allard<sup>1</sup> , Jimmy Perrot<sup>1</sup>, Clément Bouvard<sup>1</sup> , Hidekazu Tsutsui<sup>2,3</sup>, Yasushi Okamura<sup>2</sup>, and Vincent Jacquemond<sup>1</sup> 

Ion channel activity in the plasma membrane of living cells generates voltage changes that are critical for numerous biological functions. The membrane of the endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (ER/SR) is also endowed with ion channels, but whether changes in its voltage occur during cellular activity has remained ambiguous. This issue is critical for cell functions that depend on a Ca<sup>2+</sup> flux across the reticulum membrane. This is the case for contraction of striated muscle, which is triggered by opening of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels in the SR membrane in response to depolarization of the transverse invaginations of the plasma membrane (the t-tubules). Here, we use targeted expression of voltage-sensitive fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes of the Mermaid family in differentiated muscle fibers to determine whether changes in SR membrane voltage occur during depolarization–contraction coupling. In the absence of an SR targeting sequence, FRET signals from probes present in the t-tubule membrane allow calibration of the voltage sensitivity and amplitude of the response to voltage-clamp pulses. Successful SR targeting of the probes was achieved using an N-terminal domain of triadin, which completely eliminates voltage-clamp-activated FRET signals from the t-tubule membrane of transfected fibers. In fibers expressing SR-targeted Mermaid probes, activation of SR Ca<sup>2+</sup> release in the presence of intracellular ethyleneglycol-bis( $\beta$ -amino-ethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetra acetic acid (EGTA) results in an accompanying FRET signal. We find that this signal results from pH sensitivity of the probe, which detects cytosolic acidification because of the release of protons upon Ca<sup>2+</sup> binding to EGTA. When EGTA is substituted with either 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid or the contraction blocker *N*-benzyl-*p*-toluene sulfonamide, we find no indication of a substantial change in the FRET response caused by a voltage change. These results suggest that the ryanodine receptor-mediated SR Ca<sup>2+</sup> efflux is well balanced by concomitant counterion currents across the SR membrane.

## Introduction

Ion fluxes across the cell plasma membrane generate electrical activity that plays a key role in the function of excitable and non-excitable tissues (Hodgkin and Huxley, 1952; Bertrán et al., 1995; Armstrong and Hille, 1998). Ion channels, pumps, and transporters are also present in the membrane of the ER/SR, where they either play a clearly identified role (Berridge, 1993; Meissner, 1994; Martonosi, 1996) or are presumed to do so (Kourie et al., 1996; Picollo and Pusch, 2005; Yazawa et al., 2007; Kuum et al., 2012). One of the most classic examples is the role of Ca<sup>2+</sup> release channels and SR/ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase in Ca<sup>2+</sup> cycling across the reticulum membrane to control contraction of smooth and striated muscles. In skeletal muscle, contraction is initiated when action potentials activate the voltage-sensing Ca<sub>v</sub>1.1 proteins in the t-tubules, within a specific membrane region called the triad, where the membrane of one t-tubule is in close apposition with

the membrane of two terminal cisternae of SR. In turn, activated Ca<sub>v</sub>1.1s open up type 1 ryanodine receptor (RYR1) Ca<sup>2+</sup> release channels in the junctional SR membrane, through a protein–protein interaction coupling process (Schneider, 1994; Samsó, 2015). The resulting SR Ca<sup>2+</sup> efflux increases cytosolic [Ca<sup>2+</sup>], which triggers contraction. So far, it is believed that during Ca<sup>2+</sup> release, the voltage across the SR membrane is maintained near a resting value close to 0 mV because of a countercurrent of other ions (Somlyo et al., 1981; Smith et al., 1988; Oetliker, 1989; Fink and Veigel, 1996; Gillespie and Fill, 2008). However, the ER/SR membrane is not accessible to standard electrophysiology in intact cells, which has so far prevented determining whether changes in its electrical potential occur during cellular activity. In skeletal muscle, this question was experimentally challenged in the 1980s (Vergara et al., 1978; Baylor et al., 1984). However, results

<sup>1</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, Institut NeuroMyoGène, Villeurbanne, France; <sup>2</sup>Laboratory of Integrative Physiology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan; <sup>3</sup>Bioscience and Bioengineering, Japan Advanced Institute of Science and Technology, Nomi, Ishikawa, Japan.

Correspondence to Vincent Jacquemond: [vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr](mailto:vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr).

© 2018 Sanchez et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

were inconclusive, and because the approaches used at the time lacked target specificity, it could not be established whether the detected signals corresponded to a SR voltage change or resulted from other steps of excitation–contraction (EC) coupling. Here, we circumvented this problem by targeting voltage-sensing fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensors of the Mermaid family (Tsutsui et al., 2008) to the SR membrane of muscle fibers. Results suggest that the SR membrane voltage changes negligibly during muscle fiber activation, if at all.

## Materials and methods

All experiments and procedures were performed according to the ethics principles of the French Department of Veterinary Services and the French Ministry for Higher Education and Research, in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of the University Claude Bernard Lyon 1, the French Ministry of Agriculture (decree 87/848), and the revised European Directive 2010/63/EU. All experiments were performed at room temperature (20–22°C).

### Plasmid constructs

Biosensor cDNAs were derived from the original Mermaid cDNA (Tsutsui et al., 2008) and were all inserted into the modified pCS2<sup>+</sup> vector for mammalian expression. Rv-Mermaid cDNA was designed by inserting Mermaid voltage-sensing domain (VSD) coding sequence in 3' of mUKG and mKOK coding sequences. Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> was designed by inserting mutations into codons 129 and 235 of the VSD S4-segment sequence to shift its voltage dependence toward more positive values (Tsutsui et al., 2013a,b). The VSD<sup>D129E/Y235R</sup> sequence was PCR amplified from pCS2<sup>+</sup>-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> and was used to replace WT VSD sequence by in-frame insertion using EcoRI and XbaI sites. To trigger retention of the biosensor at the triadic SR, we fused in frame the cDNA sequence of human skeletal triadin (gift of V. Sorrentino, University of Siena, Siena, Italy) corresponding to residues 1–306 (T306). These residues are indeed necessary and sufficient for proper triadic localization (Rossi et al., 2014). T306 cDNA was amplified by PCR to generate appropriate XbaI and SacII restriction sites and was subcloned in-frame at the 3' end of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> into pCS2<sup>+</sup>. Another sequence of reticular biosensor was designed by replacing the 103-residue-long cytosolic N-terminal chain of Mermaid2 (Tsutsui et al., 2013b) by a 201-residue-long N-terminal chain comprising two di-arginine motifs (residues 29–35). Di-arginine motif located in the N-terminal cytosolic tail has been shown to be responsible for ER retention of phospholamban through a putative COP I-mediated transport (Sharma et al., 2010). After PCR amplification, the cDNA fragment corresponding to this so-called ER-N-terminal sequence was inserted in-frame and in place of the original 5' end of Mermaid2 sequence using appropriate restriction enzymes.

### In vivo transfection

The experimental protocol for in vivo transfection was approved by the Lyon University Animal Experimentation Committee. Expression was achieved by plasmid injection followed by electroporation according to previously described procedures

(Lefebvre et al., 2011). In brief, Swiss OF1 male mice 8–16 wk old were used. Transfection was performed so as to target both the flexor digitorum brevis (fdb) and interosseus muscles of the animals. Mice were anesthetized by isoflurane inhalation using a commercial delivery system (Univentor 400 Anesthesia Unit; Univentor). Then, 20  $\mu$ l of a solution containing 2 mg/ml hyaluronidase dissolved in sterile saline was injected into the footpads of each hind paw. 1 h later, the mouse was reanesthetized by isoflurane inhalation. A total volume of 20  $\mu$ l of a solution containing 30–50  $\mu$ g plasmid DNA diluted in NaCl 0.9% was injected into the footpads of the animal. After the injection, two gold-plated stainless steel acupuncture needles connected to the electroporation apparatus were inserted under the skin, near the proximal and distal portion of the foot, respectively. The standard protocol that we used consisted of 20 pulses of 130 V/cm amplitude and 20-ms duration delivered at a frequency of 2 Hz by a BTX ECM 830 square wave pulse generator (Harvard Apparatus). Muscle fiber isolation and experimental observations and measurements were performed 7–14 d later.

### Preparation of muscle fibers and electrophysiology

Single fibers were isolated from the fdb and interosseus muscles using a previously described procedure (Jacquemond, 1997). Mice were anesthetized by isoflurane inhalation and killed by cervical dislocation before removal of the muscles. Muscles were treated with collagenase (type I; Sigma) for 60 min at 37°C in the presence of Tyrode's solution (see Solutions). Single fibers were then obtained by gentle trituration of the muscles within a 50-mm-wide culture  $\mu$ -dish (Ibidi) filled with culture medium containing 10% FBS (M1199; Eurobio), the bottom of which had been first covered with a thin layer of silicone grease. Single fibers were then partially insulated with silicone grease so that only a 50–100- $\mu$ m-long portion of the fiber extremity was left out of the silicone, as described previously (Jacquemond, 1997). In case of local expression of the constructs (Fig. 4), care was taken so that the expressing fiber region was outside of the silicone. Voltage clamp was performed with a micropipette filled with an intracellular-like solution (see Solutions). The tip of the micropipette was inserted through the silicone within the insulated part of the fiber and was crushed against the bottom of the chamber to reduce series resistance and ease intracellular equilibration of the micropipette solution. The micropipette was connected to an RK-400 patch-clamp amplifier (Bio-Logic) used in whole-cell voltage-clamp configuration. Command voltage pulse generation was achieved with an analogue-to-digital converter (Digidata 1440A; Axon Instruments) controlled by pClamp 9 software (Axon Instruments). Fibers were bathed in the TEA-containing extracellular solution (see Solutions). Analogue compensation was adjusted to further decrease the effective series resistance. Voltage-clamp steps were applied from a holding command potential of either –80 or 0 mV. For intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements shown in Fig. S4, the micropipette was filled with the intracellular-like solution also containing 0.2 mM of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent indicator fluo-4 FF. In most experiments, muscle fiber contraction was prevented by the presence of a large concentration of EGTA in the intracellular-like solution (see Solutions). Alternatively, contraction

was prevented by using either 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N,N*-tetraacetic acid (BAPTA) in the intracellular-like solution or *N*-benzyl-*p*-toluene sulphonamide (BTS) in the extracellular solution, as specified in the text.

#### Fluorescence measurements in voltage-clamped muscle fibers

All experiments were conducted with a Zeiss LSM 5 Exciter confocal microscope equipped with a 63× oil-immersion objective (numerical aperture, 1.4). For *x,y* confocal imaging of fibers expressing the Mermaid constructs, either excitation was provided by the 488-nm line of an argon laser and a 505-nm long-pass filter was used on the detection channel, or excitation was at 543 nm from a HeNe laser and fluorescence was collected at >560 nm. Both configurations provided essentially identical images. For detection of FRET changes in response to voltage-clamp pulses, the line-scan mode (*x,t*) of the microscope was used with the 488-nm line of the argon laser for excitation and simultaneous detection at 500 ± 25 nm ( $F_{500}$ , green traces) and >560 nm ( $F_{>560}$ , red traces). The line was always oriented along the main axis of the fibers. To improve detection and limit photobleaching, records were taken with the pinhole fully open (1-mm diameter). Even under these conditions, the signal-to-noise ratio of the voltage-induced FRET changes was in most cases rather poor, so that, in a given fiber for each tested pulse protocol, routinely three to five records (each at a different line position) were taken and averaged. FRET signals were expressed as the ratio  $R = F_{>560}/F_{500}$  and normalized to the ratio  $R_0$  at either -80 or 0 mV, as specified in the text. Fluorescence records at 500 and >560 nm were corrupted to some extent by time-dependent changes including photobleaching, the relative rate of which differed on the two channels. In addition, with all Mermaid and Rv-Mermaid constructs, there was a transient rise in fluorescence at the beginning of the records that was most obvious on the red channel (Fig. 1, B and E). These changes were observed in the absence of voltage-clamp pulses and were not systematically cancelled in the  $F_{>560}/F_{500}$  ratio. To correct for them, we used two strategies that gave essentially the same results. The first method consisted of using bracketing records from the same fiber region, taken with no voltage-clamp pulses applied. Corresponding ratios were fitted with either a single exponential plus linear function or with the sum of two exponentials, and the fits were then used to normalize the test records. Alternatively, fits were achieved directly on the test records, using only the portions of traces where no voltage-induced response was present; the result was then extrapolated to the full record duration and used for normalization. Examples of such fits performed directly on the fluorescence traces are shown as insets in Fig. 1 (B and E) and Fig. 2 B.

For detection of fluo-4 FF fluorescence, excitation was at 488 nm, whereas detection was >505 nm. Image processing and analysis was performed using ImageJ (National Institutes of Health) and Microcal Origin (Microcal Software).

#### Fluorescence measurements in nigericin-treated muscle fibers

To test the effect of changes in pH on the FRET signal from SR-targeted Mermaid probes, transfected muscle fibers were treated with nigericin. For this, single isolated muscle fibers expressing the construct of interest were partially embedded into silicone

grease so that they remained well maintained on the bottom of the chamber during the experiment. A thin polyethylene capillary perfusion system operating by gravity was used to change the composition of the extracellular solution in the immediate vicinity of the tested fiber. Fluorescence detection was performed using the *x,y* scanning mode of the microscope with the standard FRET configuration (488-nm excitation and simultaneous detection at 500 and >560 nm). Fibers were bathed in a solution containing (in mM) 140 potassium glutamate, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 5 Na<sub>2</sub>-ATP, 5 HEPES, and 0.01 nigericin adjusted to pH 7.0 or 7.2, and the gravity perfusion system was used to test the effect of solutions of identical composition adjusted to a different pH value.

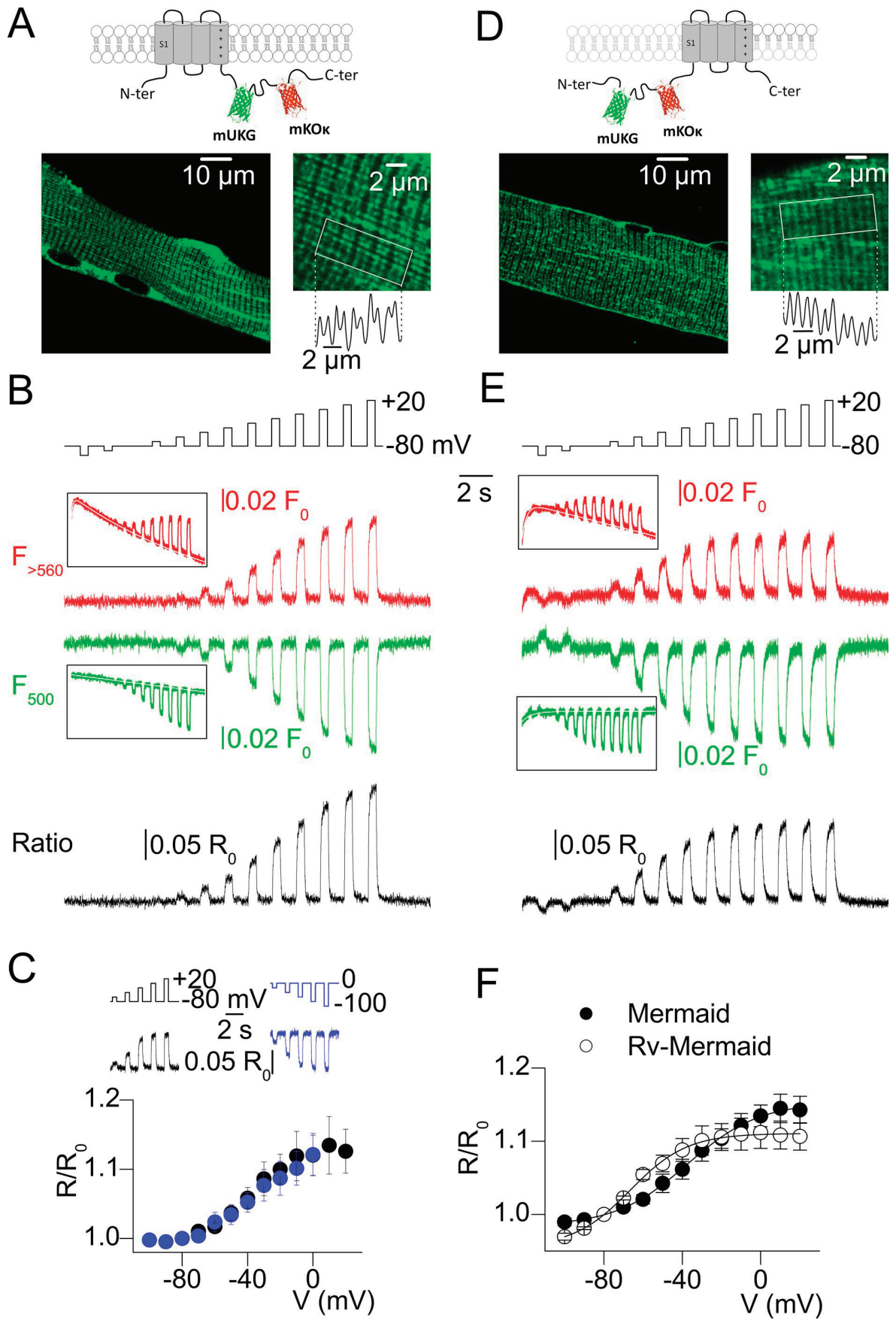
#### Cell culture and immunolabeling

COS-7 and HeLa cells were grown in 4.5 g/l glucose-containing Dulbecco's Modified Eagle Media (Eurobio) supplemented with 10%–15% FCS, 100 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> environment. Cells were seeded on glass coverslips 1 d before transfection and transfected with corresponding plasmids using FuGENE HD (Promega) or Polyfect (Qiagen). Immunolabeling was performed 48–72 h after transfection. Cells were first fixed with 2% paraformaldehyde diluted in PBS supplemented with 300 mM MgCl<sub>2</sub> and 30 mM CaCl<sub>2</sub> (PBS-CaMg) and permeabilized with 0.1% Triton X-100/50 mM glycine in PBS-CaMg. Nonspecific sites were blocked with 1% BSA in PBS-CaMg. Cells were then incubated overnight at 4°C with the following primary monoclonal antibodies diluted in 1% BSA in PBS-CaMg: monoclonal anti-GM130 (clone 35; 1:1,000; BD Transduction), anti-KDEL (10C3; 1:250; Abcam), or polyclonal anti-GRP78 BIP antibody (1:200; Abcam). A second blocking step was performed using normal goat serum 1% in PBS-CaMg. Cells were then incubated with either Hilyte Fluor647-conjugated anti-mouse secondary antibody (Anaspec) or Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluted in 1% normal goat serum in PBS-CaMg (1:500 or 1:1,000, respectively) for 1 h at ambient temperature.

Incubations all took place in a humidified chamber, and cells were extensively washed in PBS-CaMg after each incubation. Immunolabeled samples were mounted in antifading medium (Vectashield; Vector Laboratories; or Dako mounting medium) and examined using a Zeiss LSM 5 Exciter confocal microscope equipped with a 63× oil-immersion objective.

#### Solutions

The extracellular solution used for voltage clamp contained (in mM) 140 TEA-methanesulfonate, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 4-aminopyridine, 10 HEPES, and 0.002 tetrodotoxin. The standard intracellular-like solution contained (in mM) 130 potassium glutamate, 5 Na<sub>2</sub>-ATP, 5 Na<sub>2</sub>-phosphocreatine, 20 mM EGTA, 8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.5 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 5 HEPES. In some experiments, BAPTA was used in place of EGTA at the same concentration (specified in text). Current-clamp experiments were performed in the presence of extracellular Tyrode's solution containing (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES. In some experiments, the extracellular solution contained 50 μM BTS to block contraction. For all experiments with BTS, the intracellular



solution contained neither EGTA nor BAPTA. All solutions were adjusted to pH 7.20.

### Statistics

Least-squares fits were performed using a Marquardt–Levenberg algorithm routine included in Microcal Origin (Originlab). Data values are presented as means  $\pm$  SEM for  $n$  fibers.

### Online supplemental material

Fig. S1 shows the sequence structure of plasma membrane- and SR membrane-targeted Mermaid-derived voltage sensors used in this project. Fig. S2 and Fig. S3 show the subcellular localization of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> and of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> in COS-7 cells, respectively. Fig. S4 illustrates the disappearance and recovery of the FRET signal from T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> upon voltage-dependent inactivation and recovery from inactivation of SR Ca<sup>2+</sup> release, respectively. Fig. S5 shows the response of ER-Mermaid2<sup>-D129E</sup> to t-tubule membrane depolarization. Fig. S6 shows the ER localization of ER-Mermaid2 in COS-7 and HeLa cells.

## Results

### FRET response of Mermaid biosensor to t-tubule membrane voltage changes

To measure changes in membrane voltage, we used fluorescent sensors of the Mermaid family composed of a VSD associated with the two fluorophores mUKG and mKO $\kappa$  as FRET donor and acceptor, respectively (Tsutsui et al., 2008; Fig. S1). Expression of Mermaid in mouse muscle fibers yielded a transverse-banded fluorescence pattern under the form of successive double peaks separated by 2  $\mu$ m (Fig. 1 A), consistent with the protein being present in the triadic region of the fibers. In response to voltage-clamp depolarizing steps from  $-80$  mV, the detected changes in fluorescence (at 500 nm and  $>560$  nm, upon 458-nm excitation) were consistent with voltage-dependent energy transfer between the two fluorophores mUKG and mKO $\kappa$  (Fig. 1 B), providing evidence for localization of Mermaid in the t-tubule membrane of the muscle fibers. Main traces in Fig. 1 B have been corrected from time-dependent changes in fluorescence also observed when no voltage pulse was given. Similar changes

were previously reported for the fluorescent proteins mOrange2 (Shaner et al., 2008) and mNeptune (Chu et al., 2014) and interpreted as resulting from photoactivation before photobleaching. It is thus possible that similar mechanisms operated in our conditions. Raw fluorescence traces and superimposed fits used for the correction are shown in the insets. Details of how fits were generated and corrections performed are described in Materials and methods. In each tested fiber, the resulting depolarization-dependent increase in the FRET ratio  $R/R_0$  ( $R_0$  being the value of the ratio at  $-80$  mV) was adjusted with a Boltzmann function. On average, Mermaid yielded a voltage dependence centered at a mid-value ( $V_{0.5}$ ) of  $-38$  mV (Table 1). Importantly, depolarizing and hyperpolarizing pulses of identical amplitude from  $-80$  and  $0$  mV, respectively, generated symmetrical changes in the FRET ratio, with no sign of shift in the voltage sensitivity (Fig. 1 C). These results establish the efficiency and reliability of membrane voltage detection in isolated muscle fibers using the FRET signal from Mermaid.

### FRET response of Rv-Mermaid: a Mermaid sensor adapted to accommodate the T306 SR targeting sequence

The next step was to express Mermaid fused to an SR-specific sequence. To target the SR membrane, we used a protein domain encompassing the 306 residues (T306) of the N-terminal end of triadin, an archetypal protein of the junctional SR (Rossi et al., 2014). To avoid having the T306 domain fused to mKO $\kappa$ , we constructed reverse-Mermaid (Rv-Mermaid), in which the FRET couple is fused to the S1 segment of the VSD. Fusion of T306 on the S4 segment was then expected to ensure proper topology of the biosensor in the SR membrane (with the FRET couple facing the cytosol) in concurrence with the native topology of the T306 domain (Fig. S1). Rv-Mermaid also yielded an expression pattern consistent with t-tubule localization (Fig. 1 D), and this was confirmed by a FRET response qualitatively similar to that of Mermaid upon changes in membrane voltage (Fig. 1 E). However, Rv-Mermaid yielded a very negative midvoltage ( $V_{0.5} \sim -70$  mV; Fig. 1 F and Table 1), whereas the SR membrane voltage is presumed to be maintained at  $\sim 0$  mV (Somlyo et al., 1981). The variant Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> tested in *Xenopus* oocytes exhibits a midvoltage near  $+10$  mV (H. Tsutsui, personal communication). Thus, to match Rv-Mermaid's

Figure 1. **Detection of t-tubule voltage changes with Mermaid and Rv-Mermaid in muscle fibers.** (A and D) Confocal pattern of the green fluorescence in muscle fibers expressing Mermaid and Rv-Mermaid, respectively. In each panel, the frame and graph on the right show a higher-magnification view together with the longitudinal profile of fluorescence within the white box. Expression of Mermaid and Rv-Mermaid yielded a transverse-banded pattern consistent with the proteins being present in the triadic region of the fibers. A schematic illustration of the structure of the proteins is shown at top. (B and E) Changes in mUKG ( $F_{500}$ , green) and mKO $\kappa$  ( $F_{>560}$ , red) fluorescence and corresponding FRET ratio in response to the voltage-clamp protocol shown at top, from muscle fibers expressing Mermaid and Rv-Mermaid, respectively. In response to the voltage-clamp depolarizing steps from  $-80$  mV, the detected changes in fluorescence (at 500 nm and  $>560$  nm, upon 458-nm excitation) were consistent with voltage-dependent energy transfer between the two fluorophores mUKG and mKO $\kappa$ , providing evidence for localization of Mermaid and Rv-Mermaid in the t-tubule membrane of the muscle fibers. Main traces in B and E have been corrected from time-dependent changes in fluorescence also observed when no voltage pulse was given. Raw fluorescence traces and superimposed fits used for the correction are shown in the insets. Details of how fits were generated and correction performed are described in Materials and methods. (C) Changes in Mermaid FRET ratio in response to depolarizing (left, black trace) and hyperpolarizing (right, blue trace) steps from  $-80$  and  $0$  mV, respectively, in the same fiber. The graph at bottom shows the mean voltage dependence of the change in FRET ratio established from three fibers stimulated with a series of successive voltage-clamp depolarizing steps from  $-80$  mV (black circles) and then with a series of successive hyperpolarizing steps from  $0$  mV (blue circles). FRET ratio values were normalized to the value  $R_0$  at  $-80$  mV. Step hyperpolarizing pulses from  $0$  mV generated symmetrical changes in the FRET ratio, with no detectable sign of shift in the voltage sensitivity. (F) Mean voltage dependence of the FRET response of Mermaid ( $n = 6$ ) and Rv-Mermaid ( $n = 6$ ) established using depolarizing steps from  $-80$  mV. Error bars represent  $\pm$  SEM.

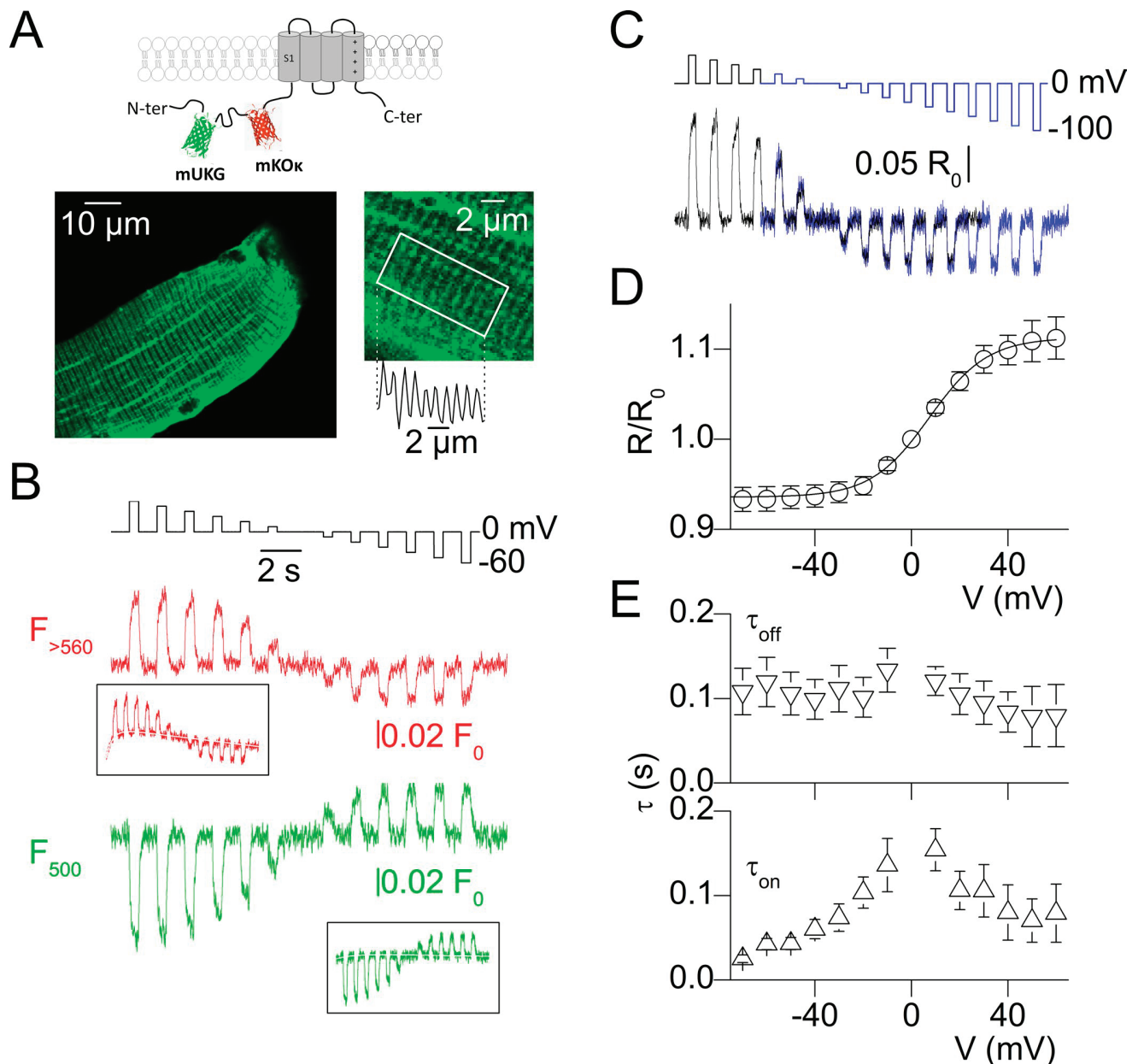


Figure 2. **FRET response of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> to changes in t-tubule membrane voltage applied from 0 mV.** (A) Schematic structure of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> and its confocal triadic pattern in muscle fibers. (B) Changes in mUKG ( $F_{500}$ , green) and mKOκ ( $F_{>560}$ , red) fluorescence in response to the indicated voltage protocol. Insets show the corresponding raw records before correction for voltage-independent changes in fluorescence; the fit used for correction is shown in white. (C) Changes in the FRET ratio ( $F_{>560}/F_{500}$ ) elicited in response to the pulse protocols shown at top. The black trace was from the fluorescent responses shown in B. (D) Mean voltage dependence of the FRET response measured with voltage pulses from 0 mV ( $n = 6$ ). FRET ratio values were normalized to the value at 0 mV ( $R_0$ ). (E) Mean voltage dependence of the time constant of change in FRET ratio at the onset ( $\tau_{on}$ ) and offset ( $\tau_{off}$ ) of the pulses. Error bars represent  $\pm$  SEM.

$V_{0.5}$  with the resting SR voltage, we designed and expressed Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>; this construct also exhibited a triadic localization (Fig. 2 A) and had a voltage sensitivity centered at +5 mV, as established from FRET responses to voltage-clamp pulses applied from 0 mV (Fig. 2, B-D; and Table 1). The rate of change in FRET ratio at the onset and offset of the pulses was approximated by a single exponential function: the “on” time constant yielded a bell-shaped voltage dependence with a maximum value of ~150 ms at +10 mV and a minimum value near

~25 ms, whereas the “off” time constant was rather independent from the pulse voltage (Fig. 2 E).

#### Evidence for mixed subcellular localization of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>

Interestingly, the FRET response from fibers expressing Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> to depolarizing pulses applied from -80 mV qualitatively differed from that of Mermaid and Rv-Mermaid (Fig. 3). Indeed, depolarizing pulses to values ranging between -40 and



Table 1. Mean values for the parameters obtained from fitting a Boltzmann function to the FRET ratio ( $R/R_0$ ) versus voltage data obtained with the different Mermaid constructs

Main subcellular distribution	Mermaid T-tubule (and SR?)	Rv-Mermaid T-tubule (and SR?)	Rv-Mermaid <sup>D129E/Y235R</sup> T-tubule and SR <sup>a</sup>	T306-Rv-Mermaid Junctional SR	T306-Rv-Mermaid <sup>D129E/Y235R</sup> Junctional SR
<i>n</i>	6	6	6	6	13
Max	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	-0.075 ± 0.01	-0.06 ± 0.01
Min	0.99 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.93 ± 0.01	1	1
$V_{0.5}$ (mV)	-37.7 ± 7.1	-69.0 ± 4.1	5.45 ± 3.4	-26.4 ± 1.2	-26.2 ± 1.9
<i>k</i> (mV)	14.1 ± 0.46	14.9 ± 1.1	11.4 ± 0.5	5.5 ± 0.9	2.8 ± 0.9

Individual sets of data points from each fiber were fitted with the following expression:  $\text{Max}/\{1 + \exp[(V_{0.5} - V)/k]\} + \text{Min}$ . Data are mean ± SEM. <sup>a</sup>The voltage dependence was established from signals elicited by pulses from 0 mV.

-20 mV generated negative changes in FRET ratio (Fig. 3, A and B), whereas for more depolarized step levels, an additional component, similar to what was observed with Mermaid and Rv-Mermaid (Fig. 1), was present. Fig. 3 C shows the voltage dependence of the FRET ratio measured in six fibers, at the time of the end of each pulse during the protocol. There was variability, with some fibers exhibiting a very prominent negative change in FRET ratio at intermediate voltages (e.g., Fig. 3 C, triangles), whereas other ones had much less. We hypothesized that these complex responses resulted from two populations of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>: one in the plasma/t-tubule membrane and the other in a distinct membrane compartment experiencing a distinct voltage change. Assuming that only the t-tubule population would respond to a voltage-clamp hyperpolarization, adding the FRET signal elicited by a pulse from -80 to 0 mV to the one elicited by a pulse from 0 to -80 mV unmasks the pure contribution of the non-t-tubule population (Fig. 3 D). Interestingly, when expressed in COS-7 cells, Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> appeared to localize both in the plasma membrane and, to some extent, in the ER. This is illustrated in Fig. S2, which shows the results of immunolabeling experiments using antibodies directed against either a Golgi or an ER marker protein. The depolarization-induced negative FRET signal in the muscle fibers may thus originate from the SR membrane.

#### FRET response of SR-targeted Mermaid biosensors to t-tubule membrane voltage changes

Mermaid biosensors fused to the T306 sequence were anticipated to specifically reveal electrical activity of the SR membrane during muscle fiber activation. In contrast with the other constructs tested in the present study that yielded a general distribution throughout the muscle fibers, the ones carrying the T306 targeting sequence exhibited a patchy expression pattern, with only one or a few localized spots of fluorescence, each in the vicinity of a nucleus. An example from a fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> is shown in Fig. 4 A. This is reminiscent of what occurs when expressing RYR1 channels in the same model (Lefebvre et al., 2011). In addition, the fluorescence within the spots exhibited a typical triadic pattern, suggesting that we did succeed in targeting the junctional SR membrane with the T306 domain. This was confirmed by the ER localization of the construct using immunolabeling experiments in transfected COS-7

cells (Fig. S3). We cannot exclude that in the muscle fibers, some of the T306-fused Mermaid probes distributed to some extent in the nonjunctional SR membrane. However, considering the above expression features and the fact that use of a nonjunctional targeting sequence provided a very different expression pattern (see Fig. S5, A and D), we believe it is reasonable to assume that most of the T306-fused probes did reside in the junctional SR membrane. In muscle fibers, the FRET response of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> to voltage-clamp pulses was unique, as it had no sign, whatsoever, of a t-tubule contribution. In response to depolarizing pulses from -80 mV, the FRET ratio experienced only a decrease during the pulses. The amplitude of this drop increased with the t-tubule depolarization, with a voltage-dependence centered near -25 mV (Fig. 4, B and C; and Table 1). The time constant of onset of the signal decreased with the amplitude of depolarization within a 230–60-ms range, whereas the “off” time constant was voltage independent (Fig. 4 D). Because the construct was designed to have a membrane topology with the FRET couple facing the cytosol, the simplest interpretation is that this FRET signal corresponds to a negative polarization of the cytosolic face of the SR membrane with respect to the lumen. Assuming that the resting SR membrane voltage is 0 mV and that the sensor response is identical in the t-tubule membrane (Fig. 2 D) and in the SR membrane, then the maximum change in FRET ratio (6%; Fig. 4 C) would be consistent with an SR voltage change of at least 20 mV. Further evidence that the FRET response from T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> to voltage-clamp depolarizing pulses is intimately linked to EC coupling is provided in Fig. S4, which shows that the FRET signal progressively collapses during a protocol of successive depolarizing pulses (Fig. S4 A), in concurrence with Ca<sup>2+</sup> release. This occurs under these conditions because of voltage-dependent inactivation of EC coupling (Hodgkin and Horowitz, 1960). In response to hyperpolarizing pulses from 0 mV, T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> also produces a small FRET response (Fig. S4 B), the onset of which coincides with t-tubule membrane repolarization to 0 mV and the amplitude of which increases as the hyperpolarization is made longer (Fig. S4 C), consistent with the FRET response being triggered upon recovery of EC coupling from inactivation.

To confirm that the change in fluorescence detected by T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> upon EC coupling activation did result

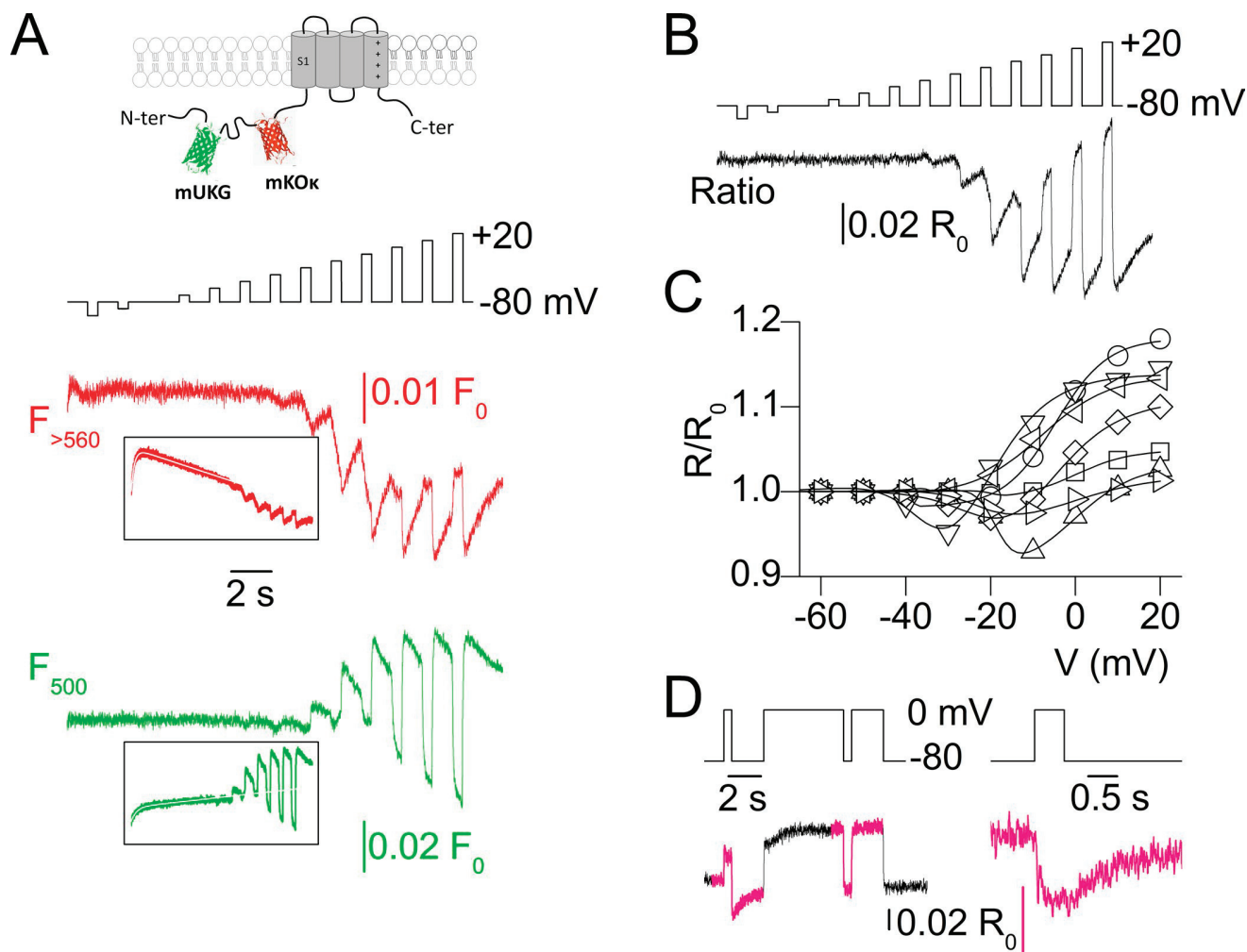
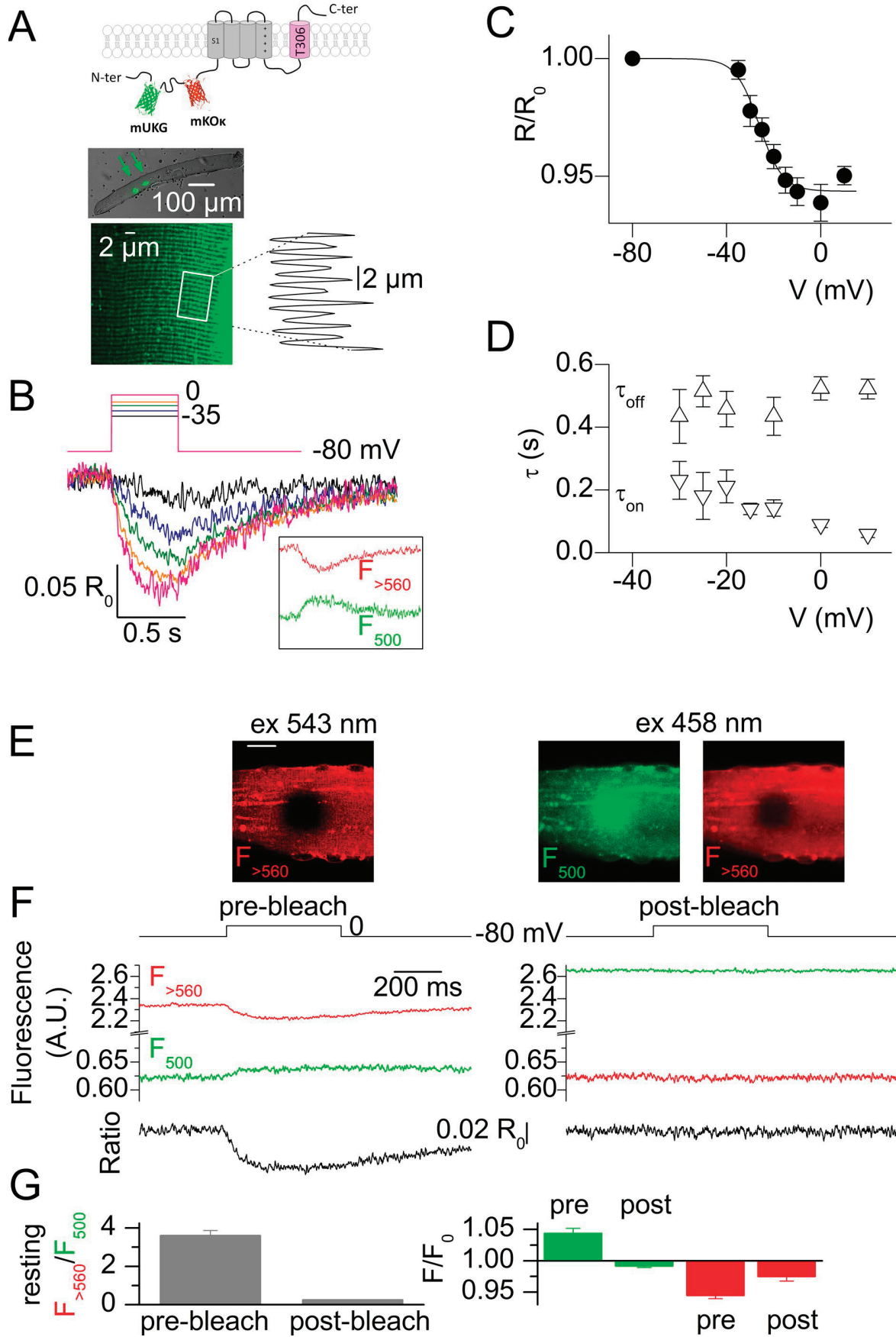


Figure 3. **Complex response of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> to t-tubule membrane depolarization from -80 mV.** (A) Schematic structure of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> and the changes in mUKG and mKOκ fluorescence in response to the indicated voltage-clamp pulse protocol. Insets show the corresponding raw records before correction for voltage-independent changes in fluorescence; the fit used for correction is shown in white. (B) FRET ratio calculated from the fluorescent traces shown in A. (C) Voltage dependence of the end-pulse FRET ratio measured in response to the pulse protocol shown in A and B. Datasets are from seven muscle fibers, six of which were the ones used to generate mean values shown in Fig. 2 D. (D) Asymmetrical response to a depolarization from -80 mV compared with a hyperpolarization from 0 mV. Left: The FRET ratio (bottom trace) was measured in response to the pulse protocol shown at top. The pink portions of traces were synchronized and summed to produce the pink trace on the right.

from a change in FRET, we performed acceptor photobleaching experiments. The protocol was first tested on the resting fluorescence from fibers expressing a non-SR-targeted Mermaid construct. Fig. 4 E shows *x,y* fluorescence frames from a muscle fiber expressing Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. A square region in the middle of the fiber was scanned during several minutes at 543 nm with high laser power until substantial bleaching occurred (Fig. 4 E, left). As expected, upon subsequent excitation at 458 nm in FRET detection configuration, extinction of the acceptor fluorescence was accompanied by dequenching of the donor in the photobleached region (Fig. 4 E, right). Fig. 4 F illustrates the effect of acceptor photobleaching on the changes in fluorescence detected in response to a 0.5-s-long depolarizing pulse from -80 to 0 mV in FRET configuration (458-nm excitation) from a fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>; traces on the left and right were recorded before and after photobleaching

with 543-nm light, respectively. Again, photobleaching induced an increase and decrease in the resting donor and acceptor fluorescence, respectively, and this was accompanied by a loss of the transient changes in fluorescence triggered by the pulse and of the corresponding change in FRET ratio. Fig. 4 G shows mean values for the resting fluorescence ratio (left) and the relative changes in F<sub>500</sub> and F<sub>>560</sub> fluorescence triggered by a strong depolarizing pulse, from five fibers expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> and tested under the same conditions as described in Fig. 4 F. The photobleaching-induced loss of pulse-triggered changes in fluorescence establishes that these changes (and the corresponding change in ratio), result from FRET.

In an attempt to confirm the occurrence of an SR membrane-specific voltage-dependent FRET signal, we tested an alternative SR-targeted probe, ER-Mermaid<sup>2D129E</sup>, which makes use of a CFP-YFP FRET pair and of an arginine-based targeting sequence (ER;



Sharma et al., 2010) expected to allow expression throughout the entire SR membrane. ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> indeed exhibited a fluorescence pattern consistent with widespread expression in the SR membrane (Fig. S5, A and D; and Fig. S6). More specifically, ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> exhibited a transverse striated pattern, but in contrast to the other constructs, the longitudinal fluorescence profile was composed of successive “single” bands separated by 2  $\mu\text{m}$  (Fig. S5 D, green trace on the right corresponding to the fluorescence profile along the white box). Imaging of the t-tubule network with di-8-aneppps (Fig. S5 D, red image and corresponding longitudinal profile along the same white box) indicated that the protein was concentrated around the Z line, consistent with the standard expression pattern of nonjunctional SR proteins (Sorrentino, 2011). However, ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> responded to voltage-clamp steps from 0 mV (Fig. S5, B and C), demonstrating presence in the t-tubule membrane, and thus indicating that the ER signal was not as strong as T306 to ensure exclusive SR localization. Although, in response to depolarizing pulses from  $-80$  mV, ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> responded by a mixed signal (Fig. S5, E and F) similar to that observed with Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (Fig. 3), thus consistent with a response from probe molecules in the SR membrane, the nonstrict SR membrane targeting of ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> was very limiting and we thus did not pursue investigations with this probe.

#### T306-Rv-Mermaid provides a FRET response similar to that of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> despite its distinct range of voltage sensitivity

To further characterize the SR membrane-confined FRET change detected by Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> upon  $\text{Ca}^{2+}$  release activation, we also tested the response of T306-Rv-Mermaid. Because the voltage sensitivity of Rv-Mermaid is centered near a much more negative value than that of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (Figs. 1 and 2), very distant from the presumed resting SR membrane voltage, we expected a much reduced FRET response, if any. Fig. 5 A shows that T306-Rv-Mermaid exhibited a patchy expression pattern similar to the one of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. However, in response to depolarizing pulses from  $-80$  mV, the FRET ratio also experienced a voltage-dependent decrease during the pulses, the amplitude and voltage dependence of which were very similar to those of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (Fig. 5, B and C; and Table 1). Considering the distinct range of sensitivity to voltage of the two probes, this result was unexpected.

#### pH sensitivity of the FRET signal from Mermaid biosensors

The similarity between the FRET response of T306-Rv-Mermaid and T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> makes it questionable whether this signal actually witnesses a change in SR membrane voltage. Because our standard experimental conditions make use of a large concentration of EGTA inside the muscle fibers to block contraction, a slight change in cytosolic pH is expected during  $\text{Ca}^{2+}$  release, because  $\text{Ca}^{2+}$  binding to EGTA releases protons. Although the Mermaid fluorescent proteins were initially designed to be pH resistant (Tsutsui et al., 2008), we tested whether a change in pH could affect the FRET signal using muscle fibers treated with the  $\text{H}^+$  ionophore nigericin. Under these conditions, we found that the FRET signal from T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> was very sensitive to pH. This is illustrated in Fig. 6 A, which shows fluorescence levels and the corresponding FRET ratio from an intact fiber challenged by successive changes in pH in the 6–7.5 range. Fig. 6 B shows values for the change in FRET ratio experienced by five nigericin-treated muscle fibers expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, upon various changes in pH. The FRET ratio was expressed either as  $R/R_{\text{pH}7}$  or  $R/R_{\text{pH}7.2}$ . Results clearly establish the sensitivity to pH of the FRET signal.

#### FRET response of SR-targeted Mermaid biosensors to t-tubule membrane voltage changes under conditions limiting cytosolic changes in pH

To circumvent the pH change caused by  $\text{Ca}^{2+}$  binding to EGTA, we performed experiments in the presence of BAPTA instead, which exhibits much less pH sensitivity (Tsien, 1980). Under these conditions, hardly any change in the T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> FRET signal could be detected after depolarizing pulses. This is illustrated in Fig. 7 A, which shows a family of FRET ratio traces collected while applying 0.5-s-long depolarizing pulses between  $-30$  and  $+10$  mV. Loss of the negative FRET signal was not caused by suppression of  $\text{Ca}^{2+}$  release, as fibers equilibrated with BAPTA still yielded robust voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  transients, though of smaller amplitude than in the presence of EGTA. For instance, a 500-ms-long voltage-clamp depolarization applied to seven fibers equilibrated with EGTA and four fibers equilibrated with BAPTA triggered a rhod-2  $\text{Ca}^{2+}$  transient of mean initial peak  $F/F_0$  amplitude of  $3.5 \pm 0.4$  and  $1.7 \pm 0.2$ , respectively (Fig. 7 B). In Fig. 7 A, the trace shown in the inset corresponds to the mean response to 6–10 0.5-s-long pulses to voltages ranging between  $+10$  and  $+40$  mV from four fibers expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>; traces from each fiber were averaged, and the

Figure 4. **FRET response of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> during  $\text{Ca}^{2+}$  release.** (A) Patchy expression (regions pointed by green arrows) and triadic confocal pattern (bottom image and associated graph showing the longitudinal fluorescence profile along the white box) of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> in muscle fibers. Schematic structure of the protein is shown at top. (B) Changes in T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> FRET ratio in response to the indicated voltage-clamp depolarizing pulses. Inset shows the fluorescent traces in response to the pulse from  $-80$  to  $-10$  mV. (C) Mean voltage dependence of the peak amplitude of the drop in FRET ratio measured in response to single 0.5-s-long pulses from  $-80$  mV. For this, successive single depolarizing pulses of increasing amplitude were applied, separated by a time interval of 30 s. Data points are mean values from several fibers ranging from a minimum of seven and a maximum of 13. (D) Mean voltage dependence of the time constant of change in FRET ratio at the onset ( $\tau_{\text{on}}$ ) of the depolarizing pulses and upon return ( $\tau_{\text{off}}$ ) to the holding value of  $-80$  mV. (E) Acceptor photobleaching of the resting fluorescence from a fiber expressing Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>;  $x, y$  fluorescence frames after photobleaching of a square region in the middle of the fiber with excitation light at 543 nm. Bar, 20  $\mu\text{m}$ . (F) Effect of acceptor photobleaching (postbleach) on the changes in fluorescence detected in response to a depolarizing pulse from  $-80$  to 0 mV in FRET configuration (458-nm excitation) from a fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. (G) Mean values for the resting fluorescence ratio (left) and the relative changes in  $F_{500}$  and  $F_{560}$  fluorescence (right) triggered by a strong depolarizing pulse, from five fibers expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. Error bars represent  $\pm$  SEM.

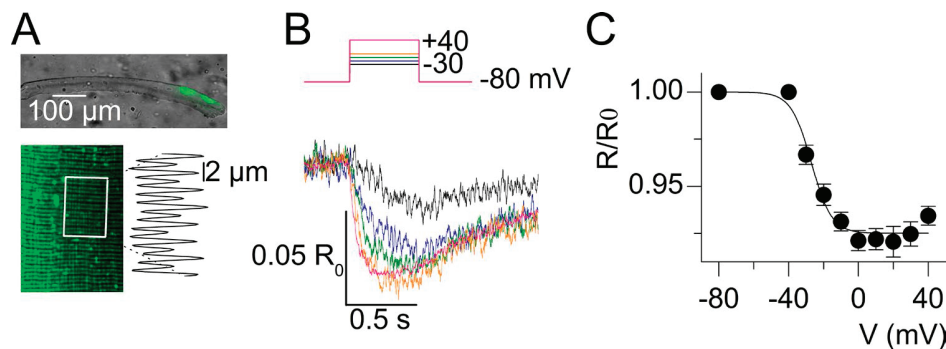


Figure 5. **FRET response of T306-Rv-Mermaid during  $\text{Ca}^{2+}$  release.** (A) Patchy expression and triadic confocal pattern (bottom image and associated trace showing the longitudinal fluorescence profile along the white box) of T306-Rv-Mermaid in muscle fibers. (B) Changes in T306-Rv-Mermaid FRET ratio in response to the indicated voltage-clamp depolarizing pulses. (C) Mean voltage dependence of the peak amplitude of the drop in FRET ratio measured in response to single 0.5-s-long pulses from  $-80$  mV. For this, successive single depolarizing pulses of increasing amplitude were applied, separated by a time interval of 30 s. Data points are mean values from six fibers. Error bars represent  $\pm$  SEM.

mean was calculated from the four mean traces. This revealed a slight positive change in the ratio that did not exceed  $0.015 R_0$ . According to the calibrated FRET response in Fig. 2 D, this could correspond to a  $<10$  mV depolarization. Alternatively, according to the fit shown in Fig. 6 B, it could correspond to an alkalization of  $\sim 0.06$  pH units. We also attempted to measure the FRET response in the absence of exogenous intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  buffer, using the contraction blocker BTS in the extracellular medium. However, under our standard conditions of stimulation with hundreds of milliseconds-long voltage-clamp pulses, BTS never completely eliminated contraction, precluding measurements in response to large pulses that maximally activate  $\text{Ca}^{2+}$  release. Still, measurements in response to 0.5-s-long pulses up to  $-25$  or  $-20$  mV never elicited any negative FRET response. Instead, a slight positive change in the ratio was observed, as illustrated in Fig. 7 C, which shows FRET ratio traces from a fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> challenged by pulses up to  $-20$  mV

in the presence of BTS. Under these conditions, data from three fibers gave a mean change in FRET ratio of  $0.03 \pm 0.002 R_0$ . In our hands, BTS proved much more effective to block contraction triggered by trains of action potentials. We thus took measurements of FRET signals from T306-Rv-Mermaid constructs in such conditions. The response of two distinct fibers expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> to a train of action potentials is shown in Fig. 7 (D and E); in Fig. 7 D, the fiber was equilibrated with our standard EGTA-containing solution in the voltage-clamp pipette, whereas in Fig. 7 E, no EGTA was used inside the pipette, but BTS was present in the extracellular solution. Results further confirm the EGTA dependence of the negative FRET signal upon EC coupling activation and the presence of a small FRET signal of opposite direction in the absence of EGTA. Fig. 7 F illustrates the fact that, in the absence of EGTA (and presence of BTS), T306-Rv-Mermaid also responded by a positive change in FRET of amplitude similar to the one observed with T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>,

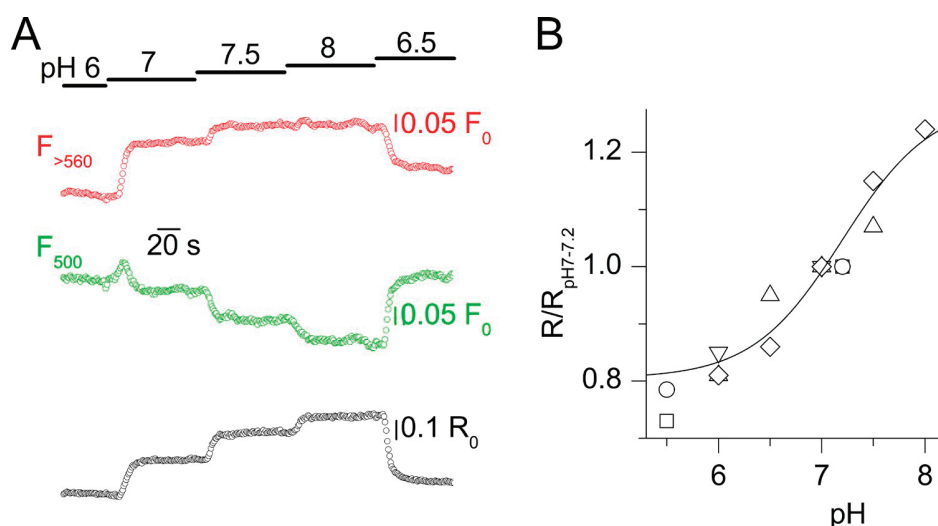
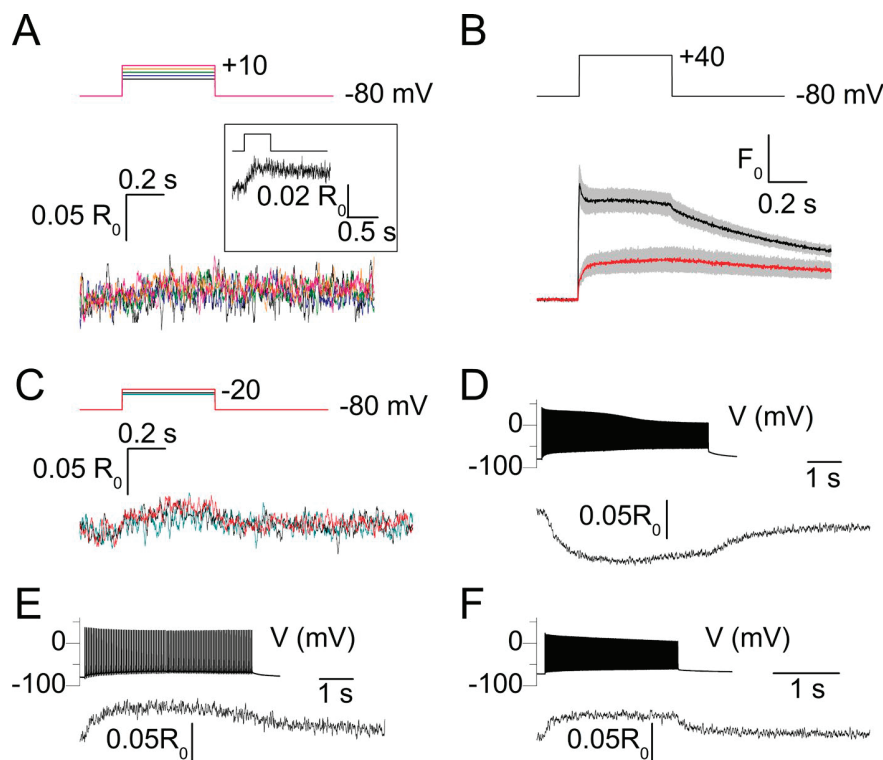


Figure 6. **pH sensitivity of the FRET response from T306-Rv-Mermaid during  $\text{Ca}^{2+}$  release.** (A) Changes in fluorescence and in the corresponding FRET ratio in response to extracellular changes in pH in the presence of nigericin, in a muscle fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. (B) Change in FRET ratio from five nigericin-treated muscle fibers expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, upon changes in pH. Each symbol corresponds to a different fiber. The continuous line shows the result from fitting a Hill equation to the data shown as triangles, inverted triangles, and diamonds.



**Figure 7. FRET response of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> and T306-Rv-Mermaid during Ca<sup>2+</sup> release in the absence of intracellular EGTA.** (A) FRET response to 0.5-s-long voltage-clamp depolarizing pulses to values ranging between  $-30$  and  $+10$  mV from a muscle fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, equilibrated in the presence of intracellular BAPTA. The inset shows the mean response from four fibers to large depolarizing pulses in the same condition (see text for details). Successive single depolarizing pulses were separated by a time interval of 30 s. (B) Mean rhod-2 cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient elicited by a depolarizing pulse from  $-80$  to  $+40$  mV in seven fibers equilibrated with intracellular EGTA (black trace) and four fibers equilibrated with intracellular BAPTA (red trace). Gray shading corresponds to SEM. (C) FRET response to 0.5-s-long depolarizing voltage-clamp pulses to  $-35$ ,  $-30$ , and  $-20$  mV from a muscle fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> in the presence of extracellular BTS. Successive single depolarizing pulses were separated by 30 s. (D) FRET response of a muscle fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, equilibrated with intracellular EGTA, to a train of action potentials generated at 100 Hz. (E) FRET response of a muscle fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, equilibrated without intracellular EGTA and in the presence of extracellular BTS, to a train of action potentials generated at 20 Hz. (F) FRET response of a fiber expressing T306-Rv-Mermaid, equilibrated without intracellular EGTA and in the presence of extracellular BTS, to a train of action potentials at 100 Hz.

which, considering the very different midvoltage sensitivities of the two probes, tends to exclude that this signal corresponds to an SR membrane voltage change.

## Discussion

The question of whether the membrane of the reticulum experiences voltage changes during cellular activity was experimentally addressed more than 30 yr ago in isolated frog muscle fibers, through detection of optical retardation signals and through the use of potentiometric dyes (Baylor and Oetliker, 1975, 1977; Vergara et al., 1978; Kovács et al., 1983; Baylor et al., 1984). However, these studies did not lead to coherent results, and no further attempt was made. In the same period, results from electron probe x-ray microanalysis of ion distribution and movements across the SR membrane established the currently admitted view, according to which there is no large voltage gradient across the SR membrane at rest or during Ca<sup>2+</sup> release (Somlyo et al., 1977, 1981, 1985). This view was corroborated by the identification and characterization of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in the SR membrane that could participate to the counter-Ca<sup>2+</sup> release current necessary to maintain the SR membrane voltage clamped near its resting value during Ca<sup>2+</sup> release (Labarca and Miller, 1981; Rousseau et al., 1988; Abramcheck and Best, 1989; Wang and Best, 1994; Kourie et al., 1996; Yazawa et al., 2007). Conversely, it was also proposed that need for these channels may be limited, as the

open RYR could itself carry most of the necessary counter-current (Gillespie and Fill, 2008; Guo et al., 2013). In this context, the now-available option of targeting a genetically engineered voltage-sensitive fluorescent tool to the SR membrane offered a unique opportunity to experimentally settle this point.

### Mermaid biosensors in the SR membrane are sensitive to cytosolic acidification induced upon Ca<sup>2+</sup> binding to EGTA

In the present conditions, Mermaid constructs devoid of SR targeting sequence were present in the plasma/t-tubule membrane of the transfected muscle fibers, allowing quantitative characterization of the properties of the voltage-induced changes in FRET. Use of the T306 sequence then proved successful to target the constructs to the junctional SR membrane, as no more plasma/t-tubule membrane-related FRET change was detected in fibers expressing the T306 constructs. Under these conditions, use of Rv-Mermaid and Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, yielding distinct voltage sensitivity (centered near  $-70$  and  $0$  mV, respectively), was anticipated to allow differentiation of any EC-coupling activated FRET signal caused by an actual change in SR membrane voltage from a change in any other parameter that could affect FRET. Indeed, the two constructs should provide a response of very different amplitude to a given voltage change, if voltage were the only parameter affecting FRET. This was obviously not the case: both constructs provided very similar responses in the different conditions tested. In the presence of intracellular EGTA,

they responded by a change in FRET consistent with sensitivity of the probes to acidification of the cytosolic face of the SR membrane. Because the response was very similar for the two probes, pH sensitivity was not a consequence of the mutations. A cytosolic pH change has been well documented in frog muscle fibers loaded with EGTA, where it was used to measure and quantify the EC coupling-activated cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients using the EGTA-phenol red method (Pape et al., 1995, 1998, 2002; Pizarro and Ríos, 2004). Under conditions of voltage-clamp stimulation similar to the ones used here, Pizarro and Ríos (2004) reported maximum cytosolic levels of increase in  $[\text{H}^+]$  of 0.2–0.3  $\mu\text{M}$ , which would translate into a change of 0.6–0.8 pH units. According to our calibration in nigericin-treated fibers (Fig. 6), the maximum decrease in FRET ratio (6%, Fig. 4) evoked by a large depolarizing pulse in fibers expressing Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> would correspond to a change in pH from 7.2 to 6.97. One interesting point is that no sign of cytosolic acidification was detected with the non-SR-targeted Mermaid constructs (assuming that the mixed response of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> was caused by its mixed plasma/SR membrane localization). Yet, in both the plasma membrane and the SR membrane, the topology of the probe proteins yields the FRET pair facing the cytosol, this concurring with the native topology of the T306 domain for the SR-targeted forms. Then, absence of “pH response” of the probes residing in the plasma/t-tubule membrane has to indicate that the pH change detected in the vicinity of the SR membrane spared the cytosolic face of the t-tubule membrane. This is somewhat inconsistent with calculations by Pape et al. (1995), which suggest that, in the presence of a large concentration of intracellular EGTA, changes in  $[\text{H}^+]$  remain substantial hundreds of nanometers away from a single  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing site and that even in the case of  $\text{Ca}^{2+}$  release from many release channels, a substantial  $[\text{H}^+]$  gradient near the  $\text{Ca}^{2+}$  release sites is unlikely. In contrast, our results suggest that a change in cytosolic pH can be detected by probes in the junctional SR membrane but not by probes in the t-tubule membrane. Because, in fast-twitch muscle fibers, the majority of the t-tubule network is involved in junctional contact with the SR (Franzini-Armstrong et al., 1988), most of the Mermaid probes in the t-tubule membrane should reside less than 20 nm (Felder et al., 2002) away from the  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. Thus, they would be expected to sense as well the pH changes caused by  $\text{H}^+$  release from EGTA. At present, we do not have a clear explanation for this inconsistency. An alternative explanation could be that the FRET response to voltage-clamp depolarizing pulses of Mermaid and Rv-Mermaid in the t-tubule membrane was, to some extent, corrupted by a pH-dependent component that remained masked by the voltage-dependent component, because of the negative voltage sensitivity of these two probes. This is unlikely, however; given the substantial amplitude of the acidification-induced FRET change and the fact that its off time constant (Fig. 4 D) is  $\sim 5$  times slower than the off time constant of the signal from probes in the t-tubule membrane (Fig. 2 E), a pH-dependent component of the FRET signal in the t-tubule membrane would have strongly contaminated the voltage-dependent FRET signal from Mermaid and Rv-Mermaid. Furthermore, the symmetrical FRET response of Mermaid to depolarizing and hyperpolarizing pulses of identical amplitude (Fig. 1 C) also argues against this possibility. It may

be speculated that the negative FRET response of SR-targeted Mermaid probes is caused by  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the FRET signal. However, that this response was not present in the absence of EGTA strongly argues against this possibility, because in that condition, if changed, the  $\text{Ca}^{2+}$  transient should be larger than in the presence of EGTA. Altogether, our results indicate difficulties in using Mermaid probes as local voltage detectors where robust and rapid changes in pH take place. However, they also point out the reliability of the T306 target signal to convey a signal that is restricted to the intimate cytosolic environment of the SR membrane.

#### No evidence for an SR voltage change during muscle fiber activation under conditions limiting cytosolic changes in pH

In the absence of intracellular EGTA (either replaced by BAPTA or in the presence of the contraction blocker BTS), there was no sign of negative change in FRET ratio from T306-Rv-Mermaid constructs during activation of  $\text{Ca}^{2+}$  release. Upon  $\text{Ca}^{2+}$  binding, BAPTA releases much fewer protons than EGTA (Fénelon and Pape, 2002), which thus further supports the pH nature of the negative FRET signal observed in the presence of EGTA. However, BAPTA yields substantially higher affinity and faster kinetics than EGTA (Pape et al., 2002; Sztretye et al., 2011). Thus, corresponding disappearance of the negative FRET signal (Fig. 7 A) may be speculated to result from circumvention of a positive feedback of the released  $\text{Ca}^{2+}$  ions on either  $\text{Ca}^{2+}$  release activity itself or on other  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent channels implicated in SR membrane voltage control (e.g., Pitt et al., 2010). Alternatively, large concentrations of BAPTA may also be suspected to have a deleterious pharmacological effect on  $\text{Ca}^{2+}$  release (Pape et al., 2002), which could also contribute to attenuate the negative FRET signal. The fact that robust  $\text{Ca}^{2+}$  transients were still elicited in the presence of BAPTA indicates that disappearance of the negative FRET signal did not result from failing SR  $\text{Ca}^{2+}$  release. Furthermore, the fact that experiments in the presence of BTS also showed no sign of negative FRET signal from the SR membrane-targeted probes tends to definitely eliminate the option that this signal witnesses an SR membrane voltage change.

Instead, in the absence of EGTA, both the native and the D129E/Y235R form of T306-Rv-Mermaid responded by a small increase in the FRET ratio that, again, can hardly be thought to result from an SR membrane voltage change, considering the differing midvoltage sensitivity of the two probes. The mean change in FRET ratio recorded in response to a voltage-clamp pulse to  $-20$  mV was  $\sim 0.03 R_0$ , and a response of similar amplitude was recorded in response to a train of action potentials (Fig. 7 E). According to the pH dependence of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (Fig. 6), this change would correspond to a cytosolic alkalization from 7.2 to 7.31. A small alkalization of the cytosol was previously reported to occur in conjunction with  $\text{Ca}^{2+}$  release in frog muscle fibers, consistent with a proton flux from the cytosol into the SR (Baylor et al., 1982; Hollingworth and Baylor, 1990; Pape et al., 1990). It is thus possible that in our conditions, in the absence of intracellular EGTA, the FRET response of T306-Rv-Mermaid constructs reveals the same process.

In conclusion, voltage-sensitive Mermaid probes targeted to the SR membrane of intact muscle fibers exhibit changes in

FRET upon activation of Ca<sup>2+</sup> release that most likely report local changes in pH occurring in the vicinity of the SR membrane during the process. Results provide no evidence for additional FRET changes that would be caused by a substantial variation of SR membrane voltage during muscle EC coupling.

## Acknowledgments

We are indebted to Vincenzo Sorrentino for suggesting the use of the T306 triadin domain and for providing a corresponding plasmid DNA to make the constructs. We are grateful to Thomas Hilaire for his contribution to the cell culture and immunostaining experiments.

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Université Claude Bernard Lyon 1 to the Institut NeuroMyoGène. This work was also supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon: Alliance MyoNeurALP program; project 2.3.1.3 to V. Jacquemond).

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: C. Sanchez, C. Berthier, J. Perrot, C. Bouvard, H. Tsutsui, and Y. Okamura designed and/or prepared the plasmid constructs. C. Sanchez, C. Bouvard, and V. Jacquemond conducted the electrophysiological and fluorescence measurements on muscle fibers and performed the related analysis. C. Berthier, J. Perrot, and H. Tsutsui performed the cell culture and immunostaining experiments. All authors contributed to data analysis and interpretation and to manuscript preparation. Y. Okamura, C. Berthier, and V. Jacquemond conceived and coordinated the study, designed the experiments and wrote the manuscript.

Eduardo Ríos served as editor.

Submitted: 2 March 2018

Accepted: 16 May 2018

## References

- Abramcheck, C.W., and P.M. Best. 1989. Physiological role and selectivity of the in situ potassium channel of the sarcoplasmic reticulum in skinned frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 93:1–21. <https://doi.org/10.1085/jgp.93.1.1>
- Armstrong, C.M., and B. Hille. 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron*. 20:371–380. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80981-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80981-2)
- Baylor, S.M., and H. Oetliker. 1975. Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum. *Nature*. 253:97–101. <https://doi.org/10.1038/253097a0>
- Baylor, S.M., and H. Oetliker. 1977. Birefringence signals from surface and t-system membranes of frog single muscle fibres. *J. Physiol.* 264:199–213. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011663>
- Baylor, S.M., W.K. Chandler, and M.W. Marshall. 1982. Optical measurements of intracellular pH and magnesium in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 331:105–137. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014367>
- Baylor, S.M., W.K. Chandler, and M.W. Marshall. 1984. Calcium release and sarcoplasmic reticulum membrane potential in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 348:209–238. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015106>
- Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361:315–325. <https://doi.org/10.1038/361315a0>
- Bertrán, G.C., C. D'Alessio, and B.A. Kotsias. 1995. [Ion channels in nonexcitable cells]. *Medicina (B. Aires)*. 55:449–456.
- Chu, J., R.D. Haynes, S.Y. Corbel, P. Li, E. González-González, J.S. Burg, N.J. Ataie, A.J. Lam, P.J. Cranfill, M.A. Baird, et al. 2014. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat. Methods*. 11:572–578. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2888>
- Felder, E., F. Protasi, R. Hirsch, C. Franzini-Armstrong, and P.D. Allen. 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)
- Fénelon, K., and P.C. Pape. 2002. Recruitment of Ca(2+) release channels by calcium-induced Ca(2+) release does not appear to occur in isolated Ca(2+) release sites in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* 544:777–791. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.026658>
- Fink, R.H., and C. Veigel. 1996. Calcium uptake and release modulated by counter-ion conductances in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 156:387–396. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1996.212000.x>
- Franzini-Armstrong, C., D.G. Ferguson, and C. Champ. 1988. Discrimination between fast- and slow-twitch fibres of guinea pig skeletal muscle using the relative surface density of junctional transverse tubule membrane. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 9:403–414. <https://doi.org/10.1007/BF01774067>
- Gillespie, D., and M. Fill. 2008. Intracellular calcium release channels mediate their own countercurrent: The ryanodine receptor case study. *Biophys. J.* 95:3706–3714. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131987>
- Guo, T., A. Nani, S. Shonts, M. Perryman, H. Chen, T. Shannon, D. Gillespie, and M. Fill. 2013. Sarcoplasmic reticulum K(+) (TRIC) channel does not carry essential countercurrent during Ca(2+) release. *Biophys. J.* 105:1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.042>
- Hodgkin, A.L., and P. Horowicz. 1960. Potassium contractures in single muscle fibres. *J. Physiol.* 153:386–403. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1960.sp006541>
- Hodgkin, A.L., and A.F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117:500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
- Hollingworth, S., and S.M. Baylor. 1990. Changes in phenol red absorbance in response to electrical stimulation of frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 96:473–491. <https://doi.org/10.1085/jgp.96.3.473>
- Jacquemond, V. 1997. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73:920–928. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78124-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78124-4)
- Kourie, J.I., D.R. Laver, P.R. Junankar, P.W. Gage, and A.F. Dulhunty. 1996. Characteristics of two types of chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.* 70:202–221. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79564-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79564-4)
- Kovács, L., R.A. Schümperli, and G. Szücs. 1983. Comparison of birefringence signals and calcium transients in voltage-clamped cut skeletal muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 341:579–593. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014825>
- Kuum, M., V. Veksler, J. Liiv, R. Ventura-Clapier, and A. Kaasik. 2012. Endoplasmic reticulum potassium-hydrogen exchanger and small conductance calcium-activated potassium channel activities are essential for ER calcium uptake in neurons and cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* 125:625–633. <https://doi.org/10.1242/jcs.090126>
- Labarca, P.P., and C. Miller. 1981. A K<sup>+</sup>-selective, three-state channel from fragmented sarcoplasmic reticulum of frog leg muscle. *J. Membr. Biol.* 61:31–38. <https://doi.org/10.1007/BF01870750>
- Lefebvre, R., C. Legrand, E. González-Rodríguez, L. Groom, R.T. Dirksen, and V. Jacquemond. 2011. Defects in Ca<sup>2+</sup> release associated with local expression of pathological ryanodine receptors in mouse muscle fibres. *J. Physiol.* 589:5361–5382. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.216408>
- Martonosi, A.N. 1996. Structure-function relationships in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum: Facts, speculations and questions for the future. *Biochim. Biophys. Acta.* 1275:111–117. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00059-X](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00059-X)
- Meissner, G. 1994. Ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56:485–508. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002413>
- Oetliker, H. 1989. Energetical considerations related to calcium release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *Biomed. Biochim. Acta.* 48:S313–S318.
- Pape, P.C., M. Konishi, S. Hollingworth, and S.M. Baylor. 1990. Perturbation of sarcoplasmic reticulum calcium release and phenol red absorbance transients by large concentrations of fura-2 injected into frog skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 96:493–516. <https://doi.org/10.1085/jgp.96.3.493>

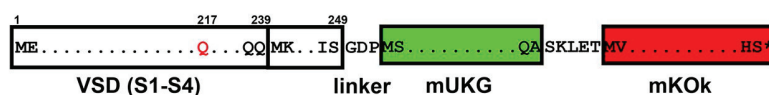


- Pape, P.C., D.S. Jong, and W.K. Chandler. 1995. Calcium release and its voltage dependence in frog cut muscle fibers equilibrated with 20 mM EGTA. *J. Gen. Physiol.* 106:259–336. <https://doi.org/10.1085/jgp.106.2.259>
- Pape, P.C., D.S. Jong, and W.K. Chandler. 1998. Effects of partial sarcoplasmic reticulum calcium depletion on calcium release in frog cut muscle fibers equilibrated with 20 mM EGTA. *J. Gen. Physiol.* 112:263–295. <https://doi.org/10.1085/jgp.112.3.263>
- Pape, P.C., K. Fénelon, and N. Carrier. 2002. Extra activation component of calcium release in frog muscle fibres. *J. Physiol.* 542:867–886. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.017095>
- Piccolo, A., and M. Pusch. 2005. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CLC-4 and CLC-5. *Nature.* 436:420–423. <https://doi.org/10.1038/nature03720>
- Pitt, S.J., K.H. Park, M. Nishi, T. Urashima, S. Aoki, D. Yamazaki, J. Ma, H. Takeshima, and R. Sitsapesan. 2010. Charade of the SR K<sup>+</sup>-channel: Two ion-channels, TRIC-A and TRIC-B, masquerade as a single K<sup>+</sup>-channel. *Biophys. J.* 99:417–426. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.051>
- Pizarro, G., and E. Ríos. 2004. How source content determines intracellular Ca<sup>2+</sup> release kinetics. Simultaneous measurement of [Ca<sup>2+</sup>] transients and [H<sup>+</sup>] displacement in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 124:239–258. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409071>
- Rossi, D., C. Bencini, M. Maritati, F. Benini, S. Lorenzini, E. Pierantozzi, A.M. Scarcella, C. Paolini, F. Protasi, and V. Sorrentino. 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>
- Rousseau, E., M. Roberson, and G. Meissner. 1988. Properties of single chloride selective channel from sarcoplasmic reticulum. *Eur. Biophys. J.* 16:143–151. <https://doi.org/10.1007/BF00261900>
- Samsó, M. 2015. 3D structure of the dihydropyridine receptor of skeletal muscle. *Eur. J. Transl. Myol.* 25:4840. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2015.4840>
- 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>
- Shaner, N.C., M.Z. Lin, M.R. McKeown, P.A. Steinbach, K.L. Hazelwood, M.W. Davidson, and R.Y. Tsien. 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods.* 5:545–551. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1209>
- Sharma, P., V. Ignatchenko, K. Grace, C. Ursprung, T. Kislinger, and A.O. Gramolini. 2010. Endoplasmic reticulum protein targeting of phospholamban: A common role for an N-terminal di-arginine motif in ER retention? *PLoS One.* 5:e11496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011496>
- Smith, J.S., T. Imagawa, J. Ma, M. Fill, K.P. Campbell, and R. Coronado. 1988. Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 92:1–26. <https://doi.org/10.1085/jgp.92.1.1>
- Somlyo, A.V., H. Shuman, and A.P. Somlyo. 1977. Composition of sarcoplasmic reticulum in situ by electron probe X-ray microanalysis. *Nature.* 268:556–558. <https://doi.org/10.1038/268556a0>
- Somlyo, A.V., H.G. Gonzalez-Serratos, H. Shuman, G. McClellan, and A.P. Somlyo. 1981. Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: An electron-probe study. *J. Cell Biol.* 90:577–594. <https://doi.org/10.1083/jcb.90.3.577>
- Somlyo, A.V., G. McClellan, H. Gonzalez-Serratos, and A.P. Somlyo. 1985. Electron probe X-ray microanalysis of post-tetanic Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> movements across the sarcoplasmic reticulum in situ. *J. Biol. Chem.* 260:6801–6807.
- 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>
- Sztretye, M., J. Yi, L. Figueroa, J. Zhou, L. Royer, P. Allen, G. Brum, and E. Ríos. 2011. Measurement of RyR permeability reveals a role of calsequestrin in termination of SR Ca<sup>2+</sup> release in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 138:231–247. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010592>
- Tsien, R.Y. 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* 19:2396–2404. <https://doi.org/10.1021/bi00552a018>
- Tsutsui, H., S. Karasawa, Y. Okamura, and A. Miyawaki. 2008. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat. Methods.* 5:683–685. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1235>
- Tsutsui, H., Y. Jinno, A. Tomita, Y. Niino, Y. Yamada, K. Mikoshiba, A. Miyawaki, and Y. Okamura. 2013a. Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase. *J. Physiol.* 591:4427–4437. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.257048>
- Tsutsui, H., Y. Jinno, A. Tomita, and Y. Okamura. 2013b. Optically detected structural change in the N-terminal region of the voltage-sensor domain. *Biophys. J.* 105:108–115. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.051>
- Vergara, J., F. Bezanilla, and B.M. Salzberg. 1978. Nile blue fluorescence signals from cut single muscle fibers under voltage or current clamp conditions. *J. Gen. Physiol.* 72:775–800. <https://doi.org/10.1085/jgp.72.6.775>
- Wang, J., and P.M. Best. 1994. Characterization of the potassium channel from frog skeletal muscle sarcoplasmic reticulum membrane. *J. Physiol.* 477:279–290. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020190>
- Yazawa, M., C. Ferrante, J. Feng, K. Mio, T. Ogura, M. Zhang, P.H. Lin, Z. Pan, S. Komazaki, K. Kato, et al. 2007. TRIC channels are essential for Ca<sup>2+</sup> handling in intracellular stores. *Nature.* 448:78–82. <https://doi.org/10.1038/nature05928>

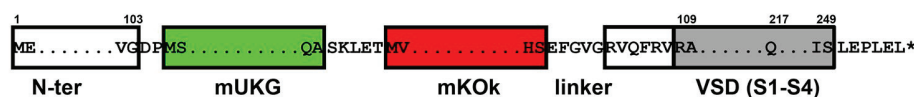
## Supplemental material

Sanchez et al., <https://doi.org/10.1085/jgp.201812035>

Mermaid



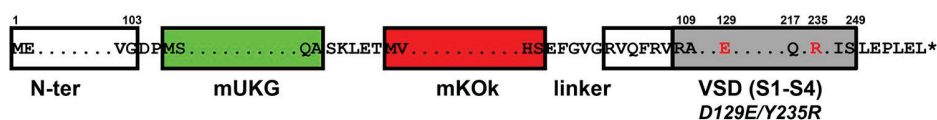
Rv-Mermaid



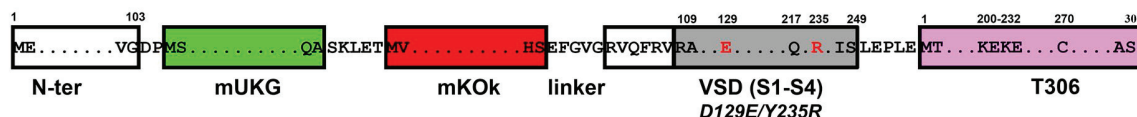
T306-Rv-Mermaid



Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>



T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>



ER-Mermaid<sup>D129E</sup>

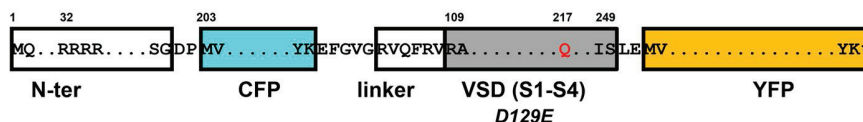


Figure S1. **Schematic sequence structures of plasma membrane- and ER/SR membrane-targeted Mermaid-derived voltage sensors.** Mermaid voltage sensor comprises a VSD, isolated from *Ciona intestinalis* voltage-sensing phosphatase, and mUKG and mKOk coral fluorescent proteins as FRET pair, fused in tandem at the C-terminal end. Mermaid bears the R217Q mutation (indicated in red) that shifts voltage sensitivity of the VSD to a more physiologically relevant range. Rv-Mermaid is the reverse variant of Mermaid in which the VSD is located C terminally. Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> sequence bears mutations on residues 129 and 235 of the VSD sequence (residues 564 and 671 of Rv-Mermaid) that generate a shift of its voltage dependence toward more positive values. In T306-Rv-Mermaid and T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>, the first 306 residues of skeletal muscle 95-kD triadin are fused to the C-terminal end to retain the voltage sensor at ER/SR membranes. The N-terminal chain of ER-Mermaid<sup>D129E</sup> contains an arginine stretch that favors ER/SR membrane retention of the voltage sensor. FRET proteins in ER-Mermaid<sup>D129E</sup> are CFP and YFP whose sequences are fused respectively at the N or C terminus of the VSD sequence, this latter harboring a mutation corresponding to codon 129 of Mermaid VSD (residue 475 of ER-Mermaid<sup>D129E</sup>).

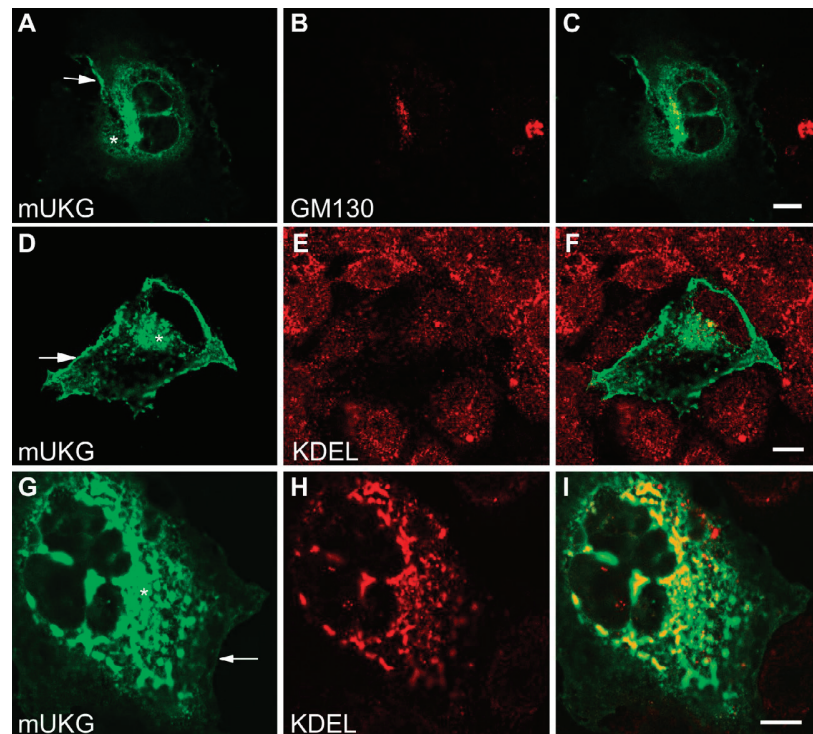


Figure S2. **Plasma membrane and ER localization of Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> in COS-7 cells.** Cells grown on coverslips were immunolabeled 48–72 h after transfection, using antibodies directed against GM130, a cis-Golgi marker (A–C) or against the KDEL sequence (D–I), a hallmark of luminal ER proteins, and observed with confocal microscopy. Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> localized systematically at the plasma membrane, as indicated by arrows (A, D, and G). A Golgi localization of the biosensor was partially observed, as shown by limited colocalization with GM130 labeling. Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> accumulated in the cytoplasm (asterisks in A, D, and G) in a compartment likely corresponding to ER, as shown by broad colocalization with KDEL labeling (F and I). Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> localization to the ER appeared very extensive in some cells (G–I), which generally exhibited strong biosensor expression, and was much more discrete in other cells (D–F), which tended to exhibit more modest expression levels of the biosensor. Bars, 10  $\mu$ m.

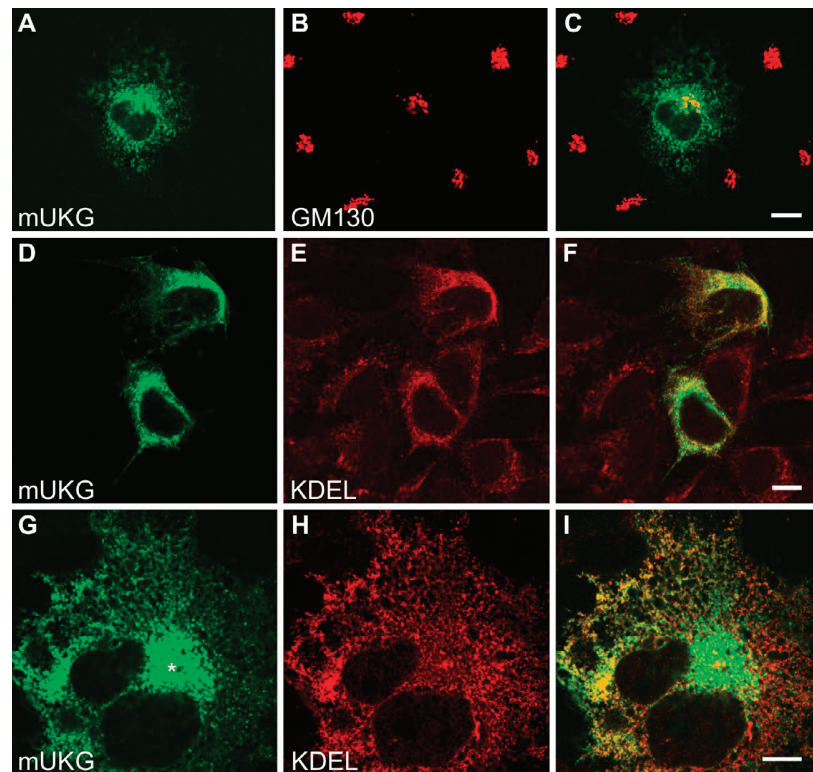


Figure S3. **ER localization of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> in COS-7 cells.** (A–I) Cells grown on coverslips were immunolabeled 48–72 h after transfection using antibodies directed against GM130, a cis-Golgi marker (A–C), or against the KDEL sequence (D–I), a hallmark of luminal ER proteins, and observed by confocal microscopy. As for Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (Fig. S2), T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> localized in part to the Golgi compartment, as shown by narrow colocalization with GM130 labeling. Strikingly, the sequence corresponding to the 306 residues of the N-terminal end of triadin (T306) efficiently retained T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> in the ER, as shown by widespread colocalization with KDEL labeling, and by the absence of plasma membrane staining (D–I). T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> appeared to not completely overlap ER-marker labeling (asterisk in G), and this was especially apparent in cells displaying strong biosensor expression (G–I). This could correspond to localization of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> in Golgi cisternae and vesicles as well as in the trans-Golgi network. Bars, 10  $\mu$ m.

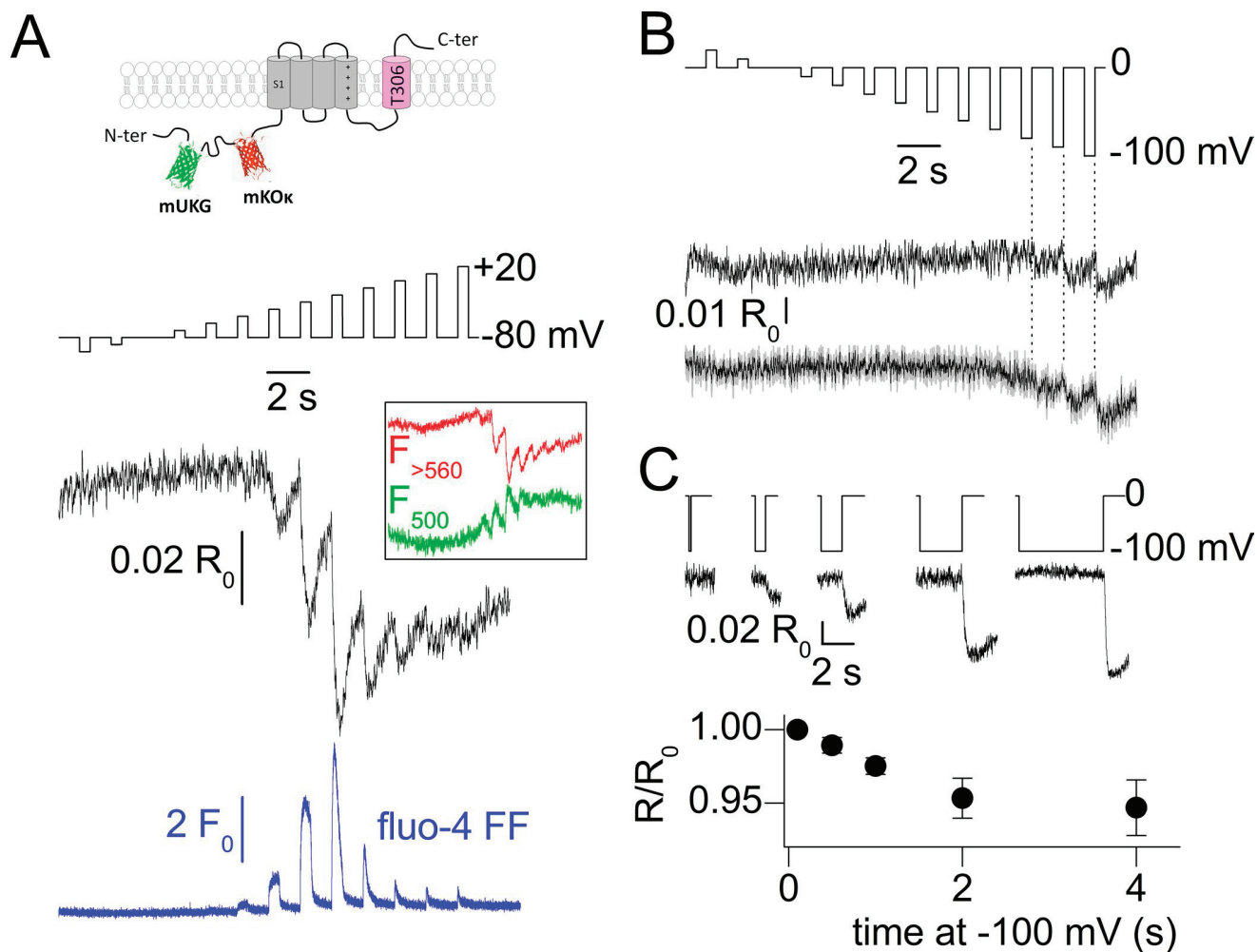


Figure S4. **FRET signal vanishes and recovers in concurrence with voltage-dependent inactivation and recovery from inactivation of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release.** (A) Changes in the FRET ratio in response to the indicated voltage-clamp pulse protocol, from a muscle fiber expressing T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. The inset shows the corresponding changes in fluorescence. The bottom blue trace shows the fluo-4 FF fluorescence signal recorded in a separate experiment, in response to the same pulse protocol. Schematic structure of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> is shown on top. (B) Response of T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> to successive hyperpolarizing pulses from 0 mV. The bottom trace corresponds to the mean ( $\pm$ SEM, gray shading) from eight fibers. (C) Time-dependent recovery of t-tubule depolarization-induced T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> response, after t-tubule membrane hyperpolarization to -100 from 0 mV. The graph shows the mean amplitude of the FRET ratio versus the duration of t-tubule hyperpolarization from three fibers. Error bars represent  $\pm$ SEM.

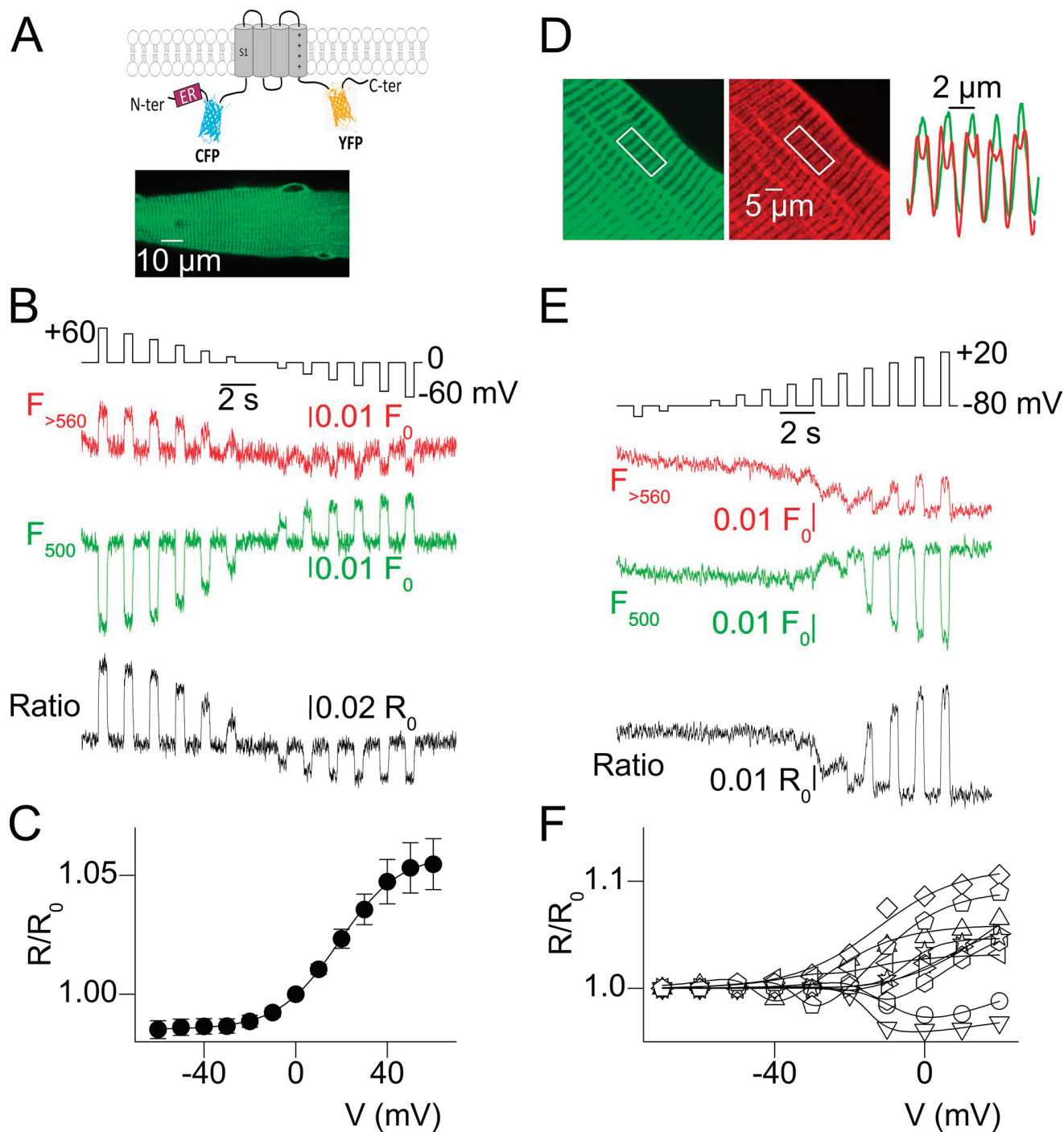


Figure S5. **Mixed SR and t-tubule response of ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> to t-tubule membrane depolarization.** (A) Schematic illustration of the structure of the protein (top) and its widespread distribution when expressed in muscle fibers (bottom). (B) Changes in CFP ( $F_{500}$ , green) and YFP ( $F_{>560}$ , red) fluorescence and corresponding FRET ratio in response to the voltage-clamp protocol shown on top, from a muscle fiber expressing ER-Mermaid2<sup>D129E</sup>. (C) Mean voltage dependence of the change in FRET ratio measured with voltage pulses delivered from 0 mV ( $n = 10$ ). (D) Confocal pattern of the green fluorescence in muscle fibers expressing ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> at high magnification. The red image and corresponding profile are from di-8-anepps fluorescence, marking the t-tubule membrane network. (E) Changes in CFP ( $F_{500}$ , green) and YFP ( $F_{>560}$ , red) fluorescence and corresponding FRET ratio in response to the voltage-clamp protocol shown on top, from a muscle fiber expressing ER-Mermaid2<sup>D129E</sup>. (F) Voltage dependence of the end-pulse FRET ratio of ER-Mermaid2<sup>D129E</sup> measured in response to the pulse protocol shown in E. Data are from the same muscle fibers as in C. Error bars represent  $\pm$ SEM.

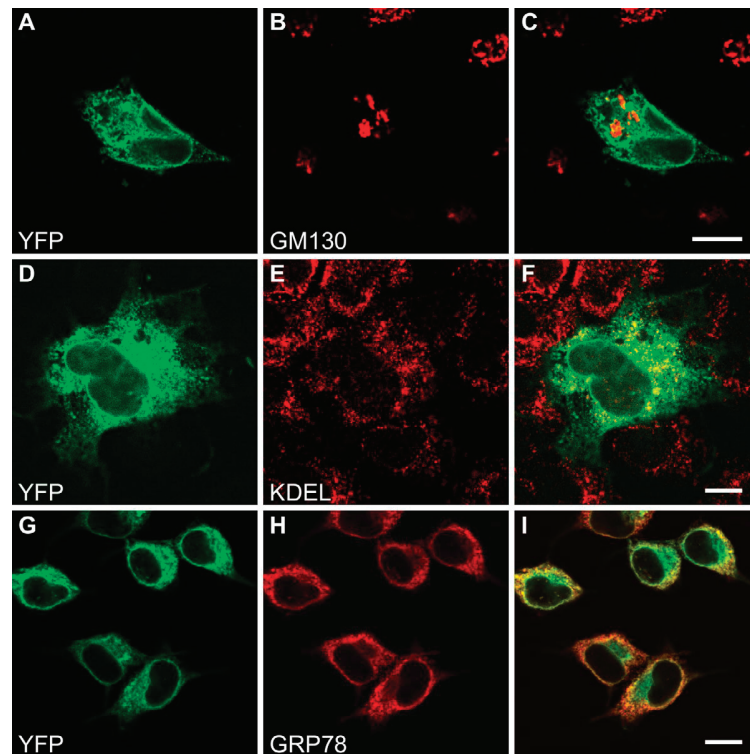


Figure S6. **Endoplasmic reticulum localization of ER-Mermaid2 in COS-7 and HeLa cells.** Cells grown on coverslips were immunolabeled 24–72 h after transfection using antibodies directed against GM130, a cis-Golgi marker (A–C), or against luminal ER proteins (anti-KDEL sequence [D–F] or anti-GRP-78 [G–I]). Narrow colocalization with GM130 labeling suggests that ER-Mermaid2 partly localizes to the Golgi compartment (A–C). Widespread colocalization with ER markers labeling strongly suggest that ER-Mermaid2 localized to the ER (D–I). As for T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> (Fig. S3), the fact that a minor part of the ER-Mermaid2 signal did not overlap ER-marker labeling could correspond to localization in Golgi cisternae and vesicles and in the trans-Golgi network. Bars, 10  $\mu$ m.

## Section 2.

### TRANSITOIRES CALCIQUES TRIADIQUES AU COURS DU COUPAGE EXCITATION- CONTRACTION DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

Article 2 : **Sanchez, C.**, Berthier, C., Tourneur, Y., Allard, B., Csernoch, L. and Jacquemond, V. Triadic  $Ca^{2+}$  transients during muscle excitation-contraction coupling. (*en préparation*)

#### Introduction

Depuis le début des années 1980, les propriétés physiologiques des canaux  $Ca^{2+}$  RYR1 ont été principalement étudiées via la mesure globale des transitoires  $Ca^{2+}$  intracellulaires à l'aide d'indicateurs calciques fluorescents synthétiques solubles chargés dans le cytoplasme de la fibre musculaire intacte.

Au milieu des années 1990, l'avènement de la microscopie confocale a permis de détecter des événements calciques élémentaires, les *sparks*, reflétant la libération locale de  $Ca^{2+}$  par un canal ou par un petit groupe de canaux RYR dans les fibres musculaires d'amphibiens et dans les cardiomyocytes de mammifères. Cependant, très peu de données (excepté Csernoch et al. 2004, 2008) rapportent l'activité élémentaire des canaux RYR1 au cours de l'activation du couplage EC dans les fibres musculaires de mammifères. Ainsi à l'heure actuelle, la compréhension des mécanismes de contrôle et de régulation de l'ouverture et de la fermeture synchrones des RYR1s est très limitée. Or, ces informations sont essentielles à la caractérisation de la fonction musculaire normale et pathologique. Dans le but d'accéder à des informations plus précises de l'activité des canaux RYR1 au cours de l'activation du couplage EC, nous avons suivi une stratégie précédemment utilisée dans les cardiomyocytes (Shang et al. 2014; Despa et al. 2014) et consistant en l'adressage spécifique du biosenseur fluorescent de type GCaMP6f (T.-W. Chen et al. 2013b) à la membrane du RS de fibres musculaires différenciées de souris.

#### Résultats

##### ***Profil d'expression et sensibilité au $Ca^{2+}$ du biosenseur T306-GCaMP6f***

En l'absence de séquence d'adressage, le biosenseur GCaMP6f s'exprime de manière homogène dans tout le cytoplasme des fibres musculaires. En revanche, T306-GCaMP6f, conçu par fusion du biosenseur à l'extrémité N-terminale de la séquence d'adressage au RS (T306, correspondant aux 306 premiers résidus de la triadine) s'exprime seulement au niveau d'une ou de quelques régions



restreintes des fibres musculaires. A l'intérieur de ces régions d'expression, le profil de fluorescence (doubles pics espacés de 2  $\mu\text{m}$ ) est caractéristique des protéines triadiques. Ces données indiquent que la séquence T306 est efficace à l'insertion spécifique du biosenseur GCaMP6f à la membrane du RS jonctionnel des fibres musculaires.

La calibration de la réponse au  $\text{Ca}^{2+}$  des biosenseurs GCaMP6f et T306-GCaMP6f a permis de caractériser leur sensibilité vis-à-vis du  $\text{Ca}^{2+}$  et leur amplitude de réponse. De manière intéressante, les résultats indiquent que la version triadique T306-GCaMP6f présente une affinité similaire pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D = 0.65 \mu\text{M}$ ) que la version cytoplasmique GCaMP6f ( $K_D = 0.60 \mu\text{M}$ ). En revanche, l'amplitude maximale de réponse de T306-GCaMP6f apparaît réduite d'un facteur 5 en comparaison à GCaMP6f.

### ***Cinétiques des transitoires $\text{Ca}^{2+}$ détectés par GCaMP6f et T306-GCaMP6f***

Afin de pouvoir caractériser les délais cinétiques de réponse des biosenseurs GCaMP6f et T306-GCaMP6f, les signaux de fluorescence correspondants, évoqués par des dépolarisations, ont été comparés à ceux de l'indicateur calcique fluorescent de synthèse rhod-2.

La réponse de GCaMP6f aux dépolarisations membranaires est considérablement retardée par rapport à celle du rhod-2. Cette distorsion temporelle est due aux cinétiques lentes du biosenseur GCaMP6f. En effet, la modélisation cinétique des signaux a permis d'identifier que les constantes d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{off}$ ) de GCaMP6f sont respectivement 2 et 10 fois plus lentes que celles du rhod-2.

Globalement, la réponse du biosenseur T306-GCaMP6f est semblable à celle de GCaMP6f et se caractérise, en comparaison aux signaux de fluorescence du rhod-2, par une augmentation retardée de la fluorescence ( $F/F_0$ ) au cours de la dépolarisation imposée à la membrane des tubules-T et un retour plus lent à la fluorescence de base ( $F_0$ ) lors de la repolarisation. En revanche, les cinétiques de réponse sont plus rapides que dans le cas de GCaMP6f.

Le gradient d'expression du biosenseur triadique a été utilisé pour tester l'effet éventuel de l'expression *per se* de T306-GCaMP6f sur la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. Les résultats indiquent qu'une différence d'un facteur 5 du niveau d'expression n'a pas de conséquence marquée sur l'amplitude et les cinétiques du transitoire  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces résultats suggèrent que l'expression ou la surexpression de T306-GCaMP6f n'interfère pas ou peu avec l'activité des canaux RYR1.

### ***Dépendance au potentiel des transitoires $\text{Ca}^{2+}$ des biosenseurs GCaMP6f et T306-GCaMP6f***

Les variations moyennes de fluorescence émises par les biosenseurs GCaMP6f et T306-GCaMP6f ont été mesurées en réponse à des dépolarisations successives croissantes d'une durée de 500 ms. De nouveau, dans ces conditions expérimentales, aucune différence qualitative critique entre les

transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  issus des deux protéines ne permet de discriminer de manière irréfutable la nature cytoplasmique (GCaMP6f) ou triadique (T306-GCaMP6f) du biosenseur exprimé. En revanche, il existe des différences quantitatives entre les deux. En effet, les transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  mesurés avec T306-GCaMP6f sont de plus faible amplitude et sont plus rapides que les transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  mesurés avec GCaMP6f.

### ***Simulation des variations de $\text{Ca}^{2+}$ de l'espace triadique jusqu'au centre du sarcomère et de la réponse correspondante des biosenseurs GCaMP6f et T306-GCaMP6f***

De manière générale (et contre-intuitive), les résultats montrent que la localisation cytoplasmique ou triadique du biosenseur GCaMP6f n'a pas d'effet considérable sur les cinétiques de la réponse fluorescente aux variations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Afin de vérifier la cohérence de cette observation, nous avons utilisé un modèle simulant les variations de  $\text{Ca}^{2+}$  libre le long du sarcomère et les variations correspondantes de  $\text{Ca}^{2+}$  complexé aux biosenseurs cytoplasmique et triadique.

Les résultats de ces travaux de modélisation indiquent que, quelle que soit l'amplitude du flux de  $\text{Ca}^{2+}$ , utilisé comme paramètre d'entrée, les cinétiques de changements en complexe Ca-GCaMP6f et Ca-T306-GCaMP6f ne devraient pas différer fondamentalement, et ceci malgré les différences de cinétiques et le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  considérable entre le site de libération et le centre du sarcomère, 0.5  $\mu\text{m}$  plus loin. Ces données confortent la crédibilité de l'adressage de la sonde T306-GCaMP6f à la triade tout en témoignant des limites des sondes GCaMP6f à suivre avec fiabilité les variations rapides et importantes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### ***Variations locales de fluorescence de T306-GCaMP6f en réponse à la dépolarisation***

Malgré sa capacité limitée à suivre les variations rapides et importantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , T306-GCaMP6f présente l'avantage unique d'être présent et fixé à la triade. Ceci offre la possibilité exclusive de détecter l'apparition et la durée d'activation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à différentes localisations triadiques d'une fibre musculaire donnée, et ainsi de fournir des informations sur la variabilité spatiale de l'activation des canaux RYR1 au cours du couplage EC de la fibre musculaire. Dans ce but, nous avons examiné les variations de fluorescence de T306-GCaMP6f au niveau de 8 régions triadiques distinctes sélectionnées arbitrairement dans 6 fibres musculaires stimulées par des dépolarisations successives de faible amplitude (-25, -20, -15 mV).

Dans les limites de l'incertitude due à la faible fréquence d'échantillonnage utilisée et du rapport signal/bruit, les résultats montrent que les transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  locaux sont remarquablement similaires d'une triade à l'autre dans une fibre musculaire donnée, quel que soit le niveau de dépolarisation.

## Conclusion

Cette étude représente la première tentative de détection des signaux  $\text{Ca}^{2+}$  avec un biosenseur fluorescent adressé à la triade de fibres musculaires squelettiques différenciées. Même si elle met en évidence les difficultés liées à cette approche, et en particulier les limites encore imposées par les biosenseurs actuels, elle offre une première visualisation de l'activité des canaux RYR1 in situ, à l'aide d'une sonde scotchée à la triade.

De manière un peu décevante, le biosenseur T306-GCaMP6f génère des transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  d'amplitude 5 fois plus faible que lorsqu'il n'est pas fusionné à une séquence d'adressage, probablement en raison de modifications intrinsèques de ses propriétés de fluorescence.

Par contre, l'affinité relativement importante ( $K_D = 0.65 \mu\text{M}$ ) de T306-GCaMP6f ne compromet pas la possibilité de détection des changements de  $\text{Ca}^{2+}$  triadiques pendant le couplage EC, même si les signaux détectés souffrent de non-linéarité en amplitude et de profondes distorsions cinétiques.

Finalement, en dépit de ses limites, le biosenseur T306-GCaMP6f permet d'accéder au comportement individuel de différentes triades au sein d'une même fibre musculaire. Nos résultats montrent une remarquable constance des caractéristiques de la réponse fluorescente entre les triades d'une fibre musculaire donnée. Le biosenseur T306-GCaMP6f pourrait ainsi constituer un outil intéressant pour la caractérisation de conditions pathologiques associées, ou suspectées être associées, à un dysfonctionnement du comportement des canaux RYR.

# Triadic Ca<sup>2+</sup> transients during muscle excitation-contraction coupling

Colline Sanchez<sup>1</sup>, Christine Berthier<sup>1</sup>, Yves Tourneur<sup>2</sup>, Bruno Allard<sup>1</sup>, Laszlo Csernoch<sup>3</sup> and  
Vincent Jacquemond<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon, France.

<sup>2</sup>UFPE Dept Nutrição, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, Brasil

<sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary.

Running title: Ca<sup>2+</sup> detection near ryanodine receptors

Corresponding authors:

Vincent Jacquemond  
Institut NeuroMyoGène  
UMR CNRS 5310 - INSERM U1217 - Université Claude Bernard Lyon 1  
Faculté de Médecine et de Pharmacie  
8, Avenue Rockefeller, 69373 Lyon, France  
Tel. (33) 4 26 68 82 69  
E-mail : [vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr](mailto:vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr)

Key words: skeletal muscle, ryanodine receptor, sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release.

## Abstract

Functional properties of voltage-activated ryanodine receptor (RYR)-mediated sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$  release in muscle fibers have so far been essentially addressed with diffusible  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive dyes. With the aim of gaining new insights into  $\text{Ca}^{2+}$  release function and regulation, we used a specific peptide domain (T306) of the protein triadin to target the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive probe GCaMP6f to the junctional SR membrane of muscle fibers. In muscle fibers expressing GCaMP6f, fluorescence was homogeneously distributed and experienced large changes with obvious kinetic delays upon voltage-clamp depolarization of the fibers. In fibers expressing T306-GCaMP6f, fluorescence was concentrated in the vicinity of one or a few nuclei where it yielded a transverse banded pattern consistent with triadic localization of the probe. Upon depolarization, T306-GCaMP6f generated fluorescence transients of faster kinetics than GCaMP6f, a feature that was reproduced by model simulation of the spatial gradient of  $\text{Ca}^{2+}$  through a half-sarcomere, assuming the probe at the triad or in the myoplasmic bulk. T306-GCaMP6f transients within distinct triadic regions of a same fiber exhibited very similar features at a given level of activation and no sign of voltage-dependent delay in  $\text{Ca}^{2+}$  release activation could be detected. Results demonstrate the remarkable homogeneity of triadic  $\text{Ca}^{2+}$  changes upon muscle fiber activation. Despite its high affinity and kinetic limitations the targeted sensor may prove useful to identify defective triads upon specific stress or pathological conditions.

## Introduction

In skeletal muscle, molecular coupling between tetrads of  $\text{Ca}_v1.1$  voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the transverse (t-) tubule membrane and every other ryanodine receptor (RyR) within the RyR channel population clustered in the adjacent sarcoplasmic reticulum (SR) membrane constitutes the core machinery of excitation-contraction (EC) coupling. Functional outcome is that RyR-mediated SR  $\text{Ca}^{2+}$  release is triggered in response to  $\text{Ca}_v1.1$  conformational changes generated by plasma membrane depolarization, in a manner that is completely reversible upon t-tubule membrane repolarization. In terms of supporting membrane structures, SR  $\text{Ca}^{2+}$  release takes place in a particular region called the triadic junction where one t-tubule comes close ( $\sim 10$  nm) to the RyR-loaded junctional membrane of two SR terminal cisternae. Starting from the early 1980s and then on, the physiological properties of voltage-activated RyR-mediated SR  $\text{Ca}^{2+}$  release in differentiated intact skeletal muscle fibers have been essentially studied by measuring cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  transients with diffusible  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive dyes (e.g. Baylor et al., 1982; Palade and Vergara, 1982; Kovacs et al., 1983; Brum et al., 1988; Feldmeyer et al., 1990; Sarkozi et al., 1996; Jacquemond, 1997; Woods et al., 2005; Hollingworth and Baylor, 2013; Braubach et al., 2014; Hernández-Ochoa et al., 2014; Manno et al., 2017). This, over the years, has provided detailed information regarding control of the activity of the RyR channel population in its native biological environment as well as illuminating insights into physiopathological issues of EC coupling. In the mid-1990s, advent of confocal imaging opened up a split between the frog (earlier gold-standard muscle preparation) and mammals as it was found that the frog  $\text{Ca}^{2+}$  transient builds up on accumulation of local stereotyped elementary  $\text{Ca}^{2+}$  release events called  $\text{Ca}^{2+}$  sparks (Tsugorka et al., 1995; Klein et al., 1996) believed to result from mixed expression and function of type 1 and type 3 RyR isoforms, whereas these events are absent from mammalian muscle where RyR3 expression is negligible. If one leaves aside the voltage-activated- $\text{Ca}^{2+}$  spark story from RyR3 containing muscles, there is so far very limited experimental insights into single RyR1 channel or single cluster of RyR1 channels behavior during activation of intact differentiated mammalian muscle fibers. Mainly, confocal imaging of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in fibers from rat and mouse under conditions of low levels of voltage activation showed presence of low-amplitude, long-lasting  $\text{Ca}^{2+}$  release events that were attributed to activation of either a single or of a restricted number of highly synchronized RyR1 channels (Csernoch et al. 2004, 2008). Since then, no further experimental progress was made that increased our understanding of how single RyR1 channels or single clusters of coherently operating RyR1 channels open and close during t-tubule depolarization and this is falling very short as compared to the heavy literature concerning single channel activity of RyR1 channels reconstituted in bilayer systems (see

for review Meissner, 2002; Laver, 2006), the relevance of which to the physiological situation remains questionable.

In an attempt to provide deeper understanding of RYR1 function during muscle activity, we followed a strategy previously used in cardiac cells (Shang et al., 2014; Despa et al., 2014) consisting in targeting a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive probe to the junctional SR membrane. Indeed, having the probe in close vicinity to the RYRs was anticipated to provide a distinctive perspective view of the channel activity during physiological SR  $\text{Ca}^{2+}$  release. For this we expressed in muscle fibers GCaMP6f (Chen et al., 2013) fused to a specific domain (T306, Sanchez et al., 2018) of the triadic protein triadin and we tracked changes in T306-GCaMP6f fluorescence triggered by voltage-clamp depolarizing pulses, using confocal imaging. The affinity of GCaMP6f for  $\text{Ca}^{2+}$  is much too high to reliably track triadic  $\text{Ca}^{2+}$  changes during EC coupling activation. However, T306-GCaMP was expected to tell us at least when, where and for how long distinct RYR1 channels (or clusters of channels) of a same muscle fiber are activated, at a given level of voltage activation. We first compared the properties of macroscopic fluorescence transients from GCaMP6f and T306-GCaMP6f and we used model simulations to assess the consistency of the observations. We then looked for spatial distinctions in voltage-activated T306-GCaMP6f signals in separate regions of a same muscle fiber during SR  $\text{Ca}^{2+}$  release activation. Results reveal that spatially distinct triads exhibit remarkable uniformity in terms of onset and termination of  $\text{Ca}^{2+}$  release activity, even at the lowest levels of activation.

## **Materials and methods**

All experiments and procedures were performed according to the ethics principles of the French Department of Veterinary Services and the French Ministry for Higher Education, Research and Innovation, in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of the University Claude Bernard Lyon 1, the French Ministry of Agriculture (decree 87/848), and the revised European Directive 2010/63/EU. All experiments were performed at room temperature (20–22°C).

### ***Plasmid constructs***

Biosensor cDNAs were derived from the original GCaMP6f cDNA (Addgene) and were inserted into the modified pCMV vector for mammalian expression. To trigger retention of the biosensor at the triadic SR membrane, we fused in frame, at the 3' end of GCaMP6f, the cDNA sequence of residues 1–306 (T306) of human triadin.

### ***In vivo transfection***

The experimental protocol for *in vivo* transfection was approved by the Animal Experimentation Committee # C2EA-15 of the Rhône-Alpes Region and by the French Ministry for Higher Education, Research and Innovation. Expression in mouse *flexor digitorum brevis* and *interosseus* muscles was achieved by plasmid injection and subsequent electroporation following previously described procedures (Lefebvre et al., 2011). In brief, 8-16 week-old Swiss OF1 male mice were used. Mice were anesthetized by isoflurane inhalation using a commercial delivery system (Univentor 400 Anesthesia Unit; Univentor) and a 20 µl volume of a solution containing 2 mg/ml hyaluronidase dissolved in sterile saline was injected into the footpads of each hind paw of the animal. Mice were re-anesthetized 1 hour later and a volume of 20 µl of a solution containing 30–50 µg plasmid DNA diluted in NaCl 0.9% was injected into the footpads. Two gold-plated stainless steel acupuncture needles connected to the electroporation apparatus were then inserted under the skin, near the proximal and distal portion of the foot, respectively. The electroporation protocol consisted of 20 pulses of 130 V/cm amplitude and 20-ms duration delivered at a frequency of 2 Hz by a BTX ECM 830 square wave pulse generator (Harvard Apparatus). Isolation of muscle fibers and experimental observations and measurements were performed 7-8 days later.

### ***Preparation of isolated muscle fibers***

Single fibers were isolated from the transfected muscles using a previously described procedure (Jacquemond, 1997). Briefly, mice were anaesthetized by isoflurane inhalation and then killed by cervical dislocation before removal of the muscles. Muscles were incubated in Tyrode solution containing collagenase (Sigma, type 1) for 60 min at 37°C. Single fibers were then obtained by mechanical trituration of a given muscle within a 50 mm wide culture µ-dish (Ibidi, Planegg / Martinsried, Germany) filled with culture medium containing 10% fetal bovine serum (MI199; Eurobio, France), the bottom of which had been first coated with a thin layer of silicone. Fibers were embedded within silicone so that only a portion of the fiber extremity remained out, in contact with the extracellular medium. In the case of fibers expressing T306-GCaMP6f, care had to be taken to ascertain that the fiber portion left out of the silicone did exhibit expression of the probe.

### ***Electrophysiology***

Voltage-clamp was achieved with a micropipette filled with a solution mimicking the composition of the intracellular medium (see Solutions). The tip of the pipette was inserted into the silicone-insulated part of



the fiber. In order to ease intracellular dialysis and reduce series resistance, the tip was gently crushed against the bottom of the chamber. In the most routine experimental conditions, the pipette solution contained no exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffer and contraction was blocked by using N-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS) in the extracellular solution (see Solutions). In some experiments the pipette solution also contained rhod-2 (see Solutions) and in such case the fiber interior was dialyzed for a period of 30 min to allow for intracellular equilibration of the solution. The chlorided silver wire inside the pipette was connected to an RK-400 patch-clamp amplifier (Bio-Logic, Claix, France) used in whole-cell voltage-clamp configuration, in combination with an analog-digital converter (Digidata 1440A, Axon Instruments, Foster City, CA) controlled by pClamp 9 software (Axon Instruments). Analog compensation was adjusted to further decrease the effective series resistance. The holding voltage was set to -80 mV.

### ***Confocal imaging***

Confocal imaging was conducted with a Zeiss LM5 Exciter microscope equipped with a 63 × oil-immersion objective (N.A., 1.4). In routine conditions, GCaMP6f was excited with the 488 nm line of an argon laser and a 505 nm long pass filter was used on the detection channel. In fibers dialyzed with rhod-2 a 505-530 bandpass filter was used for GCaMP6f fluorescence detection; rhod-2 excitation was from the 543 nm line of a HeNe laser and rhod-2 fluorescence was collected above 560 nm. GCaMP6f and rhod-2  $\text{Ca}^{2+}$  transients were imaged using the line-scan mode ( $x, t$ ) of the system with the line parallel to the longitudinal axis of the fibers. Unless otherwise specified, images were taken with a scanning frequency of 1.15 ms per line. Fluorescence changes were expressed as  $F/F_0$  where  $F_0$  is the baseline fluorescence.

### ***Calibration***

To calibrate the response of T306-GCaMP6f, isolated muscle fibers expressing the probe were permeabilized with 0.05% saponin in the presence of a solution containing (in mM) 140 KCl, 10 EGTA, 5 PIPES, 0.05 BTS, 2,2,3-butanedione monoxime (BdM). Permeabilized fibers were then fully embedded into silicone grease and successively dialyzed, each time for 30 minutes, with a version of the above solution differing by the concentration of total added calcium (from 0 to 11 mM). Dialysis of each solution was achieved through a distinct micropipette, the blunt tip of which was inserted within the silicone-embedded muscle fiber. A confocal image of T306-GCaMP6f fluorescence was taken at the beginning of the experiment and after each dialysis period (Fig.1B). All solutions were equilibrated at pH 7. The free calcium concentration in each solution was calculated using MaxChelator (C. Patton, Stanford University).

### ***Simulation of calcium movements in the presence of either GCaMP6f or T306-GCaMP6f***

First, the rate of calcium release from the SR ( $dR/dt$ ) during a depolarizing pulse was calculated. It was assumed to activate and then partially inactivate, following a single exponential time course for both, with time constants ( $\tau_a$  and  $\tau_i$ , respectively) adjusted to represent the voltage dependence measured under experimental conditions,

$$\frac{dR}{dt} = R_{max} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_a}}\right) \cdot \left(e^{-\frac{t}{\tau_i}} + Sl\right) \cdot (Ca_{SR} - R(t))/Ca_{SR} \quad \text{Eqn. 1}$$

where  $R_{max}$  is the theoretical maximum and  $Sl$  is the non-inactivating component of  $dR/dt$  at the given voltage,  $R(t)$  is the amount of calcium released until time  $t$  (i.e.  $R(t) = \int_0^t \frac{dR}{dy} dy$ ), and  $Ca_{SR}$  is the SR calcium content at  $t=0$ . Upon repolarization  $dR/dt$  was assumed to return to its resting value (*Leak*) again following a single exponential. Note that Eqn. 1 incorporates the depletion of calcium in the SR into the release waveform. *Leak* was set to be equal to the amount of calcium transported by the SR calcium pump into the SR at resting conditions.

To follow the movement of the released calcium, the myoplasmic space was subdivided into equal sized voxels of  $10^3 \text{ nm}^3$ . The change in the calcium concentration ( $\partial[Ca]/\partial t$ ) in a voxel was calculated as

$$\frac{\partial[Ca]}{\partial t} = D \frac{\partial^2[Ca]}{\partial x^2} - \sum_i \frac{d[Ca-X_i]}{dt} - P \quad \text{Eqn. 2}$$

where  $D$  is the diffusion coefficient for  $Ca^{2+}$  in the myoplasm,  $[Ca-X_i]$  is the amount of calcium bound to  $X_i$ , and  $P$  is the amount transported by the SR calcium pump in a given time.  $X_i$  represent the different calcium binding sites in the muscle – troponin C, parvalbumin, SR calcium pump – and either GCaMP6f or T306GCaMP6f. All binding sites were assumed to follow a first order binding kinetics with rate constants taken from the literature : the model included troponin C binding sites with a total concentration of 250  $\mu\text{M}$ , a  $K_D$  of 7.5  $\mu\text{M}$  and an *off* rate constant of 0.15  $\text{ms}^{-1}$ ; Ca-Mg binding sites on parvalbumin with a total concentration of 1500  $\mu\text{M}$ , a  $K_D$  and *off* rate constant for  $Ca^{2+}$  binding of 9.4 nM and 0.0015  $\text{ms}^{-1}$ , respectively, and a  $K_D$  and *off* rate constant for  $Mg^{2+}$  binding of 20  $\mu\text{M}$  and 0.008  $\text{ms}^{-1}$ , respectively. Resting  $[Ca^{2+}]$  and  $[Mg^{2+}]$  were assumed to be 0.05  $\mu\text{M}$  and 1 mM, respectively. Calcium transport across the SR membrane was included with a rate assumed to be proportional to the fractional occupancy of the SR pump sites with a sites concentration of 200  $\mu\text{M}$ , a  $K_D$  and *off* rate constant for  $Ca^{2+}$  binding of 1  $\mu\text{M}$  and 0.16  $\text{ms}^{-1}$ , respectively, and a maximum pump rate of 10  $\mu\text{M}.\text{ms}^{-1}$ . For  $Ca^{2+}$  binding to GCaMP6f or T306-GCaMP6f binding sites concentration,  $K_D$  and *off* rate constant for  $Ca^{2+}$  binding were assumed to be 100  $\mu\text{M}$ , 0.65  $\mu\text{M}$  and 0.012  $\text{ms}^{-1}$ , respectively.

Note that in Eqn.1 a one-dimensional diffusion was assumed. This simplification was justified by selecting the number of voxels ( $N_i$ ) at a given distance ( $x_i$ ) to be dependent on  $i$  ( $i = 1, \dots, 50$ ), i.e.  $i = 1$  represented the junctional space and  $i = 50$  the middle of the sarcomere, with  $N_1$  being the smallest and  $N_{50}$  the largest amongst all  $N_i$ -s. Due to morphological restraints and inherent symmetry in the architecture of the muscle fiber, diffusion was considered only in one direction (towards the middle of the sarcomere) and boundary conditions for  $[Ca^{2+}]$  were set as to reflect this symmetry.

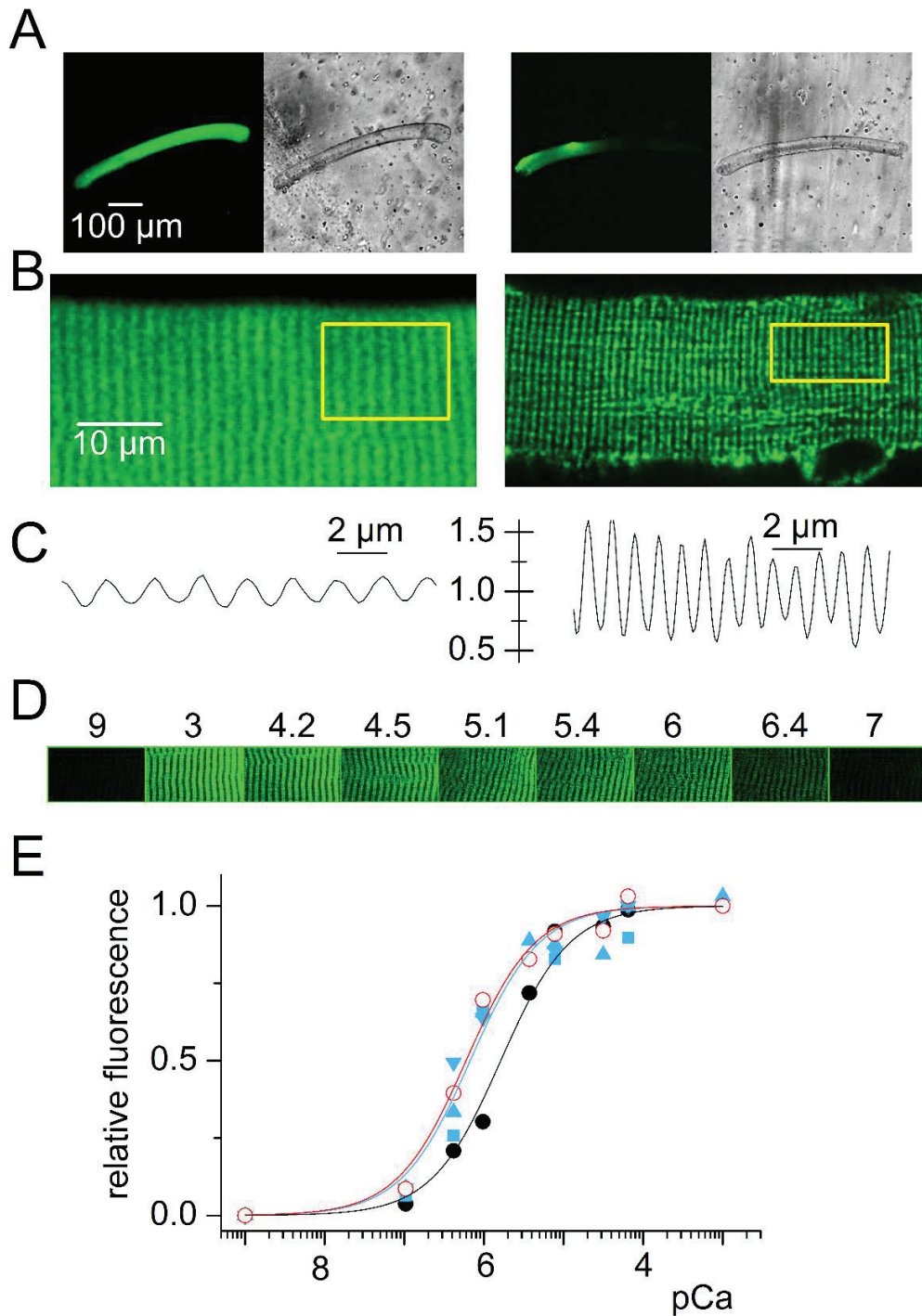
Voxels at a given distance (corresponding to the same  $x_i$ ) were assumed to behave identically in terms of their calcium handling properties. The following different possibilities of calcium movements for any voxel were considered: 1./ calcium release from the SR can occur (only for  $i = 1$ ), 2./ the dye is present, 3./ SR calcium pump is present, and 4./ other calcium binding sites ( $X_i$ ) are present. The implementation allowed the user to change the behavior of any voxel in this respect thus allowing for studying, e.g., the cases of targeted and non-targeted dye.

### ***Solutions***

The extracellular solution used for voltage-clamp contained (in mM) 140 TEA-methanesulfonate, 2.5  $CaCl_2$ , 2  $MgCl_2$ , 1 4-aminopyridine, 10 HEPES and 0.002 tetrodotoxin. The standard intrapipette solution contained (in mM) 130 K-glutamate, 5  $Na_2$ -ATP, 5  $Na_2$ -phosphocreatine, 5.5  $MgCl_2$ , 5 glucose, 5 HEPES and, in some experiments, 0.1 Rhod-2. All solutions were adjusted to pH 7.20.

### ***Statistics***

Least-squares fits were performed using a Marquardt-Levenberg algorithm routine included in Microcal Origin (Originlab, Northampton, MA). Data values are presented as means  $\pm$  sem for  $n$  fibers.

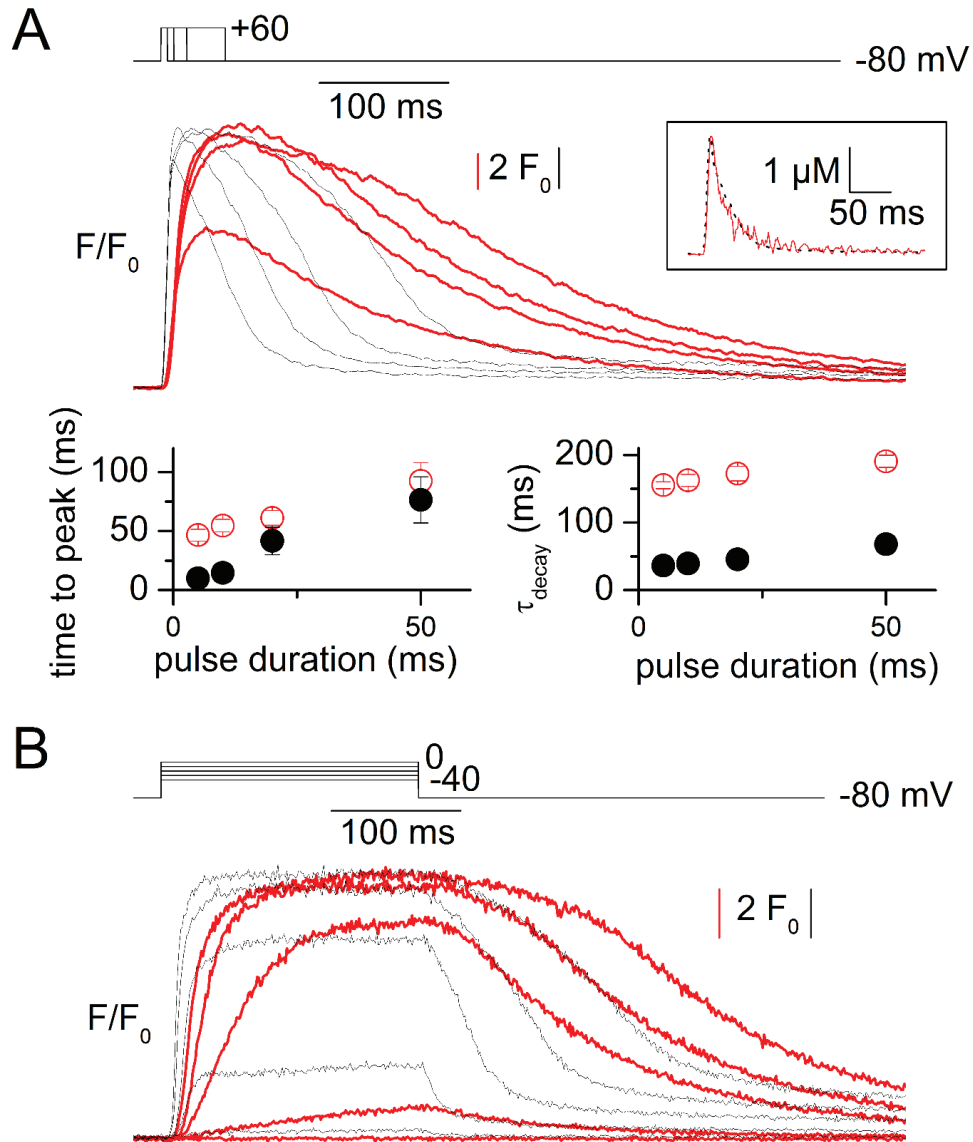


**Figure 1. Expression pattern and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of GCaMP6f and T306-GCaMP6f.** (A) Illustrative examples of the global and patchy expression patterns of GCaMP6f (left) and T306-GCaMP6f (right) in muscle fibers, respectively. (B) Typical subcellular fluorescence pattern of GCaMP6f (left) and T306-GCaMP6f (right) in muscle fibers (C) Fluorescence profile along the main axis of the muscle fibers within the box-highlighted region in the above corresponding image in (B). (D) Confocal fluorescence images from a T306-GCaMP6f expressing muscle fiber upon equilibration with solutions of varying pCa (above indicated values). (E)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of the relative change in fluorescence in 3 fibers expressing T306-GCaMP6f (filled squares and triangles), in one fiber expressing GCaMP6f (open circles) and in droplets of calibrating solutions containing rhod-2 (see Methods for details).

## Results

### Expression pattern and $\text{Ca}^{2+}$ sensitivity of T306-GCaMP6f

The fluorescence pattern of muscle fibers expressing GCaMP6f and T306-GCaMP6f substantially differed (Fig. 1A-B): GCaMP6f fluorescence was distributed throughout the entire volume of the muscle fibers and either yielded no specific subcellular features or, as shown in Fig 1B-C (left), a faint transversally striated pattern with a spatial period of about 2  $\mu\text{m}$ . In our experience this can be occasionally observed with diffusible -dyes or -expressed proteins and likely results from unspecific accumulation/binding to proteins at the Z line. In contrast, muscle fibers expressing T306-GCaMP6f exhibited one or a few restricted areas of elevated fluorescence (Fig. 1A, right). Within each of these spots the fluorescence intensity peaked according to a transversally striated pattern with a spatial period of 1  $\mu\text{m}$  (Fig. 1B-C, right), consistent with expression at the triad, either in the t-tubule membrane or in the junctional SR membrane (Sorrentino, 2011; Barone et al., 2015). However, the combination of the two features (local spots, 1  $\mu\text{m}$ -spaced striations) is reminiscent in this same system of either RYR expression (Legrand et al., 2008; Lefebvre et al., 2011) or of expression of T306 fused with various voltage-sensitive fluorescence probes which we proved localized at the SR membrane (Sanchez et al., 2018). Thus, this is one encouraging piece of evidence that in the present case too, the T306 sequence was effective in targeting the probe to the expected location. Purified GCaMP6f was reported to exhibit a  $K_D$  for  $\text{Ca}^{2+}$  of  $\sim 0.38 \mu\text{M}$  (Chen et al., 2013) whereas a value of  $0.63 \mu\text{M}$  was reported from in situ calibration of GCaMP6f fused with triadin or junctin expressed in cardiac cells (Shang et al., 2014). In our conditions, calibration of T306-GCaMP6f fluorescence was achieved *in situ* in 3 muscle fibers by successively equilibrating the cytosolic compartment with solutions containing different levels of free calcium, using the procedure described in Methods. An example of T306-GCaMP6f fluorescence images collected under these conditions is shown on top of Fig. 1D, while fluorescence values normalized to the minimum ( $F_{\min}$ ) and maximum fluorescence ( $F_{\max}$ ) in each fiber are reported with filled square and triangle symbols in Fig. 1E. Fitting the data with a Hill equation gave a mean  $K_D$  value of  $0.65 \pm 0.05 \mu\text{M}$  and a Hill coefficient of  $1.17 \pm 0.13$ . The mean value for the ratio  $F_{\max}/F_{\min}$  from these 3 fibers and from 2 additional fibers challenged only by the two extreme  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations was  $11.0 \pm 0.9$ . Fig. 1E also shows fluorescence values from one GCaMP6f-expressing fiber that we could successfully equilibrate in the presence of ionomycin with the same calibration solutions (open red circles). The superimposed curve corresponds to the result from the fit which gave a  $K_D$  of  $0.60 \mu\text{M}$  and a Hill coefficient of 1.1, thus very similar to the T306-GCaMP6f data. However, the  $F_{\max}/F_{\min}$  value from this fiber was 57, substantially larger than the above T306-



**Figure 2. Kinetic features of GCaMP6f  $\text{Ca}^{2+}$  transients. (A)** Simultaneous GCaMP6f (thick traces) and rhod-2 (thin traces) fluorescence transients detected from a muscle fiber in response to the depolarizing pulse protocol shown on top. The inset on the right shows the kinetically-corrected  $\text{Ca}^{2+}$  transients calculated from the GCaMP6f and rhod-2 traces elicited by the shortest depolarizing pulse (see text for details). The two graphs at the bottom report mean values for the time to peak  $F/F_0$  and for the time constant of  $F/F_0$  decay ( $\tau_{\text{decay}}$ ) after repolarization, from 3 fibers expressing GCaMP6f, loaded with rod-2, and stimulated with the same voltage-clamp protocol. **(B)** Illustrative example of simultaneously detected GCaMP6f (thick traces) and rhod-2 (thin traces)  $\text{Ca}^{2+}$  transients in response to 200 ms-long depolarizing pulses of increasing amplitude.

GCaMP6f mean value, but similar to the value reported in vitro (~52, Chen et al., 2013). We took this as a first indication that the dynamic range of the T306-GCaMP6f response is reduced as compared to that of GCaMP6f. The graph in Fig. 1E also shows results from rhod-2 fluorescence calibration in droplets with the same solutions, from which fitting a 1:1 binding curve gave a  $K_D$  of 1.63  $\mu\text{M}$ . Altogether, these results are consistent with T306-GCaMP6f being present in the triadic SR membrane and exhibiting an affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  similar to that of free GCaMP6f.

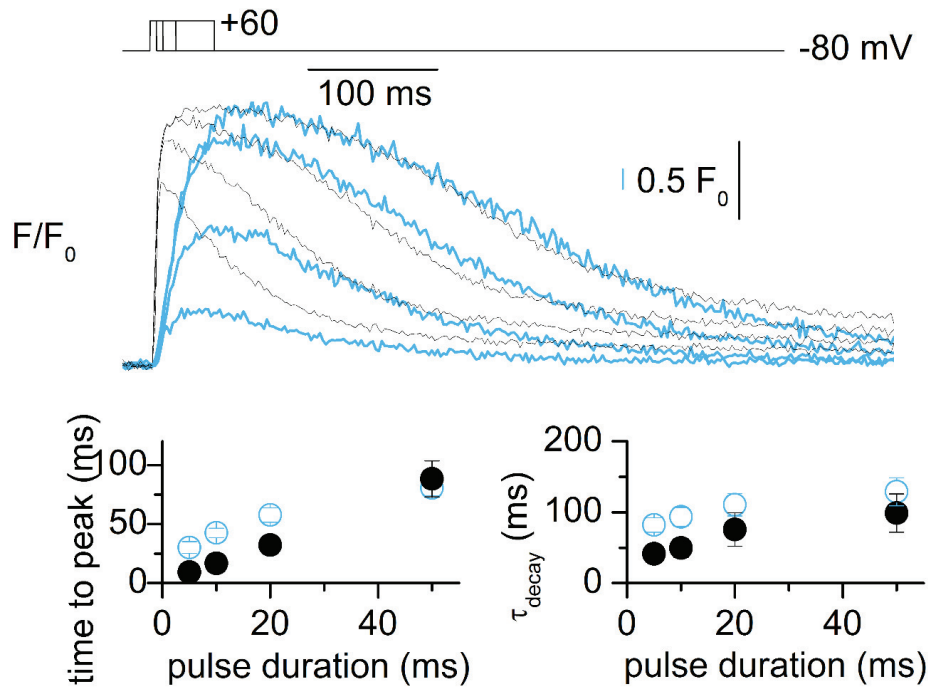
### Comparing rhod-2 $\text{Ca}^{2+}$ transients to GCaMP6f and T306-GCaMP6f- $\text{Ca}^{2+}$ transients.

Figure 2A shows fluorescence transients triggered by large voltage-clamp depolarizing pulses of increasing duration, evoking maximal SR  $\text{Ca}^{2+}$  release, in a fiber expressing GCaMP6f and dialyzed with rhod-2. Transients were calculated by averaging fluorescence over the entire scanned line. The two probes generated fluorescence transients of similar  $F/F_0$  maximal amplitude but the overall time-course of GCaMP6f transients (thick traces) clearly lagged behind that of rhod-2 (thin traces), as also shown from the mean values for time to peak and time constant of decay of the fluorescence transients from 3 fibers tested in the same conditions (graphs at the bottom). Pairs of traces shown in Fig. 2B were obtained in the same experimental conditions, but from a fiber challenged by voltage pulses of increasing amplitude. Again there is a considerable delay in the GCaMP6f response as compared to that of rhod-2, which is particularly dramatic for the low levels of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release activation for which GCaMP6f barely detects the fast early  $\text{Ca}^{2+}$  rise seen by rhod-2 and keeps rising at times where rhod-2 has reached a more or less steady level. This time-course distortion is due to the known slow kinetics of the GCaMP probes. Although a complex kinetic model would be necessary to strictly account for the kinetic steps of the  $\text{Ca}^{2+}$ -GCaMP reaction (e.g. Helassa et al., 2015) we resumed it to a simple binding equilibrium and we adjusted the GCaMP6f rate constants values to best match the rhod-2 and GCaMP6f calculated  $\text{Ca}^{2+}$  signals.

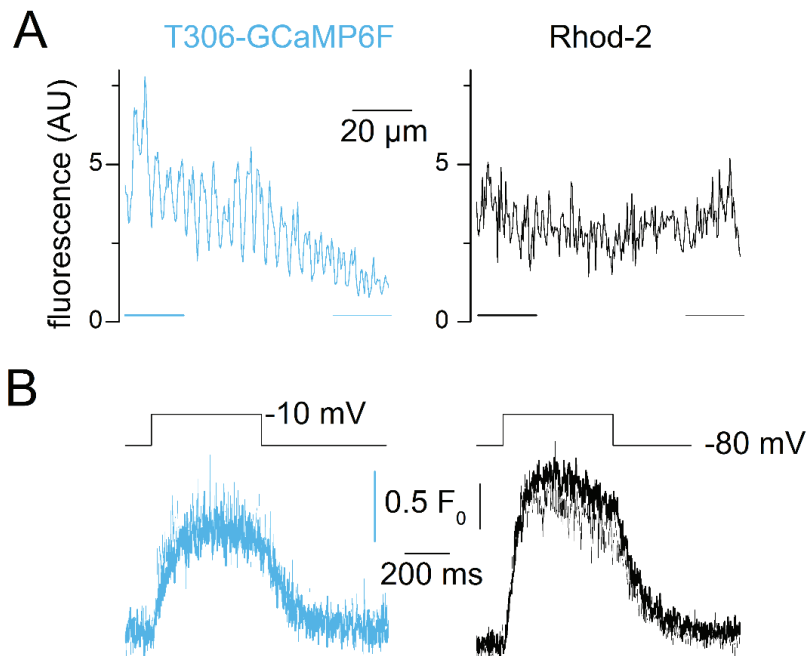
$\text{Ca}^{2+}(t)$  was calculated from fluorescence ( $F(t)$ ) according to :

$$\text{Ca}^{2+} = \frac{k_{\text{off}} (F - F_{\text{min}}) + \frac{dF}{dt}}{k_{\text{on}}(F_{\text{max}} - F)}$$

For rhod-2 we used a  $k_{\text{off}}$  value of 0.13  $\text{ms}^{-1}$  (Sztretye et al., 2011) and a value for  $k_{\text{on}}$  so that  $K_D$  equals 1.63  $\mu\text{M}$ . For GCaMP6f, the calibration value of 0.65  $\mu\text{M}$  for  $K_D$  was used and values for  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$  were adjusted. For both rhod-2 and GCaMP6f values for  $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}$  (ratio of fluorescence in saturating  $\text{Ca}^{2+}$  to the corresponding value in absence of  $\text{Ca}^{2+}$ ) were also adjusted. The inset in Fig. 2A shows the superimposed changes in free  $\text{Ca}^{2+}$  calculated from rhod-2 and from GCaMP6f for the shortest pulse.



**Figure 3. Kinetic features of T306 GCaMP6f  $\text{Ca}^{2+}$  transients elicited by short depolarizing pulses.** Simultaneous T306-GCaMP6f (thick traces) and rhod-2 (thin traces) fluorescence transients detected from a muscle fiber in response to the depolarizing pulse protocol shown on top. The two graphs at the bottom report mean values for the time to peak  $F/F_0$  and for the time constant of  $F/F_0$  decay ( $\tau_{\text{decay}}$ ) after repolarization, from 4 fibers expressing T306-GCaMP6f, loaded with rod-2, and stimulated with the same voltage-clamp protocol.



**Figure 4.  $\text{Ca}^{2+}$  transients within a muscle fiber region exhibiting a gradient of T306-GCaMP6f expression.** (A) T306-GCaMP6f and rhod-2 distribution along a line scanned in a fiber region exhibiting a T306-GCaMP6f gradient of expression. (B) voltage-activated T306-GCaMP6f and rhod-2 transients recorded within the high- (thick traces) and low-expression region (thin traces) of T306-GCaMP6f.

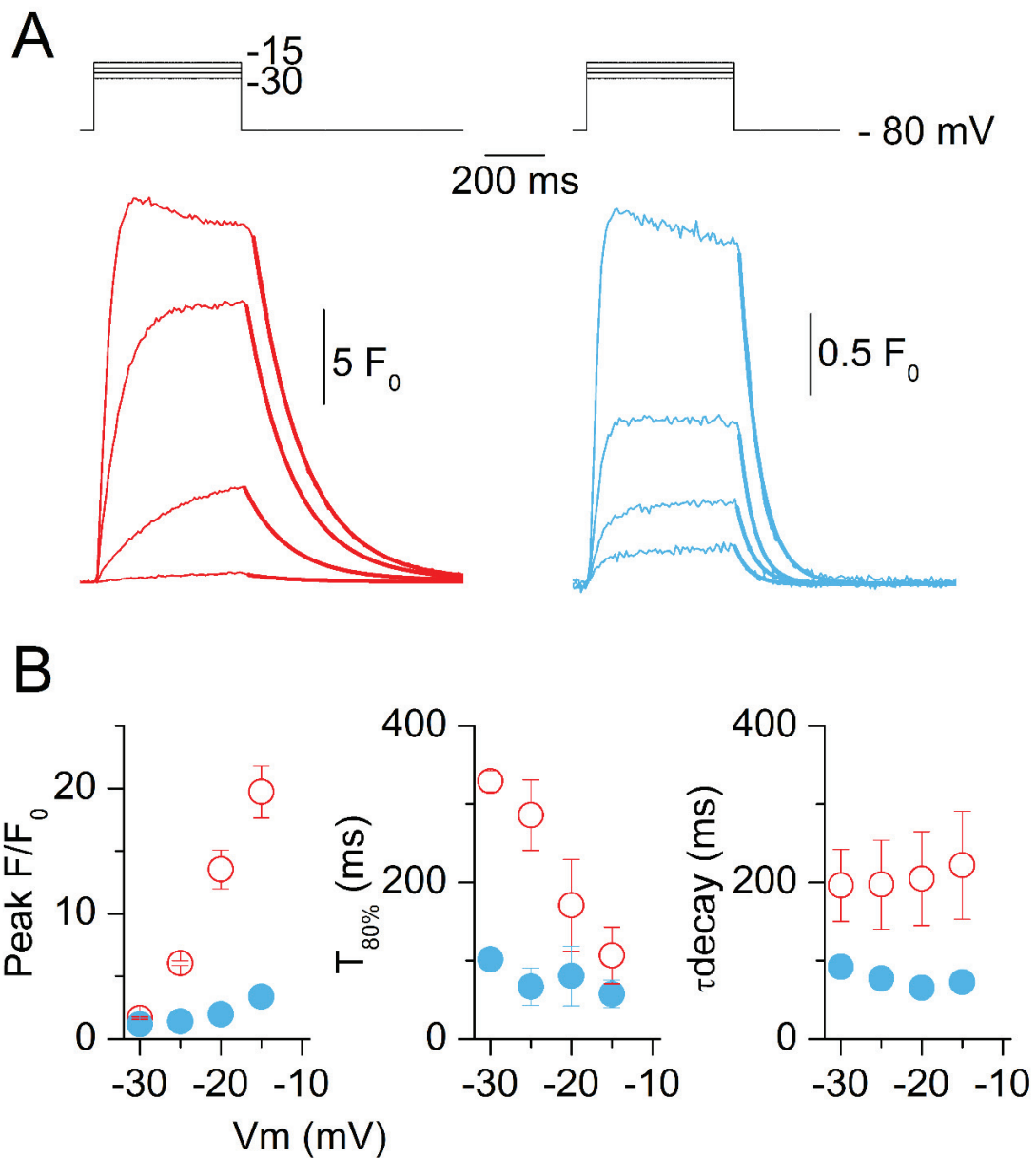


Transients were calculated with values for  $F_{\max}/F_{\min}$  of 27 and 42 for rhod-2 and GCaMP6f, respectively and with GCaMP6f  $k_{\text{on}}$  and  $k_{\text{off}}$  values of  $0.018 \mu\text{M}\cdot\text{ms}^{-1}$  and  $0.012 \text{ms}^{-1}$ , respectively. In the two other fibers tested in these same conditions a similar reasonable consistency between the calculated rhod-2 and GCaMP6f  $\text{Ca}^{2+}$  transients was obtained with the same values for the rate constants and for the GCaMP6f  $F_{\max}/F_{\min}$  value, provided that some adjustment was made for rhod-2  $F_{\max}/F_{\min}$ . Thus, twice and ten times lower association and dissociation rate constants for GCaMP6f than for rhod-2, respectively, appears to reasonably account for the  $\text{Ca}^{2+}$  binding kinetics of GCaMP6f.

Figure 3 presents a set of data equivalent to the one in Fig.2A, but from fibers expressing T306-GCaMP6f. There was no striking qualitative difference between the overall time-course of GCaMP6f and T306-GCaMP6f in terms of global kinetics (as compared to the simultaneously measured rhod-2 signals) although, on average, mean values for time to peak and for time constant of decay were closer to those from the rhod-2 transients. The peak amplitude of the rhod-2 transients in this series of experiments was smaller than in the parallel series of experiments in fibers expressing T306-GCaMP6f (Fig. 2). Reason for this is unclear and may be related to the fact that resting rhod-2 fluorescence in these experiments tended to increase with time, raising doubt as to whether the rhod-2  $F_0$  level was reliable. In order to test whether expression of the probe may have affected SR  $\text{Ca}^{2+}$  release we compared transients at two locations of a fiber exhibiting a strong gradient of T306-GCaMP6f expression: Figure 4A shows the T306-GCaMP6f (left) and rhod-2 (right) resting fluorescence intensity profile along the scanned line. The bottom panels show the T306-GCaMP6f (left) and rhod-2 (right) fluorescence transients measured in response to a pulse from -80 to -10 mV in the high expression region of the line (thick traces) and in the lower expression region of the line (thin traces). Despite an  $\sim 5$  times difference in the resting level ( $F_0$ ) of T306-GCaMP6f fluorescence between the two regions of the line, both the rhod-2 and the T306-GCaMP6f  $F/F_0$  transients were similar, providing no indication that probe expression/over-expression strongly affects SR  $\text{Ca}^{2+}$  release.

#### **Voltage-dependent GCaMP6f and T306-GCaMP6f $\text{Ca}^{2+}$ transients.**

Further comparison between fluorescence transients from GCaMP6f- and T306-GCaMP6f expressing fibers was made in the absence of rhod-2, in response to 500 ms pulses to different voltage levels. Figure 5 shows representative transients from the two probes, elicited in the presence of extracellular BTS. For such long pulses, the presence of BTS was not sufficient to completely block contraction at large depolarizing voltage levels. For this reason, most measurements were taken with pulses up to values

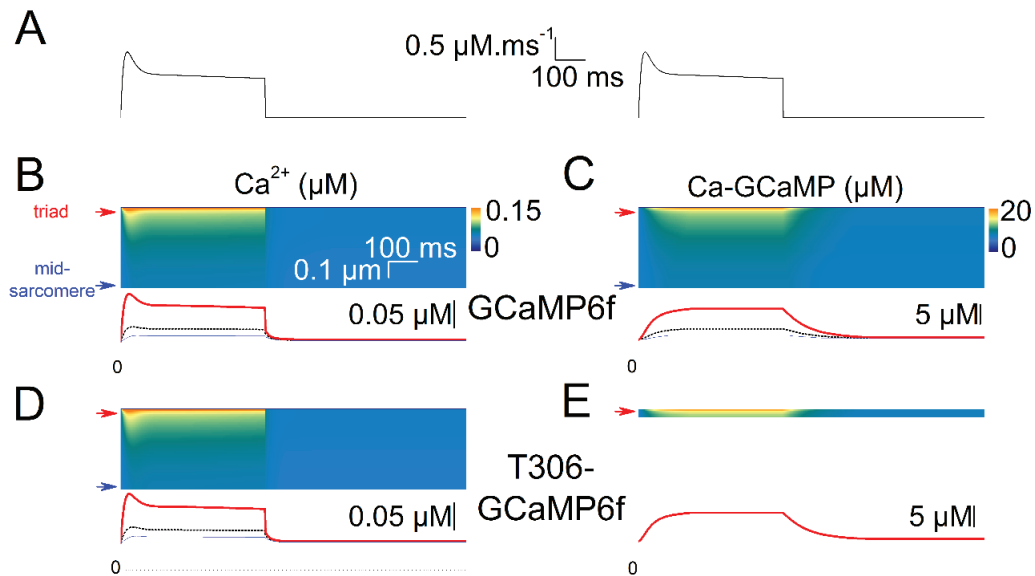


**Figure 5. Voltage-dependent GCaMP6f and T306-GCaMP6f  $Ca^{2+}$  transients.** (A) Illustrative examples of fluorescence transients from muscle fibers expressing GCaMP6f (left) or T306-GCaMP6f (right) in response to 500 ms-long depolarizing pulses of increasing amplitude. (B) Mean voltage-dependence of GCaMP6f (open circles) and T306-GCaMP6f (filled circles) fluorescence transients  $F/F_0$  peak amplitude (Peak  $F/F_0$ ), time to 80% peak amplitude ( $T_{80\%}$ ) and time-constant of decay ( $\tau_{decay}$ ) from 3 and 4 muscle fibers expressing GCaMP6f and T306-GCaMP6f, respectively.

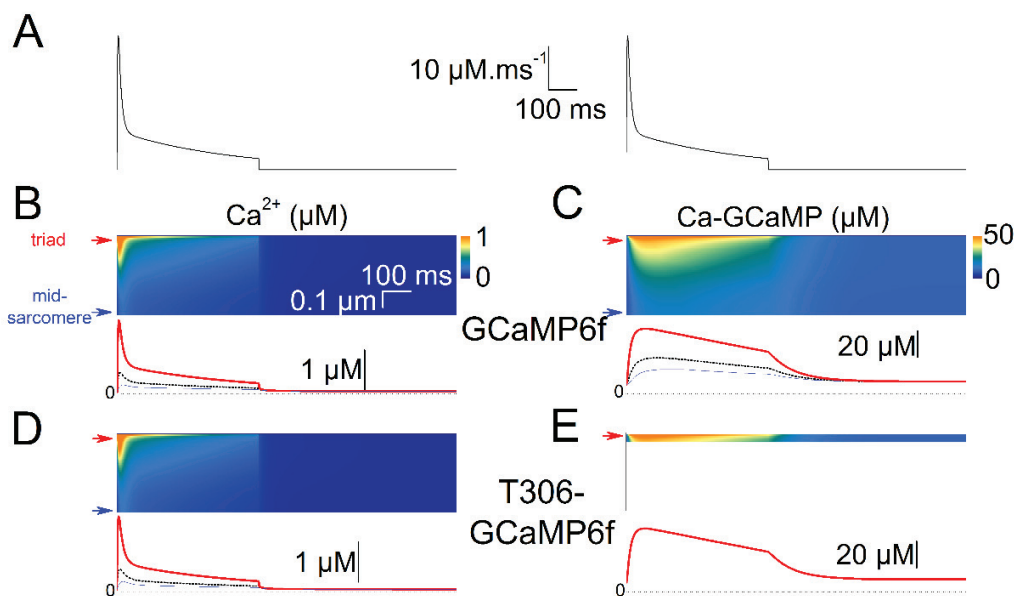
rarely exceeding -10 mV. GCaMP6f and T306-GCaMP6f transients looked similar and there was no stringent qualitative feature that would irrefutably allow identification of which transients corresponded to which probe. Quantitative features were compared in a few fibers of each group that were all stimulated by pulses to -30, -25, -20 and -15 mV and for which there was no indication of fiber movement. There were quantitative differences between the two series: T306-GCaMP6f transients exhibited  $F/F_0$  peak amplitude values much smaller than those of GCaMP6f transients (Fig. 5B, left); the rate of rise, estimated from the time to reach 80% of the peak fluorescence was faster for T306-GCaMP6f transients at the low values of voltage activation; the time constant of T306-GCaMP6f fluorescence decay after the end of the pulses exhibited values twice smaller than those from GCaMP6f transients.

### **Model simulation of the changes in $Ca^{2+}$ and of the corresponding GCaMP6f response, from the triadic space to the center of the sarcomere**

Above results show that, following SR  $Ca^{2+}$  release, GCaMP6f and T306-GCaMP6f generate fluorescence changes with a qualitatively similar time-course, a feature that was intuitively not expected considering that the targeted probe should experience much larger changes in  $Ca^{2+}$  concentration than the bulk (e.g. Pape et al., 1995). In order to quantitatively explore this issue and determine whether the differences (or absence of differences) between the signals from the two probes are consistent, we made model simulations of the changes in free  $Ca^{2+}$  and corresponding Ca-probe complexes occurring along a quarter of sarcomere distance from the  $Ca^{2+}$  release site. The model was implemented as described in Methods.  $Ca^{2+}$  binding to both GCaMP6f and T306-GCaMP6f was assumed to occur with the rate constants found to match the GCaMP6f and rhod-2  $Ca^{2+}$  transients (Fig. 2A). Because of the difference (and related uncertainty) regarding the dynamic range of the two probes, only the predicted time-courses of change in Ca-GCaMP6f and in Ca-T306-GCaMP6f were compared. Figure 6 illustrates the model predictions in response to a small  $Ca^{2+}$  release (peak value of  $1.5 \mu M.ms^{-1}$ , Fig. 6A). The images in Fig. 6 B, D show the calculated change in free  $Ca^{2+}$  along a  $0.5 \mu m$  distance from the release site (top), in the presence of GCaMP6f or T306-GCaMP6f, respectively, while images in Fig. 6 C, E show the corresponding changes in  $Ca^{2+}$  bound to each of the two probes. The three superimposed traces below each image show the corresponding maximum change (at the release site, thick trace), minimum change ( $0.5 \mu m$  away/mid-sarcomere, thin trace) and the average change (dotted trace) which would correspond to the experimentally detected signal. In each panel, the straight dashed line at the bottom corresponds to the zero level. Results show that, despite a very substantial gradient of  $Ca^{2+}$  change along the distance from



**Figure 6. Model simulation of the spatial gradient of Ca<sup>2+</sup> and of calcium bound to the GCaMP6f probes along a 0.5 μm distance from the Ca<sup>2+</sup> release site following a low level of SR Ca<sup>2+</sup> release activation. (A)** Synthetic Ca<sup>2+</sup> release input flux. **(B)** Spatial gradient of Ca<sup>2+</sup> change and of corresponding Ca<sup>2+</sup> bound to GCaMP6f **(C).** **(D)** Spatial gradient of Ca<sup>2+</sup> change and of corresponding Ca<sup>2+</sup> bound to T306-GCaMP6f **(E).** In B-E, traces underneath the image show the time-course of change in the given parameter at the triad level (thick trace), at the mid-sarcomere level (thin trace) and the average change throughout the distance (dotted trace).

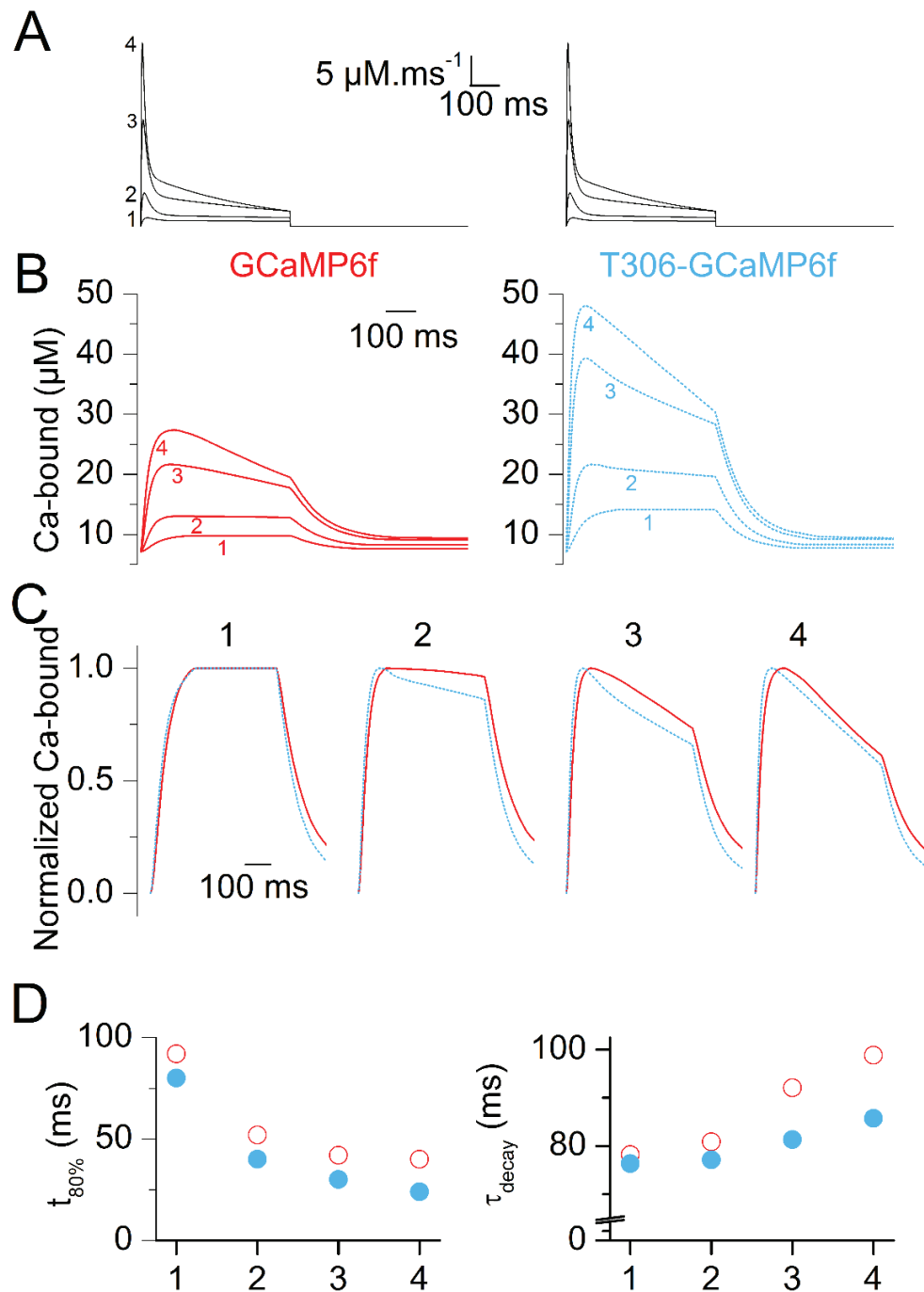


**Figure 7. Model simulation of the spatial gradient of Ca<sup>2+</sup> and of calcium bound to the GCaMP6f probes along a 0.5 μm distance from the Ca<sup>2+</sup> release site following a large level of SR Ca<sup>2+</sup> release activation. (A)** Synthetic Ca<sup>2+</sup> release input flux. **(B)** Spatial gradient of Ca<sup>2+</sup> change and of corresponding Ca<sup>2+</sup> bound to GCaMP6f **(C).** **(D)** Spatial gradient of Ca<sup>2+</sup> change and of corresponding Ca<sup>2+</sup> bound to T306-GCaMP6f **(E).** In B-E, traces underneath the image show the time-course of change in the given parameter at the triad level (thick trace), at the mid-sarcomere level (thin trace) and the average change throughout the entire distance (dotted trace).

the release site, the average time-course of  $\text{Ca}^{2+}$  bound to the probe did not stringently differ between the targeted and the non-targeted version of the probe. An identical representation of the predictions made in response to a strong SR  $\text{Ca}^{2+}$  release flux (peak value of  $31.6 \mu\text{M}\cdot\text{ms}^{-1}$ ) is shown in Fig. 7, from which the same conclusions could be drawn. Indeed, despite a tenfold difference in peak  $\text{Ca}^{2+}$  between the release site and the mid-sarcomere region, the average time-course of  $\text{Ca}^{2+}$  bound to GCaMP6f and T306-GCaMP6f was similar. Comparison between the predicted time-course of  $\text{Ca}^{2+}$  bound to the two probes is more explicitly made in Fig. 8 which shows the average changes in response to 4 different SR  $\text{Ca}^{2+}$  release input fluxes of distinct peak amplitude and waveform (labelled 1-4, Fig. 8A). Figure 8B shows the corresponding absolute average changes in Ca-GCaMP6f (left) and Ca-T306-GCaMP6f (right), while Fig. 8C shows the same changes in Ca-GCaMP6f and Ca-T306-GCaMP6f after normalization, superimposed for each release flux condition. Values for the time to reach 80% of the peak transient and for the time constant of decay are reported in Fig. 8D: differences in time-course of rise and of decay of the transients from the two probes were qualitatively similar to those observed experimentally (Fig. 5).

#### **Voltage-activated local changes in T306-GCaMP6f fluorescence.**

Despite reporting  $\text{Ca}^{2+}$  changes with corrupted kinetics and within a limited concentration range, one great advantage of T306-GCaMP6f over diffusible  $\text{Ca}^{2+}$  probes is its potential to track the occurrence and duration of triadic  $\text{Ca}^{2+}$  changes at various locations of a given muscle fiber and to thus provide insights into the spatial variability of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release upon activation of a muscle fiber. To this aim, we examined the changes in T306-GCaMP6f fluorescence at different positions along the scanned line. In these experiments a slow scan frequency of 7.7 ms per line was systematically used to improve the signal to noise ratio. Illustrative examples are presented in Fig. 9 which shows local changes from a muscle fiber stimulated by 0.5-s long depolarizing pulses to -25 (A), -20 (B) and -15 mV (C). In each panel the top-left image corresponds to the raw line-scan fluorescence record, with the baseline fluorescence intensity profile along the line next to it, on the left. The corresponding  $F/F_0$  image is shown on the right: for this,  $F/F_0$  was calculated for series of 5 pixels ( $0.1 \mu\text{m}$  per pixel) along the line, each series centered on one peak of baseline fluorescence intensity. The 5 noisy traces underneath correspond to changes in  $F/F_0$  at adjacent triadic locations within the region highlighted by a red box in the  $F/F_0$  image. The smooth trace at the bottom represents the average change in  $F/F_0$  throughout the entire line. Overall, Fig. 9 illustrates the fact that there was remarkable consistency in terms of occurrence, time-course and amplitude of the transients at the different locations, at all voltage levels. The series of traces in Fig. 9A illustrates one rare example of a particular location that could be identified where no response was detected, but otherwise,

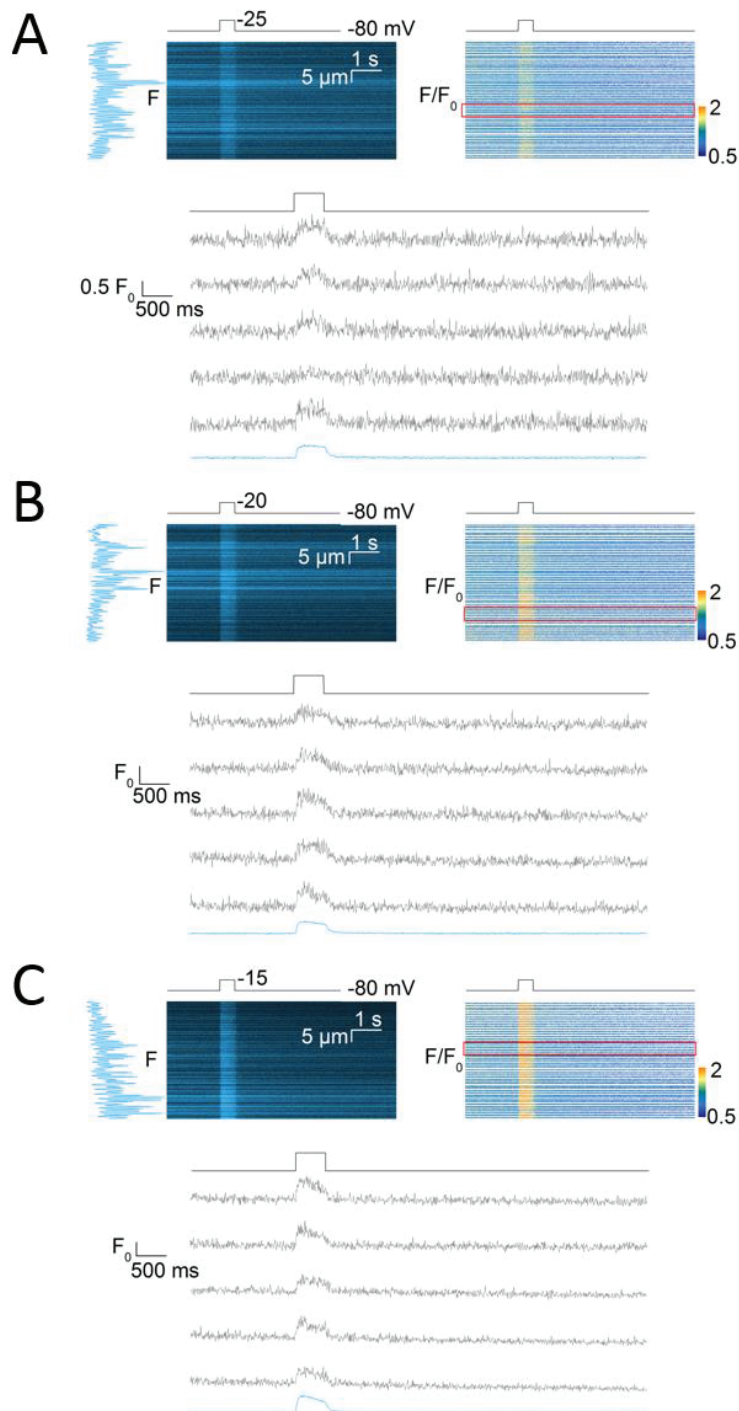


**Figure 8. Model simulation of the average changes in  $\text{Ca}^{2+}$  bound to GCaMP6f and to T306-GCaMP6f following different levels of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release activation. (A) Superimposed synthetic  $\text{Ca}^{2+}$  release input fluxes used for the simulation (1-4). (B) Calculated average changes in  $\text{Ca}^{2+}$  bound to GCaMP6f (left) or to T306-GCaMP6f (right) following each of the four  $\text{Ca}^{2+}$  release input fluxes shown in (A). (C) Normalized time course of the calculated average changes in  $\text{Ca}^{2+}$  bound to GCaMP6f (continuous traces) and to T306-GCaMP6f (dotted traces) in response to the  $\text{Ca}^{2+}$  release fluxes shown in (A). Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  bound to each of the two probes for a same given input flux are shown superimposed. (D) Dependence upon the input flux (1-4) of the time to reach 80% of the peak change in  $\text{Ca}^{2+}$  bound to GCaMP6f (left, open circles) and T306-GCaMP6f (filled circles) and corresponding values for the time constant of decay (right) after the end of the release flux.**

within the limits of the uncertainty due to the noise, local transients were very similar throughout. In order to quantitatively assess the spatial variability of the T306-GCaMP6f response, the onset time, peak amplitude and full width at half-maximum (FWHM) of the signal were measured at 8 random locations along lines scanned in 6 muscle fibers depolarized by pulses to values ranging between -25 and -10 mV. Figure 10 reports the individual values for each parameter in the different fibers. Values for peak amplitude (peak  $F/F_0$ ), full width at half-maximum (FWHM) and onset time ( $T_0$ , relative to time of pulse initiation) for each of the 8 T306-GCaMP6f local fluorescence transients are reported in Fig 10B, in the different fibers (symbol-coded). Traces on the top show examples of most differing fluorescence transients among the 8 tested triadic regions of lines scanned in the filled-square-coded fiber. Overall results show that, within the limits imposed by the sampling rate and signal to noise level, there was limited detectable variability in the onset time, peak amplitude and FWHM of the transients detected in response to a given voltage pulse, at distinct triadic locations of a given muscle fiber.

## Discussion

Progress in understanding RYR1 physiological function and regulation in normal and disease skeletal muscle requires improving our capabilities to detect RYR1 channel activity in intact differentiated muscle fibers, ultimately down to the single channel resolution. The present work is the first attempt to detect  $Ca^{2+}$  signals with a genetically encoded probe targeted to the triadic region of differentiated skeletal muscle fibers. Primary evidence that we succeeded is the typical pattern of expression of T306-GCaMP6f, similar to the previous observed one when expressing in the same preparation either RYR1 channels (Lefebvre et al., 2011) or T306-fused with biosensors of the Mermaid family from which functional assays proved that the T306 domain did convey the biosensors to the triadic SR membrane (Sanchez et al., 2018). Of interest, we expect the probe to be in close vicinity of the RYR1 channels because the T306 sequence contains the KEKE domain believed to be essential for triadin binding to RYR1, and also to calsequestrin (Kobayashi et al., 2000; Lee et al., 2004). Two aspects related to targeting of the probe need then to be considered: first, the possibility that the T306 sequence and/or the specific triadic nano-environment alter the intrinsic properties of the probe. Results from our calibration suggest that the affinity for  $Ca^{2+}$  does not substantially differ between GCaMP6f and T306-GCaMP6f. In addition, the overall similarities between the time-course of the voltage-activated fluorescence transients from the two probes proved to be consistent according to quantitative model simulations assuming identical kinetic properties for the two. The dynamic range of the response of the two probes appear though to substantially differ, with GCaMP6f generating transients of peak  $F/F_0$  values routinely 5 times greater



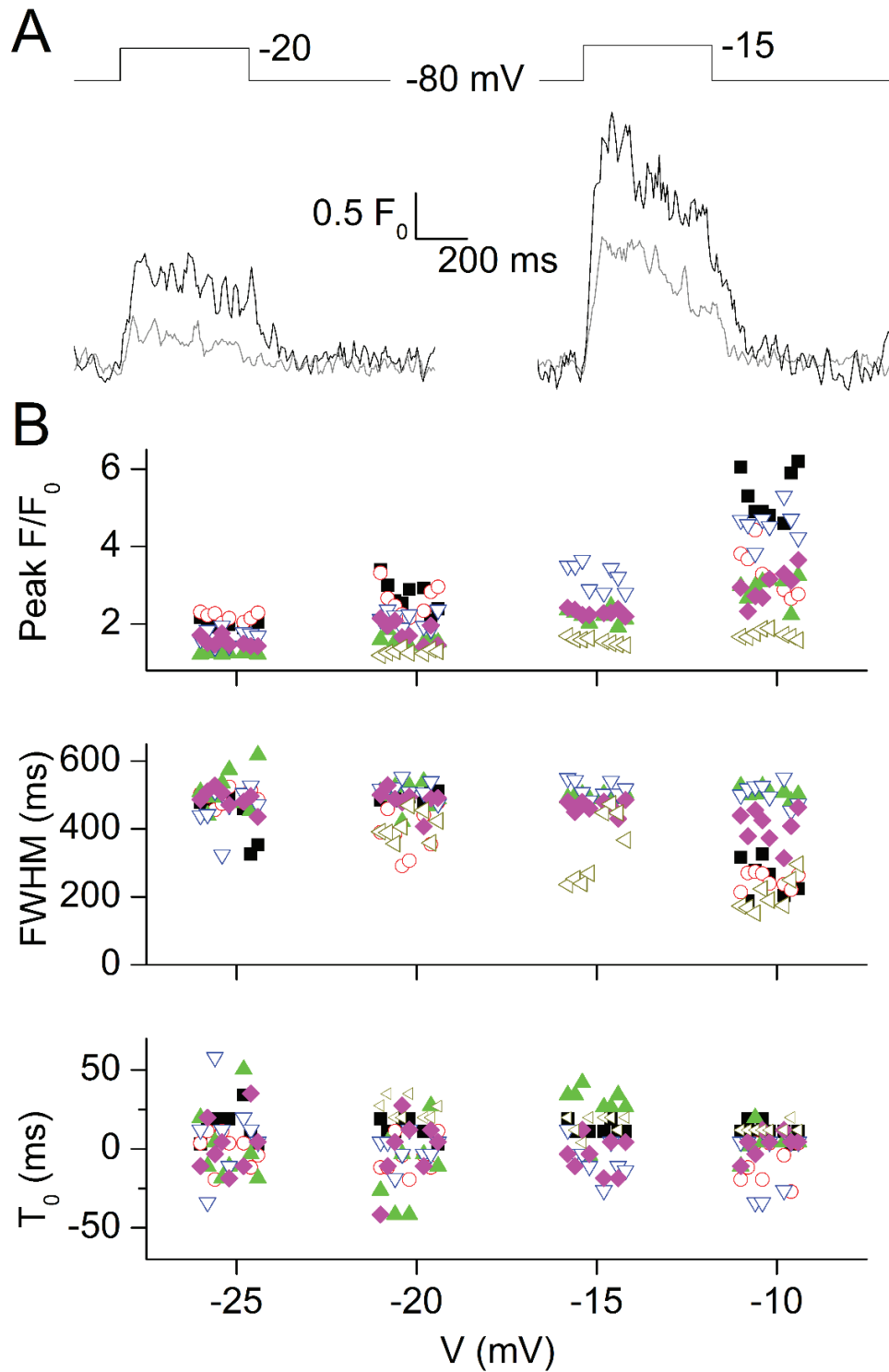
**Figure 9. Local changes in T306-GCaMP6f fluorescence in response to different levels of SR Ca<sup>2+</sup> release activation.** Line-scan images of T306-GCaMP6f fluorescence are from the same muscle fiber depolarized for 500 ms to -25 (A), -20 (B) and -15 mV (C). In each panel the raw line-scan fluorescence record is shown on the left with the F<sub>0</sub> intensity profile along the line next to it. The corresponding F/F<sub>0</sub> image is shown on the right: values were calculated for series of 5 adjacent pixels centered on each of the successive peaks of F<sub>0</sub> fluorescence along the line. The 5 traces at the bottom correspond to changes in F/F<sub>0</sub> at adjacent locations within the red box region superimposed to the F/F<sub>0</sub> image. The smooth trace at the bottom corresponds to the average change in F/F<sub>0</sub> throughout the entire line.



than T306-GCaMP6f under the same conditions of stimulation. This is a shame as we obviously would have preferred the opposite to be the case. One possible explanation would be if resting triadic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is maintained at a much elevated level as compared to the bulk, so that T306-GCaMP6f would be heavily  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated at rest. This is however very unlikely because it would require micromolar levels of resting free  $\text{Ca}^{2+}$  to explain the 5 times difference and then, following SR  $\text{Ca}^{2+}$  release, the time-course of  $\text{Ca}^{2+}$  bound to T306-GCaMP6f would strongly differ from that of GCaMP6f. The most likely explanation is then that T306 fusion to the probe alters its quantum yield, in agreement with the difference between our estimates of  $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}$  for T306-GCaMP6f as compared to commonly reported values for GCaMP6f. The other issue to be considered is whether expression of the probe at the triad may affect RYR1 channel activity. Results shown in Fig. 4 provide indication that this is not the case but they do not definitely rule out the possibility, as even a very low expression level of T306-GCaMP6f could be speculated to affect SR  $\text{Ca}^{2+}$  release.

GCaMP6f and T306-GCaMP6f fluorescence transients are slower than rhod-2 transients, confirming the kinetic limitations of these probes. Conversely, the time-course of GCaMP6f and T306-GCaMP6f transients do not strongly differ from each other, even though the triadic probe experiences larger changes in  $\text{Ca}^{2+}$  than the bulk. Kinetic delays of the probe's response and the fact that GCaMP6f detects the average  $\text{Ca}^{2+}$  throughout the sarcomere both contribute to dampen detection of differences in the actual time-course of  $\text{Ca}^{2+}$  changes at- and away from- the triad with this approach. In the future, one possibility to assess this gradient would be to compare the T306-GCaMP6f response with that of GCaMP6f targeted to the mid-sarcomere region. As for now, we found that overall experimental observations with T306-GCaMP6f are consistent with model predictions based on current quantitative knowledge of the main processes involved in the control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .

Still, one major interest of the targeted probe is the possibility to simultaneously assess the behavior of distinct  $\text{Ca}^{2+}$  release regions of a same muscle fiber. We found that such local voltage-activated T306-GCaMP6f fluorescence transients exhibit remarkably constant features at a given level of activation. An alternative way to look at it is to highlight what was not detected: along this, we initially thought that, at low levels of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release activation, we would be able to identify phenomena such as activation of a limited number of triads, or  $\text{Ca}^{2+}$  transients occurring after a substantial delay following the onset of the pulse, but we did not, or extremely rarely (e.g. Fig. 9A). We also found no routine evidence for temporally separated SR  $\text{Ca}^{2+}$  release activity during a pulse, or substructure features that could witness sequential activation or inactivation of sub-clusters of RYR1 channels. In the only cases where such



**Figure 10. Properties of the local changes in T306-GCaMP6f fluorescence upon SR  $\text{Ca}^{2+}$  release activation.** (A) Illustrative examples of 2 most differing T306-GCaMP6f fluorescence transients at distinct triadic locations of a given muscle fiber depolarized to -20 and -15 mV. (B) Individual values for peak  $F/F_0$ , FWHM and onset time ( $T_0$ , relative to time of pulse initiation) from local T306-GCaMP6f fluorescence transients collected as shown in Fig. 9, at 8 random locations along lines scanned in 6 muscle fibers depolarized to -25, -20, -15 and -10 mV. Each symbol corresponds to a different fiber.

behavior was observed there was strong suspicion that the fluorescence transients were corrupted by local contractile movements (not illustrated). Within the resolution limits of the approach, overall results thus concur with a remarkably homogeneous control of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release by the t-tubule membrane voltage in healthy muscle, with very limited local versatility.

In conclusion, although the high  $\text{Ca}^{2+}$  affinity and kinetic delays of T306-GCaMP6f limit its use as a faithful triadic  $\text{Ca}^{2+}$  reporter, the sensor provides unique access to the gross activity of a population of individual triads inside a muscle fiber. This may prove useful to characterize specific disease conditions associated with erratic behavior of RYR1 channels. This would be the case, for instance, of myotubular myopathy for which there is indication for spatially localized failure of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release (Kutchukian et al., 2016) or of several situations presumably associated with a leaky behavior of the channels for which there is no information so far as how it operates in terms of RYR1 channel or RYR1 channel clusters activity (e.g. Lyfenko et al., 2007; Bellinger et al., 2009).

## Acknowledgements

We are indebted to Vincenzo Sorrentino for suggesting the use of the T306 triadin domain and for providing a corresponding plasmid DNA to make the constructs. This work was supported by grants from CNRS, INSERM, the Université Claude Bernard - Lyon 1 to the Institut NeuroMyoGène. This work was also supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon: Alliance MyoNeurALP program, project # 2.3.1.3 to V. Jacquemond). The authors declare no competing financial interests. Author contributions: C. Sanchez and C. Berthier designed and/or prepared the plasmid constructs. C. Sanchez and V. Jacquemond conducted the electrophysiological and fluorescence measurements on muscle fibers and performed the related analysis. All authors contributed to data analysis and interpretation and to manuscript preparation. V. Jacquemond and C. Sanchez conceived and coordinated the study, designed the experiments and wrote the manuscript.

## References

- Barone, V., D. Randazzo, V. Del Re, V. Sorrentino, and D. Rossi. 2015. Organization of junctional sarcoplasmic reticulum proteins in skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 36:501-515.
- Baylor, S.M., W.K. Chandler, and M.W. Marshall. 1982. Use of metallochromic dyes to measure changes in myoplasmic calcium during activity in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 331:139-177.
- Bellinger, A.M., S. Reiken, C. Carlson, M. Mongillo, X. Liu, L. Rothman, S. Matecki, A. Lacampagne, and A.R. Marks. 2009. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.* 15:325-330.
- Braubach, P., M. Orynbayev, Z/ Andronache, T. Hering, G.B. Landwehrmeyer, K.S. Lindenberg, and W. Melzer. 2014. Altered Ca<sup>2+</sup> signaling in skeletal muscle fibers of the R6/2 mouse, a model of Huntington's disease. *J. Gen. Physiol.* 144:393-413.
- Brum, G., E. Ríos, and E. Stéfani. 1988. Effects of extracellular calcium on calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 398:441-473.
- Chen, T.W., T.J. Wardill, Y. Sun, S.R. Pulver, S.L. Renninger, A. Baohan, E.R. Schreiter, R.A. Kerr, M.B. Orger, V. Jayaraman, L.L. Looger, K. Svoboda, and D.S. Kim. 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499:295-300.
- Csernoch, L., J. Zhou, M.D.Stern, G. Brum, and E. Ríos. 2004. The elementary events of Ca<sup>2+</sup> release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle. *J. Physiol.* 557:43-58.
- Csernoch, L., S. Pouvreau, M. Ronjat, and V. Jacquemond. 2008. Voltage-activated elementary calcium release events in isolated mouse skeletal muscle fibers. *J. Membr. Biol.* 226:43-55.

- Despa, S., B. Shui, J. Bossuyt, D. Lang, M.I. Kotlikoff, and D.M. Bers. 2014. Junctional cleft  $[Ca^{2+}]_i$  measurements using novel cleft-targeted  $Ca^{2+}$  sensors. *Circ. Res.* 115:339-347.
- Feldmeyer, D., W. Melzer, and B. Pohl. 1990. Effects of gallopamil on calcium release and intramembrane charge movements in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 421:343-362.
- Helassa, N., X.H. Zhang, I.Conte, J. Scaringi, E. Esposito, J. Bradley, T. Carter, D. Ogden, M. Morad, and K. Török. 2015. Fast-Response Calmodulin-Based Fluorescent Indicators Reveal Rapid Intracellular Calcium Dynamics. *Sci. Rep.* 5:15978.
- Hernández-Ochoa, E.O., R.O. Olojo, R.T. Rebbeck, A.F. Dulhunty, and M.F. Schneider. 2014.  $\beta$ 1a490-508, a 19-residue peptide from C-terminal tail of Cav1.1  $\beta$ 1a subunit, potentiates voltage-dependent calcium release in adult skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 106:535-547.
- Hollingworth, S., and S.M. Baylor. 2013. Comparison of myoplasmic calcium movements during excitation-contraction coupling in frog twitch and mouse fast-twitch muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 141:567-583.
- Jacquemond, V. 1997. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73:920-928.
- Klein, M.G., H. Cheng, L.F. Santana, Y.H. Jiang, W.J. Lederer, and M.F. Schneider. 1996. Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* 379:455-458.
- Kobayashi, Y.M., B.A. Alseikhan, and L.R. Jones. 2000. Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.* 275:17639-17646.
- Kovacs, L., E. Rios, and M.F. Schneider. 1983. Measurement and modification of free calcium transients in frog skeletal muscle fibres by a metallochromic indicator dye. *J. Physiol.* 343:161-196.
- Laver D.R. 2006. Regulation of ryanodine receptors from skeletal and cardiac muscle during rest and excitation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33:1107-1113.
- Lee, J.M., S.H. Rho, D.W. Shin, C. Cho, W.J. Park, S.H. Eom, J. Ma, and D.H. Kim. 2004. Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor are involved in the interaction with triadin. *J. Biol. Chem.* 279:6994-7000.
- Lefebvre, R., C. Legrand, E. González-Rodríguez, L. Groom, R.T. Dirksen, and V. Jacquemond . 2011. Defects in  $Ca^{2+}$  release associated with local expression of pathological ryanodine receptors in mouse muscle fibres. *J. Physiol.* 589:5361-5382.
- Legrand, C., E. Giacomello, C. Berthier, B. Allard, V. Sorrentino, and V. Jacquemond. 2008. Spontaneous and voltage-activated  $Ca^{2+}$  release in adult mouse skeletal muscle fibres expressing the type 3 ryanodine receptor. *J. Physiol.* 586:441-457.

- Lyfenko, A.D., S. Ducreux, Y. Wang, L. Xu, F. Zorzato, A. Ferreiro, G. Meissner, S. Treves, and R.T. Dirksen. 2007. Two central core disease (CCD) deletions in the C-terminal region of RYR1 alter muscle excitation-contraction (EC) coupling by distinct mechanisms. *Hum. Mutat.* 28:61-68.
- Manno, C., L.C. Figueroa, D. Gillespie, R. Fitts, C. Kang, C. Franzini-Armstrong, and E. Rios. 2017. Calsequestrin depolymerizes when calcium is depleted in the sarcoplasmic reticulum of working muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 114:E638-E647.
- Meissner, G. 2002. Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front. Biosci.* 7:d2072-d2080.
- Palade, P., and J. Vergara. 1982. Arsenazo III and antipyrylazo III calcium transients in single skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 79:679-707.
- Sanchez, C., C. Berthier, B. Allard, J. Perrot, C. Bouvard, H. Tsutsui, Y. Okamura, and V. Jacquemond. 2018. Tracking the sarcoplasmic reticulum membrane voltage in muscle with a FRET biosensor. *J. Gen. Physiol.* 150:1163-1177.
- Sárközi, S., P. Szentesi, I. Jona, and L. Csernoch. 1996. Effects of cardiac glycosides on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 495:611-626.
- Shang, W., F. Lu, T. Sun, J. Xu, L.L. Li, Y. Wang, G. Wang, L. Chen, X. Wang, M.B. Cannell, S.Q. Wang, and H. Cheng. 2014. Imaging Ca<sup>2+</sup> nanosparks in heart with a new targeted biosensor. *Circ. Res.* 114:412-420.
- Sorrentino, V. 2011. Sarcoplasmic reticulum: structural determinants and protein dynamics. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 43:1075-1078.
- Sztretye, M., J. Yi, L. Figueroa, J. Zhou, L. Royer, P. Allen, G. Brum, and E. Ríos. 2011. Measurement of RyR permeability reveals a role of calsequestrin in termination of SR Ca(2+) release in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 138:231-247.
- Tsugorka, A., E. Ríos, and L.A. Blatter. 1995. Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269:1723-1726.
- Woods, C.E., D. Novo, M. DiFranco, J. Capote, and J.L. Vergara. 2005. Propagation in the transverse tubular system and voltage dependence of calcium release in normal and mdx mouse muscle fibres. *J. Physiol.* 568:867-880.

### Section 3.

#### LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE DEFICIENT EN SPEG PRESENTE DES TRIADES ANORMALES ET DES DEFAUTS DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE

Article 3 : Huntoon, V., Widrick, J.J., **Sanchez, C.**, Rosen, S.M., Kutchukian, C., Cao, S., Pierson, C.R., Liu, X., Perrella, M.A., Beggs, A.H., Jacquemond, V., and Agrawal, P. (2018). SPEG-deficient skeletal muscles exhibit abnormal triad and defective calcium handling. *Hum Mol Genet*.

*Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de P. Agrawal (Children's Hospital Boston, Harvard Medical School). Elle a constitué pour moi une opportunité unique d'approfondir mes compétences et mon expertise dans le cadre de la caractérisation fonctionnelle d'un modèle murin d'une myopathie, contexte qui constitue par ailleurs une perspective importante de mes travaux de Thèse avec les biosenseurs. J'ai été la principale maître-e d'œuvre de toutes les expérimentations combinant électrophysiologie et signalisation calcique, j'ai contribué à toutes les analyses ainsi qu'à la mise en forme des résultats et à la préparation du manuscrit.*

#### **Introduction**

La protéine SPEG est retrouvée dans les muscles cardiaques et squelettiques (Hsieh et al. 2000). Dans le muscle squelettique, SPEG a une localisation triadique et est suspectée insérée dans la membrane jonctionnelle du RS. Des mutations du gène *spep* sont à l'origine d'une forme sévère et infantile de myopathie centronucléaire associée à une cardiomyopathie (Agrawal et al. 2014). Bien qu'une activité kinase ait été identifiée (Hsieh et al. 2000), la fonction physiologique de SPEG reste inconnue. Les résultats récents démontrant des altérations de la signalisation calcique et du couplage EC dans d'autres modèles de myopathie centronucléaire (Kutchukian et al., 2016, 2017) ont encouragé la caractérisation fonctionnelle de ces processus dans ce nouveau contexte. Dans cette étude, un modèle murin déficient en SPEG (SPEG-KO) a été généré par le groupe de P. Agrawal : nous avons caractérisé les propriétés des signaux  $Ca^{2+}$  et du couplage EC dans les fibres musculaires isolées de ce modèle à l'aide d'une combinaison de potentiel imposé et de détection de  $Ca^{2+}$  intracellulaire en microscopie confocale.

## Résultats

### ***Courants $Ca^{2+}$ macroscopiques à travers $Ca_v1.1$***

Le courant  $Ca^{2+}$  à travers  $Ca_v1.1$  a été mesuré dans les fibres musculaires de souris contrôle et SPEG-KO en réponse à des dépolarisations imposées d'amplitude croissante (Figure 6). La caractérisation complète des courbes courant-potentiel indique que la conductance maximale de  $Ca_v1.1$  est réduite de 53 % en moyenne dans les fibres KO et que le potentiel de demi-activation est décalé de 6 mV vers des potentiels plus négatifs par rapport aux fibres contrôle.

### ***Transitoires $Ca^{2+}$ cytosoliques en réponse à l'activation des canaux RYR1***

Afin de caractériser l'activité de libération de  $Ca^{2+}$  par le RS, les fibres musculaires utilisées dans les expériences décrites ci-dessus étaient dialysées avec l'indicateur rhod-2 afin de mesurer simultanément les transitoires  $Ca^{2+}$  cytosoliques (Figure 6). La caractérisation complète des signaux voltage-dépendants montre que la vitesse maximale de libération de  $Ca^{2+}$  par le RS est diminuée d'un facteur proche de 2 en moyenne dans les fibres KO par rapport aux fibres contrôle. De plus, l'activation du flux de  $Ca^{2+}$  par les canaux RYR1 est plus lente dans les fibres KO que dans les fibres contrôle.

### ***Variabilité spatiale des transitoires $Ca^{2+}$ du RS***

Au-delà des défauts globaux de signalisation calcique, l'observation détaillée des images de fluorescence du rhod-2 a permis d'identifier 3 fibres SPEG-KO avec une profonde altération locale de la libération de  $Ca^{2+}$  (Figure 7). La mise en évidence de cette variabilité spatiale de la libération de  $Ca^{2+}$  a conduit à la quantification de ce paramètre dans l'ensemble des fibres testées dans les deux groupes de souris (Figure 8). Finalement, l'hétérogénéité spatiale du signal calcique a été confirmée – par une analyse de la variabilité du temps au pic du flux de  $Ca^{2+}$  à travers le RS (à -10mV et à +10 mV) – et est significativement plus élevée dans les fibres SPEG-KO que dans les fibres contrôle.

## Conclusion

Nos résultats montrent que la déficience en SPEG est associée à une diminution sévère de la fonction canal calcique de  $Ca_v1.1$  et à une altération de l'activité de libération de  $Ca^{2+}$  par le RS. Les altérations du couplage EC ainsi identifiées jouent probablement un rôle majeur dans la faiblesse musculaire observée chez les souris SPEG-KO et contribuent également sans doute à la pathologie humaine correspondante. La similarité avec les symptômes cellulaires observés dans deux autres modèles de myopathie centronucléaire liés à des mutations dans les gènes *mtm1* et *dnm2* suggère que MTM1, DNMT2 et SPEG sont des protéines critiques pour le maintien de la fonction du couplage EC et/ou de l'architecture membranaire qui supporte ce processus. L'avenir proche fournira sans aucun doute de



nouvelles données concernant le détail du mécanisme pathologique lié à la déficience en SPEG et le rôle précis de cette protéine dans la fonction musculaire.

## ORIGINAL ARTICLE

# SPEG-deficient skeletal muscles exhibit abnormal triad and defective calcium handling

Virginia Huntoon<sup>1,2,3,†</sup>, Jeffrey J. Widrick<sup>1,3,†</sup>, Colline Sanchez<sup>4</sup>, Samantha M. Rosen<sup>1,2,3</sup>, Candice Kutchukian<sup>4</sup>, Siqi Cao<sup>1,2,3</sup>, Christopher R. Pierson<sup>5</sup>, Xiaoli Liu<sup>6,7</sup>, Mark A. Perrella<sup>6,7</sup>, Alan H. Beggs<sup>1,3</sup>, Vincent Jacquemond<sup>4</sup> and Pankaj B. Agrawal<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Genetics and Genomics, <sup>2</sup>Division of Newborn Medicine, <sup>3</sup>The Manton Center for Orphan Disease Research, Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA, <sup>4</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, F-69622 Villeurbanne, France, <sup>5</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Nationwide Children's Hospital and Department of Pathology and Department of Biomedical Education and Anatomy, The Ohio State University College of Medicine, Columbus, OH 43205, USA, <sup>6</sup>Department of Pulmonary and Critical Care Medicine and <sup>7</sup>Department of Newborn Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115, USA

\*To whom correspondence should be addressed at: Pankaj B. Agrawal, MD, Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, 300 Longwood Ave., Hunnewell 4, Boston, MA 02115, USA. Tel: +1 6179192153; Fax: +1 6177300486; Email: pagrawal@enders.tch.harvard.edu

## Abstract

Centronuclear myopathies (CNM) are a subtype of congenital myopathies (CM) characterized by skeletal muscle weakness and an increase in the number of central myonuclei. We have previously identified three CNM probands, two with associated dilated cardiomyopathy, carrying striated preferentially expressed gene (SPEG) mutations. Currently, the role of SPEG in skeletal muscle function is unclear as constitutive SPEG-deficient mice developed severe dilated cardiomyopathy and died *in utero*. We have generated a conditional *Speg*-KO mouse model and excised *Speg* by crosses with striated muscle-specific cre-expressing mice (MCK-Cre). The resulting litters had a delay in *Speg* excision consistent with cre expression starting in early postnatal life and, therefore, an extended lifespan up to a few months. KO mice were significantly smaller and weaker than their littermate-matched controls. Histopathological skeletal muscle analysis revealed smaller myofibers, marked fiber-size variability, and poor integrity and low number of triads. Further, SPEG-deficient muscle fibers were weaker by physiological and *in vitro* studies and exhibited abnormal Ca<sup>2+</sup> handling and excitation-contraction (E-C) coupling. Overall, SPEG deficiency in skeletal muscle is associated with fewer and abnormal triads, and defective calcium handling and excitation-contraction coupling, suggesting that therapies targeting calcium signaling may be beneficial in such patients.

<sup>†</sup>The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

Received: November 30, 2017. Revised: January 26, 2018. Accepted: February 19, 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

## Introduction

SPEG protein encoded by the striated preferentially expressed gene (SPEG) is highly expressed in striated muscles. While the functions of SPEG are unclear, mutations in human patients cause a form of severe infantile onset centronuclear myopathy (CNM) with associated dilated cardiomyopathy, representing a unique subtype of congenital myopathy (CM) (1,2). CMs are a heterogeneous group of skeletal muscle disorders that typically present with hypotonia, and breathing and feeding difficulties in early life. They are subdivided into different types by distinct microscopic and ultrastructural findings in skeletal muscles (3). CNM is a common subtype characterized by the mislocalization of nuclei from the periphery to the center of myofibers. Several genes are now known to be mutated in CNM including *MTM1*, *RYR1*, *TTN*, *BIN1*, *DNM2* and *SPEG* (1,4–8).

X-linked myotubular myopathy, the most common form of CNM, is caused by *MTM1* mutations. We have previously shown that SPEG interacts with myotubularin, the protein product of *MTM1* (1). The functions of myotubularin include regulation of calcium homeostasis, excitation-contraction (E-C) coupling, and cytoskeletal organization (9–11). As a myotubularin-interacting partner, we postulated that SPEG may be important for these functions as well. Further, we have previously described that SPEG co-localizes with various proteins expressed in terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum (SR) of the skeletal muscle. SR terminal cisternae and transverse-tubule (T-tubule) form the triads, and CNM is linked to dysfunctional E-C coupling at the triad.

We have created a conditional *Speg*-knockout mouse model (*Speg<sup>fl/fl</sup>*) and bred them with MCK-cre+ mice (cre recombinase expressed postnatally in striated muscles driven by muscle creatine kinase promoter) to overcome the early lethality of constitutive *Speg*-KO mice and decipher the underlying mechanisms for skeletal muscle dysfunction due to SPEG deficiency. The model targeted the two major isoforms expressed in cardiac and skeletal muscles, *Speg $\alpha$*  and *Speg $\beta$* . *Speg $\alpha$*  is predominantly present during skeletal muscle differentiation, whereas both *Speg $\alpha$*  and *Speg $\beta$*  are present in neonatal cardiomyocytes during maturation and differentiation (12). The striated muscle-specific *Speg*-KO mice (*Speg<sup>fl/fl</sup>*; MCK-cre+) had reduced body mass and hypotonia and ultrastructural, histochemical and functional analyses revealed triad defects, myofibrillar disarray and contractile dysfunction. *In vitro* studies of muscle fibers revealed minimal force deficits at the cross-bridge but markedly reduced  $Ca^{2+}$  release from the SR suggestive of defective calcium release.

## Results

### Targeting strategy for *Speg*-conditional knockout mice

Constitutive *Speg* deletion of exons 8–10 in mice is known to be lethal during late embryonic life due to cardiac myofibril degeneration and marked reduction of cardiac function (13,14). To circumvent early lethality, we created a conditional *Speg*-knockout (*Speg<sup>fl/fl</sup>*) mouse model targeting exons 14–17 (Fig. 1A). Tissue-specific *Speg* excision was performed by crossing *Speg<sup>fl/fl</sup>* with striated muscle-specific MCK (muscle creatine kinase) cre-expressing mice and obtaining *Speg<sup>fl/fl</sup>*; MCK cre+ (*Speg*-KO). The *Speg<sup>fl/+</sup>*; MCK-cre+ littermates were used as controls (CTRL). In MCK-cre mice, cre expression usually starts at embryonic (E) day 17, reaches ~40% at birth and reaches maximal levels by postnatal day (P) 10 and stays there for life (15). There was no

reduction in the number of live births for *Speg*-KO mice representing 23% of all live pups ( $n=180$ ), others genotypes being *Speg<sup>fl/fl</sup>*; MCK cre- (25%), *Speg<sup>fl/+</sup>*; MCK cre+ (22%) and *Speg<sup>fl/+</sup>*; MCK cre- (30%). At three weeks of age, this was evaluated by PCR-agarose gel analysis of DNA extracted from their tails (Fig. 1B). Quantitative RT-PCR revealed that the *Speg*-KO quadriceps muscle contained minimal *Speg* mRNA relative to the CTRL ( $0.7 \pm 0.6\%$ ), and on an agarose gel the *Speg* PCR product was absent in KO samples (Fig. 1C). Further, western blot analysis confirmed the lack of SPEG protein in skeletal muscles (Fig. 1D) and heart (Fig. 1E), and essentially normal levels in other major tissues, consistent with striated muscle-specific excision of *Speg* (Fig. 1E).

### Phenotypic findings

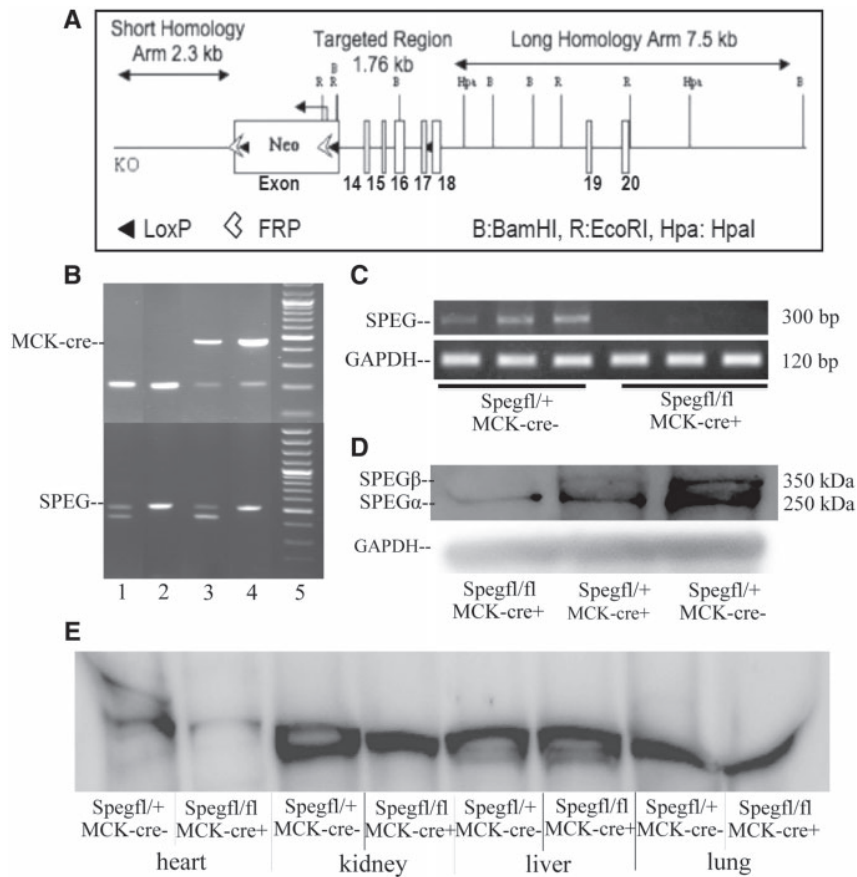
The *Speg*-KO mice displayed significant size differences compared to the littermate controls by P21 when the mean weights were  $10.1 \pm 1.9$  g for the CTRL and  $8.6 \pm 1.2$  g for the *Speg*-KO mice ( $P < 0.05$ ). At P70, the weights of *Speg*-KO mice were a mean of  $17.0 \pm 2.1$  versus  $20.7 \pm 2.6$  g for CTRL ( $P < 0.0005$ ) (Fig. 2A).

An inverted grid-hanging assessment was used to assess potential changes in muscle strength over the first 3 months of age. All control mice could maintain grip on the inverted screen for at least 5 min (latency score = 6) at all monthly sessions. In comparison, at month 1, the average *Speg*-KO mice withstood 1–2 min of hanging (latency score = 2;  $P < 0.005$ ). By month 3, the average KO mouse could grip the inverted screen for less than a minute (latency score = <1;  $P < 0.00005$ ) (Fig. 2B).

Activity assays were used to assess spontaneous physical activity and endurance. A photobeam tracking apparatus measured activity levels within an open field arena (Fig. 2C). At month 1, the *Speg*-KO mice traveled an average distance of 462.5 cm less during a 5 min assay than CTRLs. By month 2, the KO mice traveled 898.4 cm less than the CTRL and at month 3, the mean distances traveled were  $367.1 \pm 67.5$  cm for KO and  $1116.0 \pm 90.2$  cm for the CTRL mice ( $P < 0.0005$ ). The tracking apparatus also measured the number of rearings, vertical activity of mice in the same group (Fig. 2D). In month 1, there was no significant difference between them, but by month 2, the *Speg*-KO mice had an average of  $38.6 \pm 6.2$  fewer rearings than CTRL during the 5 min trials ( $P < 0.005$ ). In the third month, the decline in exploratory activity of KO mice was most severe. The KO mice reared  $18.8 \pm 6.8$  times while the CTRL reared  $64.9 \pm 8.8$  ( $P < 0.005$ ). The mean age of *Speg*-KO mice who died spontaneously was  $57.4 \pm 7.3$  days ( $n=8$ ), and as shown in the Kaplan–Meier curve (Fig. 2E), all of them were dead by 3 months. Collectively, these results reveal obvious declines in body mass, muscle strength and endurance, spontaneous motor activity and early death in the *Speg*-KO mice.

### Histopathological findings

Skeletal muscle fibers from *Speg*-KO mice were significantly smaller and displayed marked fiber size variability on H&E staining compared with CTRLs at 3 months age (Fig. 3A–B). There was no obvious increase in central nuclei within the myofibers. Sections of quadriceps muscle were examined to evaluate myofibrils, T-tubules and sarcolemmal structure using electron microscopy (EM). The EM images of KO muscle revealed structural triad abnormalities with regions of unusually small or absent triads (Fig. 3C–F). Quantitative analysis of five EM images at 3000 $\times$  from two KO and two CTRL mice revealed that



**Figure 1.** Creation of the *Speg*-conditional knockout mice and striated muscle specific excision of the *Speg* gene. (A) Targeting strategy for *Speg*-conditional KO mouse. (A) 11.5 kb region used to construct the targeting vector was first sub-cloned from a positively identified C57BL/6 (RP23: 305K9) BAC clone. The region was designed such that the short homology arm (SA) extends ~2.3 kb 5' to exon 14. The long homology arm (LA) ends 3' to exon 17 and is 7.5 kb long. The loxP/FRT-flanked Neo cassette is inserted on the 5' side of exon 14 and the single loxP site is inserted between exons 17 and 18. The target region is 1.76 kb and includes exons 14–17. (B) PCR and agarose gel analysis of DNA isolated from tails of mice showing presence of MCK-Cre (top) and floxed *Speg* (bottom). MCK-Cre positive mice displayed bands for the transgene (~450 bp) and internal positive control (200 bp) while the floxed *Speg* allele is 485 bp in size versus 422 bp for the WT. *Speg*-KO mice are cre-positive and homozygous for floxed *Speg* allele (column 4) while columns 1, 2 and 3 represent *Speg*<sup>fl/+</sup> MCK-cre<sup>-</sup>, *Speg*<sup>fl/fl</sup> MCK-cre<sup>-</sup> and *Speg*<sup>fl/+</sup> MCK-cre<sup>+</sup>, respectively. (C) qRT-PCR analysis of *Speg* mRNA in skeletal muscle of control and KO mice at 3 months of age. mRNA levels in KO mice were 0.7 ± 0.6% that of control mice. (D) Western blot analysis of SPEG in muscle dissected from *Speg*<sup>fl/+</sup> MCK-cre<sup>-</sup>, *Speg*<sup>fl/+</sup> MCK-cre<sup>+</sup> and *Speg*<sup>fl/fl</sup> MCK-cre<sup>+</sup> (*Speg*-KO) mice at 3 months of age. (E) Western blot analysis of SPEG in muscle dissected from unaffected het and *Speg*-KO mice. Heart muscle of SPEG-deficient mice displayed loss of SPEG protein.

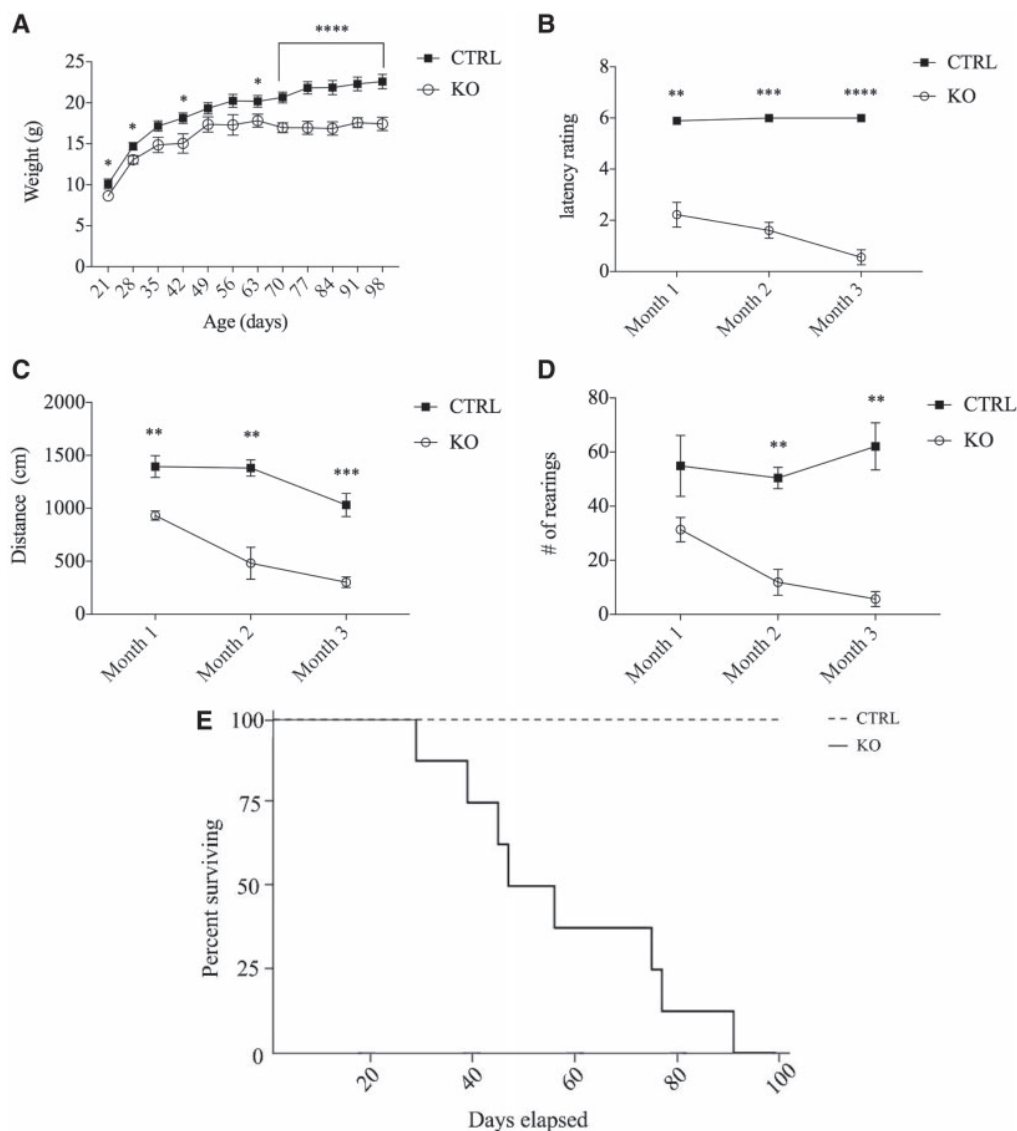
the total number of sarcomeres did not differ between the KO mice with an average of 186 ± 17.6 units per field and the CTRL mice with an average of 161.2 ± 8.0. However, the mean number of triads per field in KO was 176.4 ± 10.7, which was significantly fewer than 266.8 ± 14.8 seen in CTRL ( $P < 0.005$ ). Additionally, the average number of triads flanking each sarcomere was significantly decreased in KO (0.94 ± 0.03) compared with CTRL (1.66 ± 0.21) ( $P < 0.0005$ ). In summary, the fibers were significantly smaller and the integrity and quantity of the triads were adversely affected by the lack of SPEG.

### Contractility and muscle force

We evaluated the functional properties of the tibialis anterior (TA) muscles from CTRL and KO mice using an *in situ* preparation. Consistent with the histological results, the physiological cross-sectional area (pCSA) of TA muscle fibers from the KO animals was 27% less than that of the CTRL group (Fig. 4A).

For KO mice, the isometric force response to a single supra-maximal stimulus, or maximal twitch force, was very low (Fig. 4B). In order to reduce confounding due to group differences

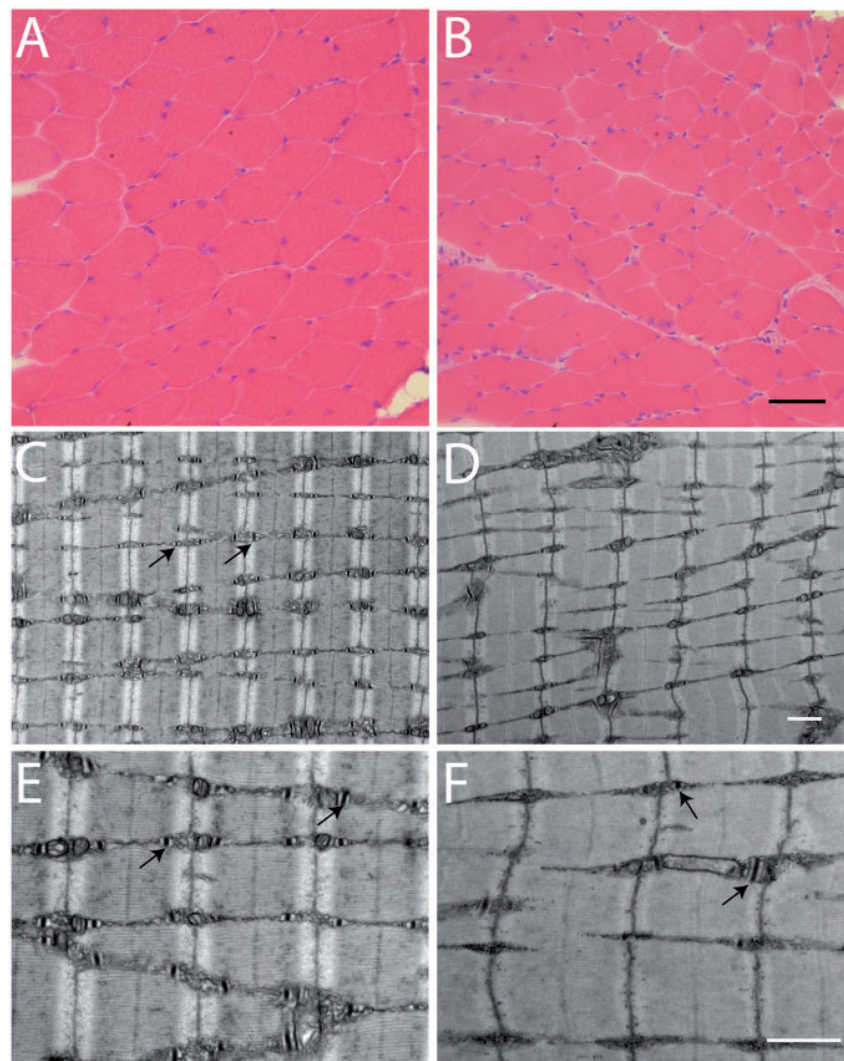
in muscle size, forces were also expressed relative to pCSA, and correcting for pCSA the twitch force was less than 25% of CTRL (Fig. 5A). The kinetics of the twitch, as assessed by contraction time (time from the onset of force to maximal twitch force) and half relaxation time (time required for force to decline from maximal to 50% of maximal), did not differ between CTRL and KO groups (Fig. 4C–D). During tetanic stimulation, TA muscles from KO mice attained significantly lower peak tension compared with control (Fig. 4E), and after correcting for pCSA achieved only 50% of normal peak tension (Fig. 5B). This peak force deficit was not as great as that noted for maximal twitch tension and examination of the ratio of twitch to peak force confirmed a disproportionate loss in twitch force (Fig. 5C). To further evaluate this selective force deficit, we studied force across a range of stimulation frequencies and fit the relationship with a sigmoidal curve (Fig. 5D). A significant increase in the average stimulation frequency at the inflection point of the relationship was noted for TA muscles from the KO mice, indicating a rightward shift in the force–frequency relationship. Overall, TA muscles from KO mice showed severe force deficits that were exacerbated at low to mid-stimulation frequencies.



**Figure 2.** Phenotypic and activity findings of *Speg*-MCK mice. (A) Weight progression of KO ( $n = 18$ ) and CTRL ( $n = 18$ ) mice in first 3 months of age. (B) Inverted hanging grip data displaying strength performance of KO ( $n = 4$ ) and CTRL ( $n = 4$ ) mice. Latency rating based on minute criteria from related literature (<1: 00 = 1; 1: 00–2: 00 = 2; 2: 01–3: 00 = 3; 3: 01–4: 00 = 4; 4: 01–5: 00 = 5; >5: 00 = 6). (C and D) Typical acti-track activity data of distance travelled (cm) and average number of rearings for KO ( $n = 4$ ) and CTRL ( $n = 4$ ). (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.0005$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (E) Kaplan–Meier curve demonstrating survival of KO ( $n = 8$ ) and CTRL ( $n = 8$ ) mice during the first 3 months of age.

The mouse TA is a predominately fast, glycolytic muscle. To investigate whether functional deficits were confined to this specific muscle type or whether oxidative muscles were also affected, we dissected the fast, glycolytic extensor digitorum longus (EDL) and the mixed fiber type, oxidative soleus (SOL) from CTRL and KO mice and directly compared their functional properties using an *in vitro* preparation. The pCSA of the EDL, but not the SOL, was significantly less in KO mice (Fig. 4F). The peak tetanic force was significantly reduced in both KO muscles (Fig. 4G), and when expressed relative to pCSA, the EDL force deficit was twice that observed for the SOL (Fig. 5E). The inflection point of the force–frequency relationship was shifted to higher frequencies for the KO EDL and SOL muscles, with the EDL affected significantly more than the SOL (Fig. 5F). In summary, both the oxidative SOL and glycolytic EDL from KO mice demonstrated contractile deficits, but the oxidative muscle was affected considerably less by the lack of SPEG.

We prepared chemically permeabilized, or ‘skinned’, muscle fiber segments in which the sarcolemma and the normal processes of excitation–contraction coupling were disrupted. By activating these fiber segments with a saturating concentration of  $Ca^{2+}$ , we tested whether cross-bridge mechanisms of contraction were impaired by the absence of SPEG. To confirm that we were studying fibers of similar physiological type, we assayed fiber unloaded shortening velocity and found no significant difference between CTRL and KO groups (Fig. 4I). TA-skinned fibers from KO animals were significantly smaller in cross-sectional area (CSA) (Fig. 4H) and produced significantly less  $Ca^{2+}$ -activated force in comparison with CTRL animals (Fig. 4J). However, when  $Ca^{2+}$ -activated force was normalized to fiber CSA, the KO force deficit averaged only 15% with roughly two-thirds of the KO fibers producing force within the normal force range (Fig. 5G). This  $Ca^{2+}$ -activated force deficit at the single fiber level can



**Figure 3.** Histopathological findings in a mouse model of SPEG deficiency. (A–B) H&E staining of quadriceps cross-sections from CTRL (A) and *Speg*-KO mice (B). The myofibers are smaller and highly variable in size in the KO mice. Scale bar equals 50  $\mu\text{m}$ . (C–F) Transmission EM in skeletal muscle (quadriceps) specimens obtained from CTRL (C, E) and *Speg*-KO mice (D, F). Abnormal and fewer triads are noted in the KO mice. Arrows indicate the triads. Scale bars equal 1  $\mu\text{m}$ .

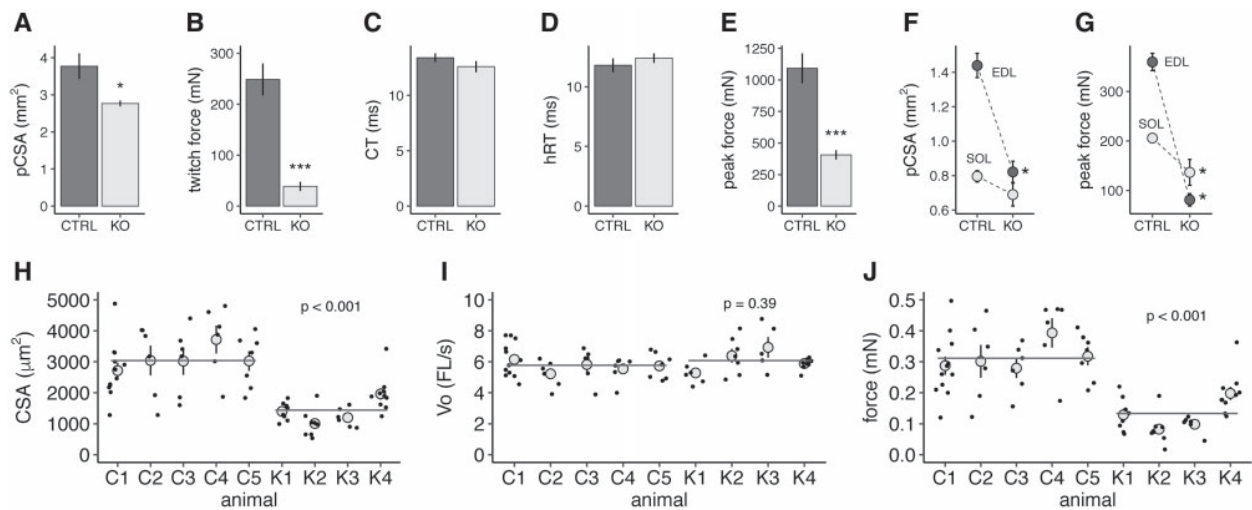
account for only a fraction of the force losses observed in our *in situ* TA muscle measurements (Fig. 5B) suggesting that mechanisms occurring prior to  $\text{Ca}^{2+}$ -activation of the cross-bridges are largely responsible for the strength deficits of KO animals.

### Calcium handling

$\text{Ca}^{2+}$  current through the dihydropyridine receptor (DHPR) and SR  $\text{Ca}^{2+}$  release was simultaneously measured in CTRL and KO fibers in response to 0.5 s long depolarizing voltage steps of increasing amplitude starting at  $-80$  mV. Illustrative  $\text{Ca}^{2+}$  current traces from a CTRL and a KO fiber and the mean voltage dependence of peak  $\text{Ca}^{2+}$  current are shown in Figure 6A–B. Fitting the peak current versus voltage values in each fiber with the appropriate function (16) showed that the maximal conductance ( $G_{\text{max}}$ ) was reduced by 53% in the KO fibers while the mid-activation voltage ( $V_{0.5}$ ) was 6 mV more negative than the CTRL fibers. SPEG deficiency was thus associated with a severe

depression of the  $\text{Ca}^{2+}$  current function of the voltage sensor of E–C coupling.

SR  $\text{Ca}^{2+}$  release was also profoundly affected in the KO fibers as shown in Figure 6C: the figure shows examples of line-averaged rhod-2  $\text{Ca}^{2+}$  transients from a CTRL and from a KO fiber and the corresponding calculated SR  $\text{Ca}^{2+}$  release fluxes (bottom traces). Transients were calculated from the changes in fluorescence averaged throughout the entire scanned line. Although rhod-2 signals exhibited overall similar kinetic features in the two groups, the initial rate of rise of the transients was slower in the KO fibers, which translated into a reduced peak SR  $\text{Ca}^{2+}$  release in response to the pulses. The left graph in Figure 6D shows the mean voltage dependence of the peak amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  release from 25 CTRL fibers and 24 KO fibers. From fitting a Boltzmann function to the voltage dependence in each fiber, maximum  $\text{Ca}^{2+}$  release was depressed by a factor of 1.8 in the KO fibers (inset in Fig. 6D) with no concurrent change in the mid-activation voltage ( $-13.2 \pm 1.5$  mV in the CTRL fibers versus  $-15.2 \pm 2.1$  mV in the KO fibers) and in the steepness factor



**Figure 4.** Reduction in CSA and contractility in hindlimb muscles of *Speg*-KO mice (A). Mean ( $\pm$ SE) pCSA of TA preparations,  $n=5$  for CTRL and  $n=5$  for KO mice. \* indicates a significant difference,  $P < 0.05$ . (B) Mean ( $\pm$ SE) TA twitch force. \*\*\* indicates a significant difference between CTRL and KO means,  $P < 0.001$ . Number of muscles same as panel A. (C) Mean ( $\pm$ S.E.M.) TA twitch contraction time (CT). Number of muscles same as (A). (D) Mean ( $\pm$ SE) TA twitch half-relaxation time. Number of muscles same as (A). (E) Mean ( $\pm$ SE) TA peak force. \*\*\* indicates a significant difference between CTRL and KO means,  $P < 0.001$ . Number of muscles same as (A). (F) Mean ( $\pm$ SE) pCSA of EDL and soleus (SOL) muscles. A significant genotype by muscle interaction ( $P < 0.001$ ) indicated that the absence of *SPEG* had significantly different effects on EDL versus SOL muscles. \* indicates a significant difference from the corresponding CTRL mean,  $P < 0.05$ . Means based on 10 EDL CTRL, 6 EDL KO, 8 SOL CTRL and 5 SOL KO muscles. (G) Mean ( $\pm$ SE) peak force of EDL and SOL muscles. A significant genotype by muscle interaction ( $P < 0.01$ ) indicated that the absence of *SPEG* had significantly different effects on EDL versus SOL muscles. \* indicates a significant difference from the corresponding CTRL mean,  $P < 0.05$ . Number of muscles same as panel (F). (H) CSA of skinned TA muscle fibers. Individual CTRL animals are designated by C1–C5 and individual knock-out KO animals by K1–K4. Black points represent individual fibers within an animal, gray circles represent the mean ( $\pm$  SE) value for an animal, and the horizontal lines represent the overall CTRL and KO group means.  $P$ -value indicates significant difference between CTRL ( $N=37$  fibers) and KO ( $N=32$  fibers) means. (I) Unloaded shortening velocity ( $V_0$ ) of  $Ca^{2+}$ -activated TA fibers. Figure format same as (H).  $P$ -value indicates that no significant difference was detected between CTRL ( $N=37$  fibers) and KO ( $N=27$  fibers) means. (J) Peak force of  $Ca^{2+}$ -activated TA fibers. Figure format same as (H).  $P$ -value indicates significant difference between CTRL ( $N=37$  fibers) and KO ( $N=32$  fibers) means.

( $8.7 \pm 0.4$  mV in the CTRL fibers versus  $7.25 \pm 0.45$  mV in the KO fibers). In addition, the time to reach peak  $Ca^{2+}$  release from the beginning of the pulse was larger in the KO fibers, by  $\sim 15$  ms for pulses from  $-40$  to  $-10$  mV and by  $\sim 5$  ms for the largest pulses (Fig. 6D, graph on the right). Thus, both the amplitude and the kinetics of macroscopic ryanodine receptor-mediated  $Ca^{2+}$  release were affected by the *Speg*-KO condition in a similar way to what was reported with the myotubularin deficiency (17). One additional feature of  $Ca^{2+}$  release in myotubularin-deficient muscle fibers was severe spatial variability of amplitude and kinetics. This was also the case in the *SPEG* deficiency situation, but to a much lesser extent. Indeed, although three of the tested *Speg*-KO fibers did exhibit a large region of profoundly depressed  $Ca^{2+}$  release (Fig. 7), overall, the majority of *Speg*-KO fibers did not present the frequent severe local alterations of  $Ca^{2+}$  release that were unambiguously identified in *Mtm1*-KO fibers (17).

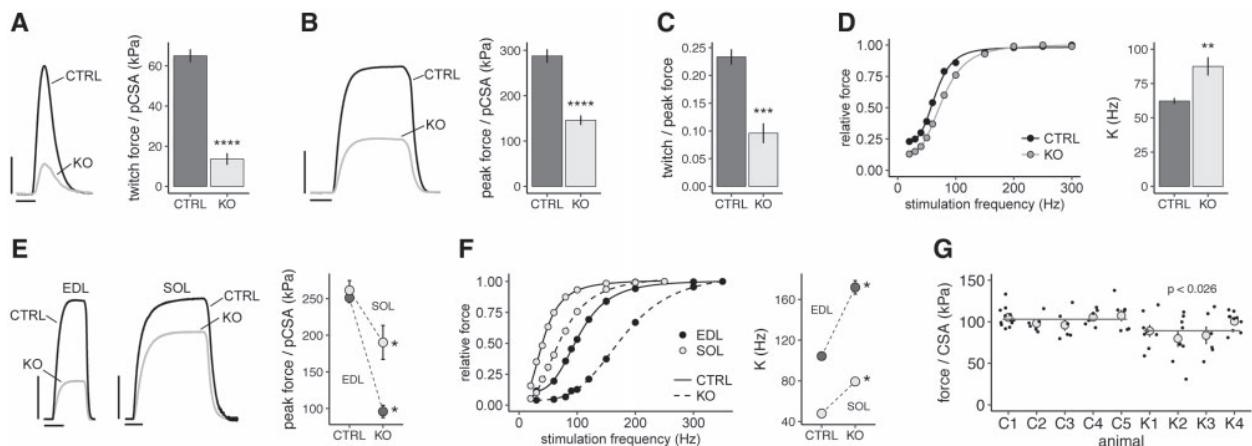
In order to compare the spatial variability of  $Ca^{2+}$  release between CTRL and KO fibers we used the analysis illustrated in Figure 8. Figure 8B shows a color-coded portion of representative line-scan rhod-2 fluorescence images from a CTRL and a KO fiber, taken while a voltage step from  $-80$  to  $-10$  mV was applied (Fig. 8A). Figure 8C and D shows the corresponding time derivative images and the time to peak of the derivative along the line, respectively. Whereas time-to-peak values were very uniform along the line in the CTRL fiber, there was more dispersion in the KO fiber. Figure 8E shows mean values for the standard deviation of time-to-peak of the derivative in CTRL ( $n=16$ ) and KO fibers ( $n=23$ ), for a pulse from  $-80$  to  $-10$  mV and for a pulse from  $-80$  to  $+10$  mV. There was significantly increased spatial variability in the KO fibers, especially for the lower amplitude pulse, but the amount of increase was much less ( $\sim 3$  times increase at  $+10$  mV) than what was reported in

myotubularin-deficient muscle fibers (more than 10 times increase) (18).

## Discussion

This study identifies *SPEG* to be a critical protein in triad maintenance, calcium release and E-C coupling. We had previously identified three patients with CNM due to *SPEG* deficiency (1). Since then, additional CNM patients carrying *SPEG* mutations have been reported (2). As constitutive *Speg* KO mice die early, often as late embryos, we created conditional KO mice and bred them with striated muscle-specific cre-expressing mice (MCK-cre) with delayed cre expression to prevent early lethality. Those striated muscle-specific *Speg*-KO mice exhibited drastic reductions in body mass, physical activity, muscle strength and endurance. Their muscle function progressively worsened until their early demise by 3 months of age.

Examination of muscle samples from striated muscle-specific *Speg*-KO mice did not reveal an increase in the frequency of central nuclei as described in human patients and constitutive *Speg*-KO mice (1). This may be due to the delayed excision of *Speg* in the current mouse model although this needs to be explored further. Our EM studies revealed markedly abnormal and fewer triads which suggests defective excitation-contraction coupling and consequent contractile dysfunction. This was confirmed using *in situ* and *in vitro* skeletal muscle preparations, which revealed that weakness was more apparent at low stimulation frequencies and in muscles expressing predominantly fast myosin isoforms. Subsequent mechanistic studies conducted on *Speg*-KO fast type 2 fibers revealed only a mild loss of function at the level of cross-bridge formation but profound reductions in the  $Ca^{2+}$  current function of the



**Figure 5.** Contractile deficits in hindlimb muscles of *Speg*-KO mice corrected for CSA. (A) Left: Superimposed TA twitch force records from a representative CTRL and a *Speg*-KO mouse. Calibration bars represent 20 kPa and 20 ms. Right: Mean ( $\pm$ SE) twitch force per pCSA of CTRL and KO mice. \*\*\*\* indicates a significant difference between CTRL ( $N=5$ ) and KO ( $N=5$ ) means,  $P < 0.0001$ . (B) Superimposed peak force records obtained from TA preparations from a representative CTRL and *Speg*-KO mouse. Calibration bars represent 100 kPa and 50 ms. Right: Mean ( $\pm$ SE) peak TA force per pCSA of CTRL and KO mice. \*\*\*\* indicates a significant difference between CTRL ( $N=5$ ) and KO ( $N=5$ ) means,  $P < 0.0001$ . (C) Mean ( $\pm$ SE) ratio of TA twitch to peak force. \*\*\* indicates a significant difference between CTRL ( $N=5$ ) and KO ( $N=5$ ) means,  $P < 0.001$ . (D) Left: TA Force–frequency relationships for a representative CTRL and a KO TA muscle. Right: Mean ( $\pm$ SE) values of K, the parameter specifying the inflection point of the force–frequency relationship. \*\* indicates a significant difference between CTRL ( $N=5$ ) and KO ( $N=5$ ) means,  $P < 0.01$ . (E) Left: Superimposed peak force records of EDL and soleus (SOL) muscles obtained from a representative CTRL and KO mouse. Calibration bars represent 100 kPa and 100 ms. Right: Mean ( $\pm$ SE) peak force of EDL and SOL muscles of CTRL and KO mice. A significant genotype by muscle interaction ( $P < 0.01$ ) indicated that the absence of SPEG had significantly different effects on EDL versus SOL muscles. \* indicates a significant difference between CTRL and KO means,  $P < 0.05$ . Means based on 10 EDL CTRL, 6 EDL KO, 8 SOL CTRL and 5 SOL KO mice. (F) Left: Force–frequency relationships of EDL and SOL muscles from a representative CTRL and KO mouse. Right: Mean ( $\pm$ SE) value of K for EDL and SOL muscles. A significant genotype by muscle interaction ( $P < 0.001$ ) indicated that the absence of SPEG had significantly different effects on EDL versus SOL muscles. \* indicates a significant difference between CTRL and KO means,  $P < 0.05$ . Means based on 6 EDL CTRL, 6 EDL KO, 4 SOL CTRL and 5 SOL KO mice. (G)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated force of single TA muscle fiber segments. Individual CTRL animals are designated by C1–C5 and individual knock-out KO animals by K1–K4. Black points represent individual fibers within an animal, gray circles represent the mean ( $\pm$ SE) value for an animal and the horizontal lines represent the overall CTRL and KO group means.  $P$ -value indicates significant difference between CTRL ( $N=37$  fibers) and KO ( $N=32$  fibers) means.

voltage-sensor and in  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR. Taken together, these results suggest that correcting or enhancing SR  $\text{Ca}^{2+}$  release or increasing the sensitivity of the thin filament regulatory proteins to  $\text{Ca}^{2+}$  may be a promising therapeutic approach for individuals with SPEG mutations.

A recent study has described the role of SPEG in cardiac muscle wherein SPEG deficiency results in loss of T-tubules in the cardiac muscle leading to downstream calcium mishandling and heart failure (18). Our study shows similar triad defects in the skeletal muscle, abnormal calcium release from the SR and consequent skeletal muscle dysfunction. Together these studies suggest that SPEG performs similar functions in cardiac and skeletal muscles, and ways to augment calcium release or increase  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity may benefit both systems.

While less severe, the amplitude and kinetics of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release from SPEG-deficient fibers resembled the defect reported in myotubularin-deficient fibers (17). This is interesting as defects in both proteins cause CNM and we have previously reported that myotubularin interacts with SPEG (1). In contrast, while SPEG deficiency causes both cardiac and skeletal muscle dysfunction, myotubularin deficiency essentially spares the cardiac muscle. The underlying mechanism of cardiac sparing in myotubularin deficiency is poorly understood and there may be underlying compensatory mechanisms yet to be deciphered.

In summary, elimination of SPEG from postnatal mouse skeletal muscle produces a myopathy characterized by fewer and defective triads, affecting  $\text{Ca}^{2+}$  current function of the voltage-sensor and calcium release from the SR and consequent reduced contractility. Approaches that include augmentation of calcium release from the SR or increasing the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of the regulatory proteins may benefit such patients.

## Materials and Methods

### Animal studies

All studies were performed with approval from the institutional animal care and use committee at Boston Children's Hospital (Boston, MA, USA) and at the University Claude Bernard—Lyon 1, France.

### Gene targeting, generation of *Speg*-conditional KO and *Speg*-KO mice

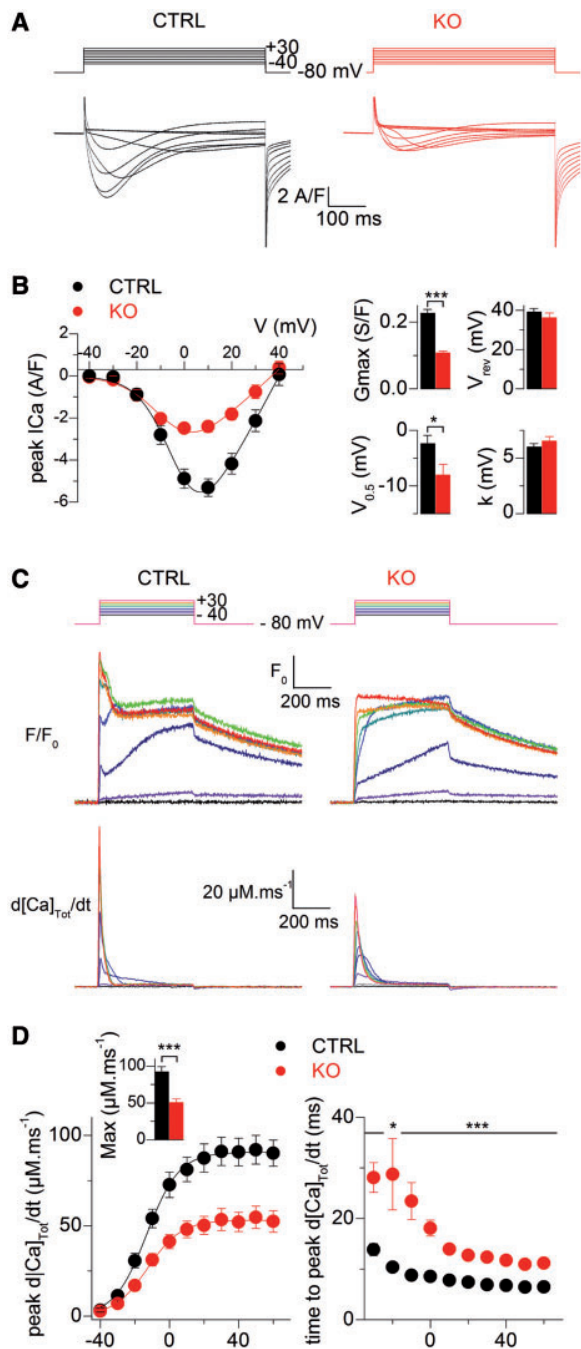
*Speg*-conditional KO mouse generation was performed by inGenious Targeting Laboratory (Ronkonkoma, NY, USA) and exons 14–17 of the *Speg* gene were targeted. Detailed procedures are presented in [Supplementary Material](#), Materials and Methods.

The homozygous *Speg*-conditional KO mice (*Speg*<sup>fl/fl</sup>) were bred with male transgenic mice (MCK-Cre+) who have the Cre recombinase driven by muscle creatine kinase promoter, with Cre activity observed in skeletal and cardiac muscle. These mice [B6.FVB(129S4)-Tg(Ckmm-cre)5Khn/J] were imported from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) and screened for MCK-cre transgene using the primers described previously (19). *Speg*<sup>fl/fl</sup>; MCK-cre+ mice were the *Speg*-KO mice that were utilized for further experiments.

### RT-PCR analysis

RNA was extracted from various muscle groups. QRT-PCR analysis was performed as described previously (19). The relative amount of target gene expression in *Speg*<sup>-/-</sup> animals was





**Figure 6.** DHPR Ca<sup>2+</sup> current and SR Ca<sup>2+</sup> release in CTRL and SPEG-deficient muscle fibers. (A) Ca<sup>2+</sup> current traces in response to the indicated depolarizing steps in a CTRL (left) and in a SPEG-deficient fiber (right). (B) Mean voltage-dependence of peak Ca<sup>2+</sup> current in CTRL (black symbols, n = 24) and SPEG-deficient muscle fibers (red symbols, n = 24). Graphs on the right show mean values for the maximal conductance (G<sub>max</sub>), reversal potential (V<sub>rev</sub>), mid-activation voltage (V<sub>0.5</sub>) and steepness (k) in the two groups. (C–D) Altered SR Ca<sup>2+</sup> release in SPEG-deficient muscle fibers. (C) Changes in rhod-2 fluorescence (F/F<sub>0</sub>) and corresponding calculated rate of Ca<sup>2+</sup> release (d[Ca]<sub>Ttot</sub>/dt) in response to the pulse protocol shown on top in a CTRL (left) and in a Speg-KO muscle fiber (KO, right). F/F<sub>0</sub> traces correspond to the average change in fluorescence over the scanned line. (D) Left, voltage dependence of the peak rate of Ca<sup>2+</sup> release in CTRL (black symbols) and KO muscle fibers (red symbols). The inset shows the corresponding mean values for maximum rate of Ca<sup>2+</sup> release. Right, voltage dependence of the mean time-to-peak rate of Ca<sup>2+</sup> release in CTRL and KO fibers.

calculated as fold changes relative to CTRL that were normalized to GAPDH. Further details are described in SI Materials and Methods.

### Western blot analysis

At three months of age, tissues from various muscles and organs were dissected, frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Protein isolation and western blot procedures were performed as described previously (19). Further details are described in SI Materials and Methods.

### Histopathological studies and electron microscopy

Light microscopy, H&E staining and EM were performed as described previously (19) and further details are in SI Materials and Methods.

### Activity tracking

ActiTrack software used photobeam tracking to evaluate locomotor and behavioral activity within open-field arenas (ACTITRACK V2.7, Panlab, S.L.U., Barcelona, Spain). ActiTrack tracking software utilized Panlab IR actimeters (up to 32 IR frames). The experiment provides measures of general physical motor abilities. Specific parameters (distance and number of rearings) were evaluated to assess muscle function. Mice were allowed to freely explore the chamber for the duration of the 5 min session. Each line crossed or photocell beam break was scored as one unit of activity.

### Inverted grip hanging test

An inverted screen assessment was used to evaluate grip strength. The mice were placed on a wire screen and slowly inverted 180 degrees to hang upside down at roughly 8 in. above padded table. Upon inversion, the mice were timed (seconds) on hanging duration, with the maximum time set for 300 s. Latency ranging based on minute criteria (<1:00 = 1; 1:00–2:00 = 2; 2:01–3:00 = 3; 3:01–4:00 = 4; 4:01–5:00 = 5; >5:00 = 6). Two trials with rest periods in between were performed on each mouse every other day over 1 week (total of 3 days). The weeklong trial spans were conducted monthly for the first 3 months of age.

### Muscle contractility

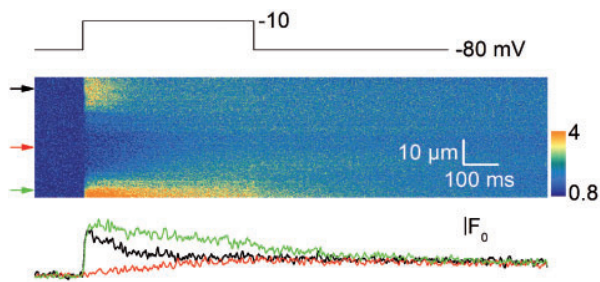
TA, EDL and soleus (SOL) muscles were studied using physiological preparations as described previously (20,21). Force measurements in relation to stimulation frequency was performed as described previously (22). Detailed procedures are presented in SI Materials and Methods.

### Skinned muscle fiber contractility

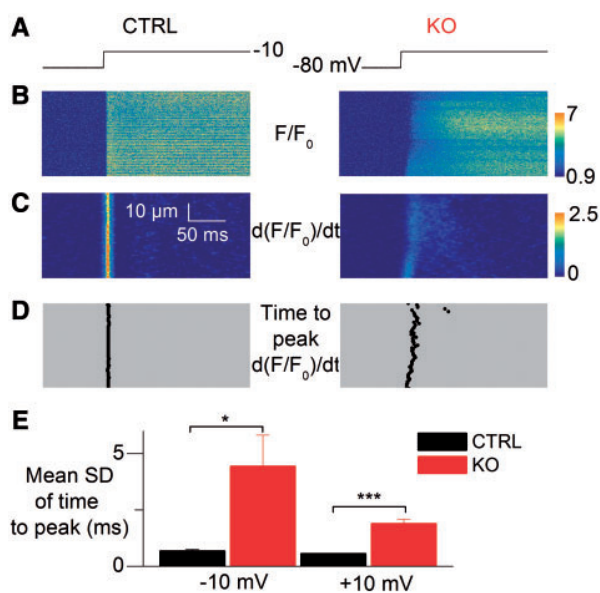
The basic procedures, including the composition of the EGTA-buffered relaxing (pCa 9.0, where pCa is the  $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ ) and Ca<sup>2+</sup>-activating (pCa 4.5) solutions, have been described previously (23,24). Detailed procedures are presented in SI Materials and Methods.

### Electrophysiology and Ca<sup>2+</sup> release

DHPR Ca<sup>2+</sup> current and confocal measurements of intracellular Ca<sup>2+</sup> were performed in single isolated, voltage-clamped muscle



**Figure 7.** Line-scan image of  $\text{Ca}^{2+}$  transient from a KO fiber. Example of line-scan image of rhod-2  $\text{Ca}^{2+}$  transient from a KO fiber yielding a large region of severely depressed  $\text{Ca}^{2+}$  release. Traces on the bottom show the changes in fluorescence at the positions indicated by the arrows on the left side of the rhod-2 image.



**Figure 8.** Spatial variability of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release in SPEG-deficient muscle fibers. (A) Voltage pulse protocol. (B) Line-scan rhod-2  $F/F_0$  images in a CTRL fiber (left) and in a SPEG-deficient fiber (right). (C) Corresponding images of the rate of change in  $F/F_0$  ( $d(F/F_0)/dt$ ). (D) Corresponding distribution of the time-to-peak rate of change in  $F/F_0$  along the line. (E) Mean standard deviation (SD) of the time-to-peak rate of change in  $F/F_0$  in CTRL ( $n = 16$ ) and KO fibers ( $n = 23$ ) for pulses from  $-80$  to  $-10$  and  $+10$  mV.

fibers from mouse, following previously described procedures (15,23,24). The holding voltage was set to  $-80$  mV. Detailed procedures are presented in SI Materials and Methods.

### Data analysis and statistics

Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. unless indicated otherwise. Student t-test was used to determine statistically significant differences between KO and CTRL groups for behavioral/muscle performance, ultra-structural quantification, contractility of slow- and fast-fiber muscles and calcium-handling experiments.

### Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Conflict of Interest statement. None declared.

### Funding

This work was supported by the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skeletal Diseases of National Institute of Health (NIH) [R01 AR068429 to P.B.A., R01 AR044345 to A.H.B.], the National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) [R01 HD075802 to A.H.B.], and National Human Genome Research Institute of NIH [U19 HD077671 to P.B.A. and A.H.B.], and the Muscular Dystrophy Association [MDA383249 to A.H.B.]. V.J. was supported by grants from the National Center of Scientific Research, France, the National Institute for Health and Medical Research (INSERM) France, Université Claude Bernard Lyon 1, and AFM-Téléthon (MyoNeurALP program). C.K. was recipient of a Ph.D. fellowship from AFM-Téléthon.

### References

- Agrawal, P.B., Pierson, C.R., Joshi, M., Liu, X., Ravenscroft, G., Moghadaszadeh, B., Talabere, T., Viola, M., Swanson, L.C., Haliloglu, G. et al. (2014) SPEG interacts with myotubularin, and its deficiency causes centronuclear myopathy with dilated cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, **95**, 218–226.
- Wang, H., Castiglioni, C., Kacar Bayram, A., Fattori, F., Pekuz, S., Araneda, D., Per, H., Erazo, R., Gumus, H., Zorludemir, S. et al. (2017) Insights from genotype-phenotype correlations by novel SPEG mutations causing centronuclear myopathy. *Neuromuscul. Disord.*, **27**, 836–842.
- North, K.N., Wang, C.H., Clarke, N., Jungbluth, H., Vainzof, M., Dowling, J.J., Amburgey, K., Quijano-Roy, S., Beggs, A.H., Sewry, C. et al. (2014) Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul. Disord.*, **24**, 97–116.
- Bevilacqua, J.A., Monnier, N., Bitoun, M., Eymard, B., Ferreiro, A., Monges, S., Lubieniecki, F., Taratuto, A.L., Laquerriere, A., Claeys, K.G. et al. (2011) Recessive RYR1 mutations cause unusual congenital myopathy with prominent nuclear internalization and large areas of myofibrillar disorganization. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **37**, 271–284.
- Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P.Y., Lacene, E., Ferrer, X., Laforet, P., Martin, J.J., Laporte, J., Lochmuller, H., Beggs, A.H. et al. (2005) Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.*, **37**, 1207–1209.
- Nicot, A.S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Pettersson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J.M., Biancalana, V., Oldfors, A. et al. (2007) Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat. Genet.*, **39**, 1134–1139.
- Laporte, J., Hu, L.J., Kretz, C., Mandel, J.L., Kioschis, P., Coy, J.F., Klauck, S.M., Poustka, A. and Dahl, N. (1996) A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.*, **13**, 175–182.
- Ceyhan-Birsoy, O., Agrawal, P.B., Hidalgo, C., Schmitz-Abe, K., Dechene, E.T., Swanson, L.C., Soemedi, R., Vasli, N., Iannaccone, S.T., Shieh, P.B. et al. (2013) Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology*, **81**, 1205–1214.
- Al-Qusairi, L., Weiss, N., Toussaint, A., Berbey, C., Messaddeq, N., Kretz, C., Sanoudou, D., Beggs, A.H., Allard, B., Mandel, J.L. et al. (2009) T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 18763–18768.

10. Amoasii, L., Hnia, K., Chicanne, G., Brech, A., Cowling, B.S., Muller, M.M., Schwab, Y., Koebel, P., Ferry, A., Payrastre, B. et al. (2013) Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J. Cell Sci.*, **126**, 1806–1819.
11. Dowling, J.J., Vreede, A.P., Low, S.E., Gibbs, E.M., Kuwada, J.Y., Bonnemann, C.G. and Feldman, E.L. (2009) Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.*, **5**, e1000372.
12. Hsieh, C.M., Fukumoto, S., Layne, M.D., Maemura, K., Charles, H., Patel, A., Perrella, M.A. and Lee, M.E. (2000) Striated muscle preferentially expressed genes alpha and beta are two serine/threonine protein kinases derived from the same gene as the aortic preferentially expressed gene-1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36966–36973.
13. Liu, X., Hall, S.R., Wang, Z., Huang, H., Ghanta, S., Di Sante, M., Leri, A., Anversa, P. and Perrella, M.A. (2015) Rescue of neonatal cardiac dysfunction in mice by administration of cardiac progenitor cells in utero. *Nat. Commun.*, **6**, 8825.
14. Liu, X., Ramjiganesh, T., Chen, Y.H., Chung, S.W., Hall, S.R., Schissel, S.L., Padera, R.F., Jr, Liao, R., Ackerman, K.G., Kajstura, J. et al. (2009) Disruption of striated preferentially expressed gene locus leads to dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation*, **119**, 261–268.
15. Bruning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J. and Kahn, C.R. (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell*, **2**, 559–569.
16. Weiss, N., Andrianjafinony, T., Dupre-Aucouturier, S., Pouvreau, S., Desplanches, D. and Jacquemond, V. (2010) Altered myoplasmic Ca<sup>2+</sup> handling in rat fast-twitch skeletal muscle fibres during disuse atrophy. *Pflugers Arch.*, **459**, 631–644.
17. Kutchukian, C., Lo Scudato, M., Tourneur, Y., Poulard, K., Vignaud, A., Berthier, C., Allard, B., Lawlor, M.W., Buj-Bello, A. and Jacquemond, V. (2016) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca<sup>2+</sup> release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, 14432–14437.
18. Quick, A.P., Wang, Q., Philippen, L.E., Barreto-Torres, G., Chiang, D.Y., Beavers, D., Wang, G., Khalid, M., Reynolds, J.O., Campbell, H.M. et al. (2017) SPEG (striated muscle preferentially expressed protein kinase) is essential for cardiac function by regulating junctional membrane complex activity. *Circ. Res.*, **120**, 110–119.
19. Agrawal, P.B., Joshi, M., Savic, T., Chen, Z. and Beggs, A.H. (2012) Normal myofibrillar development followed by progressive sarcomeric disruption with actin accumulations in a mouse Cfl2 knockout demonstrates requirement of cofilin-2 for muscle maintenance. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 2341–2356.
20. Alexander, M.S., Casar, J.C., Motohashi, N., Vieira, N.M., Eisenberg, I., Marshall, J.L., Gasperini, M.J., Lek, A., Myers, J.A., Estrella, E.A. et al. (2014) MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J. Clin. Invest.*, **124**, 2651–2667.
21. Tabeordbar, M., Zhu, K., Cheng, J.K.W., Chew, W.L., Widrick, J.J., Yan, W.X., Maesner, C., Wu, E.Y., Xiao, R., Ran, F.A. et al. (2016) In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, **351**, 407–411.
22. Chan, S., Head, S.I. and Morley, J.W. (2007) Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **293**, C985–C992.
23. Choi, S.J. and Widrick, J.J. (2010) Calcium-activated force of human muscle fibers following a standardized eccentric contraction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **299**, C1409–C1417.
24. Lawlor, M.W., Armstrong, D., Viola, M.G., Widrick, J.J., Meng, H., Grange, R.W., Childers, M.K., Hsu, C.P., O'Callaghan, M., Pierson, C.R. et al. (2013) Enzyme replacement therapy rescues weakness and improves muscle pathology in mice with X-linked myotubular myopathy. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 1525–1538.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce projet se positionne dans une ambition générale d'approfondir la connaissance fondamentale de la physiologie du couplage EC du muscle squelettique, ici à travers la mise au point, la validation et l'utilisation de nouveaux outils moléculaires fluorescents et à terme, la perspective que ces outils puissent contribuer à comprendre les dysfonctionnements du couplage EC dans certaines situations pathologiques.

L'ensemble du travail s'est basé sur l'utilisation d'une stratégie d'adressage spécifique de biosenseurs fluorescents à la membrane du RS dans le but de comprendre certains mécanismes physiologiques difficilement (voire non) accessibles par les technologies classiques d'étude de la signalisation ionique cellulaire, et encore jamais explorés avec une telle approche dans le muscle. La stratégie s'intègre dans un contexte général où le développement et l'optimisation de biosenseurs fluorescents connaissent un essor phénoménal depuis une dizaine d'années et où les progrès et les évolutions futurs vont sans doute dépasser notre niveau actuel d'imagination des possibilités offertes par ces outils. Enfin il est important de souligner que notre étude présente l'intérêt exclusif d'avoir été réalisée sur une préparation de fibres musculaires intactes dans laquelle l'activité du RS est explorée dans un environnement natif différencié qui offre un niveau de crédibilité physiologique sans commune mesure avec les systèmes d'expression standard ou même avec les myotubes en culture.

Cette étude a offert d'une part la première détection de l'activité électrique de la membrane du RS dans la fibre musculaire au cours du couplage EC. D'autre part, elle représente la première tentative de détection de l'activité de signalisation calcique de triades individuelles dans la fibre musculaire différenciée au cours du couplage EC, à l'aide d'un biosenseur fluorescent adressé.

De par son caractère pionnier dans l'approche expérimentale, l'ensemble de ce travail a fait face à un certain nombre de difficultés qui ont, dans une certaine mesure, temporisé le niveau d'ambition et d'enthousiasme suscité à son initiation. Cependant, c'est aussi une part importante de son intérêt que d'avoir non seulement apporté la démonstration des opportunités uniques apportées par l'approche et les perspectives qu'elle offre, mais aussi d'avoir mis en évidence ses limites, certaines des difficultés spécifiques qu'il a fallu contourner et certaines des questions qui restent en suspens.

## Activité électrique de la membrane du RS (Section 1)

Dans cette partie du travail, nous avons mis au point et caractérisé le variant de type Mermaid (biosenseur-FRET sensible au potentiel, Tsutsui et al. 2008), le plus approprié à l'étude de l'activité électrique du RS : Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup>. Ce variant, fusionné à la séquence d'adressage T306 nous a permis d'accéder à la mesure du potentiel de la membrane du RS au cours de l'activation du couplage EC.

La démarche de mise au point de cet outil moléculaire a dû prendre en compte les impératifs liés à l'adéquation conformationnelle avec la séquence d'adressage, la conformité de la gamme de sensibilité au potentiel et la certitude d'un adressage spécifique et uniforme. Cette démarche s'est largement appuyée sur la possibilité de détecter la réponse de la forme non-adressée du biosenseur exprimée dans le même type cellulaire, forme sous laquelle il est présent dans la membrane des tubules-T. Dans cette situation, le contrôle du potentiel de membrane utilisé soit en configuration de disponibilité du couplage EC (potentiel de maintien négatif), soit en configuration d'inactivation du couplage (potentiel de maintien dépolarisé) s'est révélé un outil précieux à la caractérisation détaillée et rigoureuse de la réponse de la sonde. Nous ne cacherons pas ici que la mise en évidence d'un signal de la sonde T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> lié à l'activation du couplage EC a été une étape enthousiasmante du projet et a interpellé l'intérêt de la communauté scientifique (prix du meilleur Poster: *European Muscle Conference 2016* et *Gordon Research Conference on Excitation-Contraction Coupling 2017* - Manuscrit initialement en revue positive dans la revue *PNAS*) et a conduit à des spéculations concernant les mécanismes potentiellement responsables de ce que nous avons interprété comme un changement de potentiel. Si la mise en évidence de la sensibilité au pH de la réponse (discutée ci-après) aura eu raison de cet enthousiasme, elle ne remet en cause ni l'intérêt de l'étude ni l'importance des résultats.

- **Sensibilité au pH du biosenseur**

Si dans son ensemble notre approche a montré son efficacité, il est cependant important de souligner et de discuter le problème de la sensibilité au pH des biosenseurs réticulaires qui a été à l'origine de la détection de signaux de FRET non désirés lors de l'activation du couplage EC.

Dans nos conditions expérimentales standard, c'est-à-dire en présence d'EGTA intracellulaire, la réponse du biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> se caractérise par une diminution du rapport de FRET au cours de l'activation du couplage EC. L'interprétation de cette réponse de FRET comme un signal de potentiel nous a transitoirement conduit à remettre en cause, à tort, le dogme actuel ainsi

que les mécanismes supposés intervenir dans la régulation du couplage EC en suggérant un processus d'hyperpolarisation (~20 mV luminal négatif) de la membrane du RS lors de l'activation musculaire. Cependant, la construction et l'utilisation du variant T306-Rv-Mermaid, les tests de *photobleaching* de l'accepteur mKOk, la calibration de la sensibilité au pH de la réponse de FRET et la réalisation de mesures en l'absence d'EGTA (présence de BAPTA ou de BTS) sont autant de conditions expérimentales que nous avons développées et qui ont permis de mettre en évidence la contamination au pH de nos signaux de FRET. Ce problème n'avait pas été négligé initialement mais sous-estimé en raison de la résistance aux variations physiologiques de pH intracellulaire des protéines fluorescentes mUKG et mKOk (respectivement pKa= 5.2 et 4.2; Tsutsui et al. 2008). Par ailleurs, l'absence de tout signe de contamination par une variation de pH des signaux du biosenseur Rv-Mermaid reste incomprise et a également compliqué l'identification du problème. En effet, Rv-Mermaid se doit d'être localisée dans la membrane des tubules-T à proximité suffisante des sites de libération de Ca<sup>2+</sup> pour détecter également les variations de pH (voir Pape et al., 1995).

Ces données confirment (s'il en était besoin) la nécessité de caractériser les propriétés des biosenseurs fluorescents dans les conditions expérimentales d'application et de construire un certain nombre de contrôles (négatifs et positifs) afin de s'assurer que la réponse fluorescente du biosenseur dépend seulement du paramètre étudié.

*A contrario*, les travaux publiés récemment par Rad et al. (2018) pourraient constituer un exemple d'interprétation précipitée. Ces auteurs ont utilisé un biosenseur sensible au potentiel de type *ArcLight* (Jin et al. 2012) dans des cellules HEK et des neurones en culture. Brièvement, en réponse à des variations de potentiel-imposé à la membrane plasmique des cellules, Rad et al. (2018) enregistrent deux types de signaux symétriquement opposés. A l'instar de notre conclusion concernant l'origine de la complexité des signaux de Rv-Mermaid<sup>D129E/235R</sup>, les auteurs suggèrent l'existence de deux populations de biosenseurs *ArcLight* : l'une dans la membrane plasmique et l'autre dans la membrane du RE. Pour eux, ces signaux indiquent que la membrane du RE est dotée d'une activité électrique parfaitement synchronisée de celle de la membrane plasmique. Ils concluent sur le rôle clé que joue le RE en tant que « système nerveux cytoplasmique » qui serait capable de conduire les signaux électriques pour la communication intracellulaire. Il est surprenant qu'une telle interprétation puisse être publiée en absence d'un minimum de contrôles, et en regard du dogme actuel, basé sur un solide historique de travaux, selon lequel, malgré leur étroite interaction, le système membranaire réticulaire et la membrane plasmique ne sont ni en continuité physique ni en continuité électrique (voir par exemple Mobley et Eidt, 1982). En revanche, ces travaux soulignent l'intérêt de la stratégie d'adressage spécifique au RE d'un biosenseur fluorescent sensible au potentiel pour la compréhension de l'activité physiologique de ce compartiment dans de nombreux types cellulaires.

Dans notre étude, les mesures réalisées en l'absence d'EGTA montrent une légère augmentation du signal de FRET des biosenseurs T306-Rv-Mermaid et T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> lors de l'activation du couplage EC. Ces données indiquent qu'une légère alcalinisation intracellulaire (de pH 7.2 à pH 7.31) a lieu au cours du couplage EC, ce qui est en accord avec les données de la littérature qui suggèrent l'existence d'un flux de protons du cytoplasme vers le RS lors de la libération de Ca<sup>2+</sup> (Baylor et al. 1982; Pape et al. 1990).

En conclusion, au cours de la libération de Ca<sup>2+</sup>, la réponse FRET des biosenseurs de type Mermaid adressés à la membrane du RS rapporte principalement des variations locales de pH survenant à proximité des sites de libération de Ca<sup>2+</sup>. Nous ne pouvons pas complètement rejeter la possibilité que la sensibilité au pH contribue à dissimuler les légères variations de potentiel membranaire réticulaire qui pourraient avoir lieu au cours de l'activation du couplage. Cependant, si de telles variations existent, elles sont vraisemblablement de très faible amplitude.

- **Stratégies potentielles d'optimisation de la détection du potentiel de membrane du RS**

A l'avenir, l'utilisation d'un biosenseur fluorescent résistant au pH, au rendement et aux cinétiques de réponse améliorées par rapport aux biosenseurs Mermaid contribuerait à détecter des changements de potentiel membranaire de manière plus convaincante.

L'une des stratégies envisageables consisterait en l'introduction d'une ou de plusieurs mutation(s) connue(s) dans la séquence codant pour le VSD, pour les chromophores et/ou pour les *linkers* (voir par exemple Llopis et al. 1998; Miyawaki et al. 1999; Miyawaki et Tsien 2000; Jin et al. 2012; Yang et al. 2016; Chamberland et al. 2017).

Une autre possibilité serait de fusionner le biosenseur Mermaid2<sup>D219E</sup> – composé du couple de fluorescence CFP-YFP, aux rendement ( $\Delta R_{\max}/R_0=50\%$ ) et cinétiques de réponse ( $\tau_{\text{on}}=0.93$  ms et  $\tau_{\text{off}}=10.3$  ms) améliorée par rapport à Mermaid (Tsutsui et al. 2013b) – à une autre séquence d'adressage au RS que la séquence ER qui s'est avérée, dans notre étude, pas suffisamment efficace pour une localisation spécifique du biosenseur.

Enfin, il serait intéressant de tester la réponse d'un autre type de biosenseur fluorescent sensible au potentiel, fusionné à la séquence d'adressage T306. Parmi les candidats potentiels, le biosenseur fluorescent ASAP2f – conçu par insertion de la cpGFP dans la boucle S3-S4 du VSD de la phosphatase voltage-sensible (VSP) de poulet – présentant un rendement ( $F_{\max}/F_0 \sim 45\%$ ), des cinétiques ( $\tau_{\text{on}}= 2.9$  ms et  $\tau_{\text{off}}= 2.4$  ms) de réponse améliorées par rapport aux protéines Mermaid (H. H. Yang et al. 2016) et enfin une gamme de sensibilité au potentiel extrêmement large ( $\sim -150$  à  $+100$  mV) apparaît comme particulièrement adapté à notre situation expérimentale.



- **Potentiel de membrane du RS, contre-courants ioniques et libération de Ca<sup>2+</sup>**

Au final, nos résultats montrent que le RS ne connaît pas de variation substantielle de son potentiel de membrane lors de l'activité musculaire, ce qui est en accord avec les données de la littérature. En effet, il est dogmatiquement admis que les contre-flux ioniques de K<sup>+</sup>, de Cl<sup>-</sup> et de Mg<sup>2+</sup> à travers la membrane du RS contribuent de manière critique à maintenir son potentiel à sa valeur de repos ( $E_{RS}=0$  mV) durant la libération de Ca<sup>2+</sup> (J. S. Smith et al. 1988; Fink et Veigel 1996; Oetliker 1989; Gillespie et Fill 2008a). L'une des perspectives de ce travail, serait de poursuivre par l'identification *in vivo* de la nature des espèces ioniques impliquées dans ce contre-courant. Pour cela, nous pourrions envisager d'étudier la réponse FRET du biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> exprimé dans des fibres musculaires dialysées avec un milieu intracellulaire appauvri en ions K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et/ou Mg<sup>2+</sup>. En effet, on s'attend à ce que, lors de l'ouverture des canaux RYR1, dans des conditions expérimentales de limitation ou de suppression de ce fameux contre-flux ionique, le potentiel de la membrane du RS atteigne très rapidement la valeur du potentiel d'équilibre de l'ion Ca<sup>2+</sup> ( $E_{Ca} = +120$  mV) empêchant ainsi tout flux net d'ions Ca<sup>2+</sup> à travers la membrane du RS (Gillespie et Fill 2008a). On pourrait aussi envisager d'exprimer le biosenseur T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> dans les muscles de souris TRIC A-KO, ce qui offrirait l'opportunité unique de mesurer les signaux de FRET dans des fibres musculaires présentant une perméabilité réticulaire au K<sup>+</sup> diminuée (Yazawa et al. 2007) et ainsi de caractériser l'implication physiologique de ces canaux au cours du couplage EC.

Dans le but d'accéder définitivement à la possibilité que la membrane du RS change au cours du cycle de libération/recapture du Ca<sup>2+</sup>, il serait intéressant d'enregistrer les signaux de FRET de T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> – de manière indépendante des variations de potentiel de la membrane des tubules-T – en réponse à l'application d'agonistes du RYR1 (4-CmC, ryanodine) et/ou de bloqueurs de la pompe SERCA (acide cyclopiazonique ou thapsigargine) dans des fibres musculaires maintenues à un potentiel de repos de -80 mV et lors de l'activation du couplage EC.

Réciproquement, on pourrait envisager d'étudier l'effet de variations du potentiel de membrane du RS sur la libération de Ca<sup>2+</sup> par le RS par expression de rhodopsines microbiennes ayant une activité canal ou pompe (Cl<sup>-</sup>, H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup>) photoactivable (Govorunova et al. 2017). L'insertion de l'une de ces protéines dans la membrane du RS, par sa fusion à T306, constituerait une approche originale qui permettrait d'induire des variations du potentiel de la membrane du RS sur une fibre intacte. En particulier, il serait notamment adapté d'utiliser l'halorhodopsine (NpHR pour *Natremonas pharaonis halorhodopsin*), pompe à chlore, dont l'activation entraînerait une hyperpolarisation de la membrane du RS (Gradinaru et al. 2008). On peut imaginer que, dans ces conditions, l'activation de l'halorhodopsine réticulaire permettrait d'augmenter la libération de Ca<sup>2+</sup> activée par le couplage.

- **Potentiel de membrane du RS et pathologies**

Enfin, nous pourrions envisager d'appliquer notre approche pour étudier l'activité électrique du RS dans des conditions pathologiques associées ou présumées associées à une altération de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans ce contexte, il serait envisageable d'explorer la possibilité que des mutations du RYR1 responsables de la myopathie à cores centraux (CCD) chez l'Homme soient à l'origine de variation du potentiel de membrane du RS lors du couplage EC. Certaines de ces mutations du gène *ryr1* touchent des résidus à proximité de la région pore du canal RYR1 et mènent à une réduction de la conductance au  $\text{K}^+$  et à un défaut de la sélectivité au  $\text{Ca}^{2+}$  (Le Xu et al. 2006; Loy et al. 2011). De plus, il a été précédemment identifié au laboratoire que l'expression de ces RYR1s mutants pathologiques dans les fibres musculaires menait à une réduction de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lefebvre et al. 2011, 2013). La co-expression de ces RYR1s mutants pathologiques et de T306-Rv-Mermaid<sup>D129E/Y235R</sup> constituerait une approche permettant de tester si l'activation de tels canaux est associée au développement de changements du potentiel de membrane durant l'activation du couplage EC.

### **Libération de $\text{Ca}^{2+}$ par le RS dans le nanodomaine triadique (Section 2)**

Cette étude a visé à dépasser les limites imposées par les indicateurs fluorescents diffusibles pour l'imagerie de l'activité des canaux RYR1, via l'adressage d'un biosenseur fluorescent sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  de type GCaMP6f (T.-W. Chen et al. 2013b) à la triade des fibres musculaires – grâce à sa fusion à la séquence T306. L'une des ambitions ultimes de cette stratégie est d'accéder à l'activité élémentaire des canaux RYR1 en conditions physiologiques, dans une fibre musculaire intacte.

- **Limitations liées à l'affinité, aux cinétiques et au rendement de fluorescence de GCaMP6f**

GCaMP6f est actuellement l'un des biosenseurs calciques les plus utilisés pour ses qualités de rendement de fluorescence et de rapidité de ses cinétiques de réponse (voir Tableau II).

Nos propres calibrations et quantifications cinétiques confirment d'une part l'affinité relativement élevée de la sonde pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D=0.65 \mu\text{M}$ ) – en regard des niveaux maximum de changements en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans la fibre musculaire ( $>1\mu\text{M}$ ) – mais aussi les délais substantiels de la réponse en fluorescence qui ne permettent pas de suivre instantanément les variations de  $\text{Ca}^{2+}$  consécutives à l'ouverture physiologique des canaux RYR. Ces contraintes apparaissent quantitativement similaires pour la version libre (GCaMP6f) et pour la version adressée au réticulum jonctionnel (T306-GCaMP6f). Cependant, les variations maximales de fluorescence de T306-GCaMP6f sont environ 5 fois moins importantes que celles de GCaMP6f, sans doute en raison de modifications des propriétés intrinsèques de fluorescence de la sonde, liées à la présence de la séquence d'adressage ou au nano-environnement spécifique de la triade. Contre-intuitivement, les cinétiques des signaux macroscopiques de

fluorescence fournis par T306-GCaMP6f et GCaMP6f en réponse à des dépolarisations imposées sont très similaires alors que les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans et hors de la région triadique sont supposés très différents. Pour éclaircir ce point nous avons profité des compétences en modélisation numérique de notre collaborateur, le Pr. L. Csernoch, pour calculer les changements de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{Ca}^{2+}$  complexé à chacun des deux biosenseurs à différentes positions le long du sarcomère, pendant un flux simulé de  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalement, l'intuition n'était pas fiable : en effet comme observé expérimentalement, les résultats des simulations montrent que les cinétiques de changement en  $\text{Ca}^{2+}$  complexé à GCaMP6f et T306-GCaMP6f sont similaires, en raison des délais cinétiques de la réponse fluorescente.

- **Réponses locales de T306-GCaMP6f**

La diminution du rendement de fluorescences de T306-GCaMP6f en comparaison à la version libre n'était pas anticipée et est regrettable parce qu'elle compromet le rapport signal/bruit des images confocales à partir desquelles la caractérisation locale de l'activité des canaux RYR1 est réalisée. Néanmoins, nos résultats démontrent la capacité exclusive de T306-GCaMP6f à détecter l'apparition et la durée d'activation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à différentes localisations triadiques d'une fibre musculaire donnée. Au final, les résultats révèlent la remarquable reproductibilité de la réponse fluorescente entre différentes triades d'une même fibre musculaire, à un niveau d'activation donné du couplage EC.

De manière inattendue, même en réponse à de faibles niveaux de dépolarisation, proches du seuil, il ne nous a pas été possible de distinguer des propriétés attendues de l'activation voltage-dépendante du système, à savoir :

- une mixité de triades actives et de triade silencieuses
- une activation retardée de certaines triades après le début de la dépolarisation (voir par exemple Csernoch et al., 2004,2008)
- la présence d'événements complexes traduisant le recrutement consécutif de différents groupes de canaux RYR1.

A l'heure actuelle, il n'est pas certain que l'absence de ces phénomènes soit due aux caractéristiques fonctionnelles intrinsèques du couplage EC qui impose une rigueur spatiale extrême à l'ouverture des canaux RYR1, ou plutôt que les limites de résolution en amplitude et en temps de la réponse de la sonde contribuent à masquer toute différence dans le niveau d'activation de différentes triades. Le développement d'un biosenseur plus performant devrait à terme permettre de répondre à cette question.

- **La nécessité d'un biosenseur calcique plus performant**

Malgré ses propriétés ayant fait son succès en regard d'autres biosenseurs calciques, GCaMP6f est encore trop limité en termes d'affinité et de cinétiques pour la détection optimale de l'activité des canaux RYR dans la fibre musculaire. En effet, si le présent travail offre le premier accès à l'activité individuelle des triades au sein d'une fibre musculaire donnée, nous restons tout de même conscient de la capacité limitée du biosenseur T306-GCaMP6f à suivre les variations rapides et importantes de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de l'activation du couplage EC (résumées dans le paragraphe précédent). D'autre part, les transitoires  $\text{Ca}^{2+}$  générés par T306-GCaMP6f sont d'amplitude 5 fois plus faible que lorsqu'il n'est pas fusionné à la séquence d'adressage ce qui réduit considérablement le rapport signal/bruit et la possibilité de détecter de faibles niveaux de libération de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Une alternative d'optimisation pourrait être de fusionner le biosenseur GCaMP6f à une autre séquence d'adressage triadique que T306 comme par exemple FKBP12 (Despa Sanda et al. 2014) ou à une sous-unité du DHPR afin que le biosenseur se trouve face à l'embouchure du canal RYR1. L'intérêt possible est que le changement de séquence d'adressage puisse favoriser le maintien d'un rendement de fluorescence identique à celui de GCaMP6f. D'autre part il n'est pas exclu que la localisation du biosenseur imposée par T306 vis-à-vis du canal RYR1 ne soit pas optimale en regard de gradients éventuels de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le nano-volume triadique.

Une autre possibilité d'optimisation serait d'utiliser un autre biosenseur fluorescent sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  et de le fusionner à T306 ou à une autre séquence d'adressage. Parmi les biosenseurs disponibles à l'heure actuelle, CatchER semble le plus adapté car il est de très petite taille (238 résidus soit  $\sim 40 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$ ; Ormö et al. 1996), présente une très faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 180 \text{ \mu M}$ ) – appropriée à la détection de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  – et des cinétiques de réponse rapides ( $\tau_{\text{off}} = 1.5 \text{ ms}$ ) (S. Tang et al. 2011b). En revanche, son rendement est compté parmi les plus faibles ( $F_{\text{max}}/F_0 \sim 1.8$ ) ce qui représente un inconvénient majeur pour notre question expérimentale.

On peut espérer cependant que les futurs progrès de développement de ce type d'outils permettent d'envisager à terme la disponibilité d'un biosenseur présentant la combinaison de propriétés suivantes :

- une faible affinité : offrant une réponse linéaire sur une très large gamme de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  sans limite de saturation,
- des cinétiques très rapides : permettant de suivre instantanément les changements de  $\text{Ca}^{2+}$ ,
- un rendement optimal de fluorescence.

- **Perspectives en termes de pharmacologie de l'activité des canaux RYR1**

L'une des ambitions ultimes de la stratégie mise en place est de tenter d'établir une corrélation entre les données obtenues *in vitro* (en bicouche lipidique) concernant les propriétés unitaires du canal RYR1, avec son fonctionnement *in vivo* dans la fibre musculaire.

Dans ce contexte, outre la possibilité d'identifier l'activité unitaire des canaux RYR1 *in situ* dans la fibre intacte en conditions de fonctionnement physiologique du couplage EC, il serait aussi intéressant de tester l'effet d'agonistes (caféine, 4-CmC, ryanodine) sur les signaux locaux du biosenseur triadique afin de déterminer comment les propriétés de « gating » du canal sont modifiées.

Aussi, concernant les agonistes produisant un effet activité-dépendant – c'est-à-dire que la fixation de l'agoniste est permise par l'état ouvert du canal, ce qui est le cas pour la ryanodine et la maurocalcine – il serait intéressant d'étudier les conséquences de l'activation du couplage EC sur les signaux locaux de T306-GCaMP6f.

Enfin, l'approche pourrait aussi permettre de lever une ambiguïté concernant l'effet de fortes concentrations de ryanodine – dont il est dogmatiquement admis qu'elles ferment les canaux RYR1— alors que des études précédentes réalisées dans l'équipe (Claude Collet et Jacquemond 2002; Robin et Allard 2012b) suggèrent le contraire.

- **Activité triadique et pathologie**

Une autre perspective ouverte par ce travail est d'étudier les signaux triadiques individuels de T306-GCaMP6f au repos et au cours de l'activation du couplage EC dans des fibres musculaires issues de modèles murins pathologiques dans lesquels des défauts de l'activité canal  $Ca^{2+}$  des RYR1s ont été identifiés ou sont suspectés. Ceci pourrait inclure la souris *mdx* (modèle de la dystrophie de Duchenne; Bellinger et al. 2009), ainsi que les souris MTM1-KO (Kutchukian et al. 2016), DNM2<sup>R465W</sup>-KI (Kutchukian et al., 2017) et SPEG-KO (Huntoon et al., 2018, *manuscrit en annexe du présent document*) qui sont des modèles de trois myopathies centronucléaires distinctes (voir *partie Résultats, Section 3.*). En particulier, un biosenseur calcique adressé à la triade serait beaucoup plus approprié qu'un indicateur calcique diffusible pour caractériser les mécanismes à l'origine de l'hétérogénéité spatiale du signal calcique identifiée dans ces modèles de myopathie centronucléaire.

Enfin un biosenseur calcique adressé à la triade pourrait aussi permettre de caractériser les propriétés fonctionnelles des canaux RYR1 mutants pathologiques associés à l'hyperthermie maligne et à la myopathie à cores centraux (pour revue, voir Jungbluth et al. 2018). Outre l'utilisation du biosenseur dans des modèles murins de ces pathologies, il serait aussi possible d'envisager la co-expression du biosenseur et des formes mutantes pathologiques de RYR1 comme réalisé par Lefebvre et al. (2011, 2013).

## CONCLUSION

Les biosenseurs fluorescents représentent des outils dorénavant incontournables ouvrant des perspectives inespérées pour la compréhension de nombreux mécanismes physiologiques et physiopathologiques.

L'ensemble du présent travail démontre les opportunités offertes par l'utilisation de biosenseurs adressés à un compartiment sub-cellulaire spécifique, dans un contexte d'utilisation de techniques d'électrophysiologie et d'imagerie de fluorescence. Cette combinaison a été appliquée ici à l'étude du couplage EC dans la fibre musculaire différenciée à travers le développement et l'utilisation de biosenseurs fluorescents spécifiquement adressés à la membrane triadique du RS. Cette approche nous a permis d'accéder à l'activité de ce compartiment sub-cellulaire en conditions physiologiques et d'offrir des données uniques concernant son potentiel de membrane et l'activité des canaux RYR1. En revanche, ce travail est aussi un exemple remarquable des limites et des difficultés liées à l'utilisation des biosenseurs et en particulier les problèmes liés à la sensibilité de leurs propriétés vis-à-vis d'autres paramètres que celui recherché.

De manière générale, il apparaît donc absolument nécessaire et inévitable de tester de manière exhaustive les propriétés des biosenseurs dans le modèle cellulaire étudié, de perfectionner et d'adapter les propriétés des biosenseurs afin qu'ils deviennent des outils fiables et parfaitement appropriés à la caractérisation du paramètre d'intérêt, dans le modèle cellulaire d'intérêt.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### - A -

- Abramcheck, C.W., and Best, P.M. (1989). Physiological Role and Selectivity of the in Situ Potassium Channel of the Sarcoplasmic Reticulum in Skinned Frog Skeletal Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* 93, 1-21.
- Adams, B.A., and Beam, K.G. (1990). Muscular Dysgenesis in Mice: A Model System for Studying Excitation-Contraction Coupling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 4, 2809-2816.
- Adrian, R.H., and Peachey, L.D. (1973). Reconstruction of the Action Potential of Frog Sartorius Muscle. *J. Physiol.* 235, 103-131.
- Affolter, H., and Coronado, R. (1985). Agonists Bay-K8644 and CGP-28392 Open Calcium Channels Reconstituted from Skeletal Muscle Transverse Tubules. *Biophys. J.* 48, 341-347.
- Agrawal, P.B., Pierson C.R., Joshi, M., Liu, X., Ravenscroft, G., Moghadaszadeh, B., Talabere, T., et al. (2014). SPEG Interacts with Myotubularin, and Its Deficiency Causes Centronuclear Myopathy with Dilated Cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 218-226.
- Ahern, C.A, Bhattacharya, D., Mortenson, L., and Coronado, R. (2001). A component of excitation-contraction coupling triggered in the absence of the T671-L690 and L720-Q765 regions of the II-III loop of the dihydropyridine receptor alpha(1s) pore subunit. *Biophys. J.* 81, 3294-3307.
- Ahern, G.P, Junankar, P.R., and Dulhunty, A F. (1997). Subconductance states in single-channel activity of skeletal muscle ryanodine receptors after removal of FKBP12. *Biophys. J.* 72, 146-162.
- Ahern, G.P., and Laver, D.R. (1998). ATP Inhibition and Rectification of a Ca<sup>2+</sup>-Activated Anion Channelin Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 74, 2335-2351.
- Ai, H., Shaner, N.C., Cheng, Z., Tsien, R.Y., and Campbell, R.E. (2007). Exploration of New Chromophore Structures Leads to the Identification of Improved Blue Fluorescent Proteins. *Biochemistry.* 46, 5904-5910.
- Akemann, W., Mutoh, H., Perron, A., Rossier, J., and Knöpfel, T. (2010). Imaging Brain Electric Signals with Genetically Targeted Voltage-Sensitive Fluorescent Proteins. *Nat. Methods.* 7, 643-649.
- Akemann, W., Mutoh, H., Perron, A., Park, Y. K., Iwamoto, Y., and Knöpfel, T. (2012). Imaging Neural Circuit Dynamics with a Voltage-Sensitive Fluorescent Protein. *J. Neurophysiol.* 108, 2323-2337.
- Akemann, W., Sasaki, M., Mutoh, H., Imamura, T., Honkura, N., and Knöpfel, T. (2013) Two-Photon Voltage Imaging Using a Genetically Encoded Voltage Indicator. *Sci. Rep.* 3, 2231.
- Akerboom, J., Chen, T.W., Wardill, T.J., Tian, L., Marvin, J.S., Mutlu, S., Calderon, N.C., Esposti, F., Borghuis, B.G., Sun, X.R., et al. (2012). Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *J. Neurosci.* 32, 13819-1384



- Allard, B., Couchoux, H., Pouvreau, S., and Jacquemond, V. (2006). Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release and Depletion Fail to Affect Sarcolemmal Ion Channel Activity in Mouse Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 575, 69–81.
- Allard, B., and Fuster, C. (2018). When Muscle Ca<sup>2+</sup> Channels Carry Monovalent Cations through Gating Pores: Insights into the Pathophysiology of Type 1 Hypokalaemic Periodic Paralysis. *J. Physiol.* 596, 2019–2027.
- Almers, W., Fink, R., and Palade, P.T. (1981). Calcium Depletion in Frog Muscle Tubules: The Decline of Calcium Current under Maintained Depolarization. *J. Physiol.* 312, 177–207.
- Ananthanarayanan, B., Fosbrink, M., Rahdar, M., and Zhang, J. (2007). Live-Cell Molecular Analysis of Akt Activation Reveals Roles for Activation Loop Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 36634–36641.
- Anderson, K., Lai, F.A., Liu, Q.Y., Rousseau, E., Erickson, H.P., and Meissner, G. (1989). Structural and Functional Characterization of the Purified Cardiac Ryanodine Receptor-Ca<sup>2+</sup> Release Channel Complex. *J. Biol. Chem.* 264, 1329–1335.
- Anderson, A.A., Treves, S., Biral, D., Betto, R., Sandonà, D., Ronjat, M., Zorzato, F. (2003). The Novel Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum JP-45 Protein. Molecular Cloning, Tissue Distribution, Developmental Expression, and Interaction with Alpha 1.1 Subunit of the Voltage-Gated Calcium Channel. *J. Biol. Chem.* 278, 39987–39992.
- Andersson-Cedergren, E. (1959). Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *Journal of Ultrastructure Research.* 2, 5-191.
- Andronache, Z., Ursu, D., Lehnert, S., Freichel, M., Flockerzi, V., and Melzer, W. (2007). The Auxiliary Subunit Gamma 1 of the Skeletal Muscle L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Is an Endogenous Ca<sup>2+</sup> Antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17885–17890.
- Aracena, P., Tang, W., Hamilton, S. L., and Hidalgo, C. (2005). Effects of S-Glutathionylation and S-Nitrosylation on Calmodulin Binding to Triads and FKBP12 Binding to Type 1 Calcium Release Channels. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 870–881.
- Armstrong, C.M., Bezanilla, F.M., and Horowicz, P. (1972). Twitches in the Presence of Ethylene Glycol Bis(/3-Aminoethyl Ether)-N,N'- Tetraacetic Acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 267, 605-608.
- Arvanitis, D.A., Vafiadaki, E., Sanoudou, D., and Kranias, E.G. (2011). Histidine-Rich Calcium Binding Protein: The New Regulator of Sarcoplasmic Reticulum Calcium Cycling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 43–49.
- Ataka, K., and Pieribone, V.A.A. (2002). Genetically Targetable Fluorescent Probe of Channel Gating with Rapid Kinetics. *Biophys. J.* 82, 509–516.
- Au, K.S., Cho, K.L., Lee, K.S., and Lai, K.M. (1985). An Endogenous Inhibitor Protein of Synaptic Plasma Membrane (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1985, 821 (2), 348–354.
- Avila, G., and Dirksen, R.T. (2000). Functional Impact of the Ryanodine Receptor on the Skeletal Muscle L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel. *J. Gen. Physiol.* 115, 467–480.

Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., Rosado, J. A., and Smani, T. (2018). The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Front. Physiol.* 9, 257.

- B -

Bacou, F., et Vigneron, P. (1988). Propriétés des fibres musculaires squelettiques: Influence de l'innervation motrice. *Reproduction Nutrition Développement* 28, 1387-1453.

Badura, A., Sun, X.R., Giovannucci, A., Lynch, L.A., Wang, S.S. (2014). Fast Calcium Sensor Proteins for Monitoring Neural Activity. *Neurophotonics*.

Baird, G.S., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (1999). Circular Permutation and Receptor Insertion within Green Fluorescent Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11241–11246.

Bajar, B.T., Wang, E.S., Zhang, S., Lin, M.Z., and Chu, J.A. (2016). Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors* 16.

Baker, B.J., Lee, H., Pieribone, V.A., Cohen, L.B., Isacoff, E.Y., Knopfel, T., and Kosmidis, E.K. (2007). Three Fluorescent Protein Voltage Sensors Exhibit Low Plasma Membrane Expression in Mammalian Cells. *J. Neurosci. Methods.* 161, 32–38.

Baker, B.J., Mutoh, H., Dimitrov, D., Akemann, W., Perron, A., Iwamoto, Y., Jin, L., Cohen, L.B., Isacoff, E.Y., Pieribone, V.A., et al. (2008). Genetically Encoded Fluorescent Sensors of Membrane Potential. *Brain Cell Biol.* 36, 53.

Balke, C.W., Rose, W.C., Marban, E., and Wier, W.G., (1992). Macroscopic and Unitary Properties of Physiological Ion Flux through T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Guinea-Pig Heart Cells. *J. Physiol.* 456, 247-265.

Balshaw, D.M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D.A., and Meissner, G. (2001). Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *J. Biol. Chem.* 276, 20144–20153.

Bannister, R.A., Pessah, I.N., and Beam, K.G. (2009). The Skeletal L-Type Ca<sup>2+</sup> Current Is a Major Contributor to Excitation-Coupled Ca<sup>2+</sup> Entry. *J. Gen. Physiol.* 133, 79–91.

Bannister, R.A., and Beam, K.G. (2013). Cav1.1: The Atypical Prototypical Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channel. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 1587–1597.

Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-Dependent Export from the ER: What's the Ticket Out? *Trends Cell Biol.* 13, 295–300.

Barnett, L., Platasa, J., Popovic, M., Pieribone, V.A., and Hughes, T.A (2012). Fluorescent, Genetically-Encoded Voltage Probe Capable of Resolving Action Potentials. *PLoS ONE.* 7, e43454.

Barone, V., Randazzo, D., Del Re, V., Sorrentino, V., and Rossi, D. (2015). Organization of Junctional Sarcoplasmic Reticulum Proteins in Skeletal Muscle Fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 36, 501-515.

- Baylor, S.M., and Oetliker, H. (1975). Birefringence Experiments on Isolated Skeletal Muscle Fibres Suggest a Possible Signal from the Sarcoplasmic Reticulum. *Nature* 253, 97–101.
- Baylor, S.M., Chandler, W.K., and Marshall, M.W. (1982). Dichroic Components of Arsenazo III and Dichlorophosphonazo III Signals in Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* 331, 179–210.
- Baylor, S.M.; Chandler, W.K., and Marshall, M.W. (1983). Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release in Frog Skeletal Muscle Fibres Estimated from Arsenazo III Calcium Transients. *J. Physiol.* 344, 625–666.
- Beam, K.G., Knudson, C.M., and Powell, J.A.A. (1986). Lethal Mutation in Mice Eliminates the Slow Calcium Current in Skeletal Muscle Cells. *Lethal Mutat. Mice Elimin. Slow Calcium Curr. Skelet. Muscle Cells.* 320, 168–170.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated Ryanodine Receptor Calcium Release Channels Are Leaky in Dystrophic Muscle. *Nat. Med.* 15, 325–330.
- Belousov, V.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A.; Staroverov, D.B., Shakhbazov, K.S., Terskikh, A.V., and Lukyanov, S. (2006). Genetically Encoded Fluorescent Indicator for Intracellular Hydrogen Peroxide. *Nat. Methods.* 3, 281-286.
- Berbey, C., and Allard, B. (2009). Electrically Silent Divalent Cation Entries in Resting and Active Voltage-Controlled Muscle Fibers. *Biophys. J.* 96, 2648–2657.
- Berbey, C., Weiss, N., Legrand, C., and Allard, B. (2009). Transient Receptor Potential Canonical Type 1 (TRPC1) Operates as a Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak Channel in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 284, 36387–36394.
- Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., and Müntener, M. (2000). Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiol. Rev.* 80, 1215–1265.
- Berridge, M.J. (2006). Calcium Microdomains: Organization and Function. *Cell Calcium.* 40, 405–412.
- Berti, C., Zsolnay, V., Shannon, T.R., Fill, M., and Gillespie, D. (2017). Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup> Concentrations Adjust Quickly as Heart Rate Changes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 103, 31–39.
- Betolngar, D.B., Erard, M., Pasquier, H., Bousmah, Y., Diop-Sy, A., Guiot, E., Vincent, P., and Mérola, F. (2015). pH Sensitivity of FRET Reporters Based on Cyan and Yellow Fluorescent Proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 4183–4193.
- Burg, M., Ahern, C.A., Vallejo, P., Conklin, M.W., Powers, P.A., Gregg, R.G., and Coronado, R. (1999). Involvement of the Carboxy-Terminus Region of the Dihydropyridine Receptor Beta1a Subunit in Excitation-Contraction Coupling of Skeletal Muscle. *Biophysical Journal.* 77, 2953-2967.
- Bezaniilla, F., and Horowicz, P. (1975). Fluorescence Intensity Changes Associated with Contractile Activation in Frog Muscle Stained with Nile Blue A. *J. Physiol.* 246, 709–735.
- Blaustein, R.O., and Miller, C. (2004). Shake, Rattle or Roll? *Nature* 427, 499-500.

- Blirando, K., Blaise, R., Gorodnaya, N., Rouxel, C., Meilhac, O., Vincent, P., and Limon, I. (2015). The Stellate Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Is Induced by IL-1 $\beta$  via the Secretion of PGE2 and Subsequent CAMP-Dependent Protein Kinase A Activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1853, 3235–3247
- Block, B.A. (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.
- Böhm, J., Chevessier, F., De Paula, A.M., Koch, C., Attarian, S., Feger, C., Hantaï, D., Laforêt, P., Ghorab, K., Vallat, J.M., et al. (2013). Constitutive Activation of the Calcium Sensor STIM1 Causes Tubular-Aggregate Myopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 271–278.
- Böhm, J., Bulla, M., Urquhart, J.E., Malfatti, E., Williams, S.G., O’Sullivan, J., Szlauer, A., Koch, C., Baranello, G., Mora, M., et al. (2017). ORAI1 Mutations with Distinct Channel Gating Defects in Tubular Aggregate Myopathy. *Hum. Mutat.* 38, 426–438.
- Boncompagni, S., Rossi, A.E., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Polishchuk, R.S., Dirksen, R.T., and Protasi, F. (2009). Mitochondria Are Linked to Calcium Stores in Striated Muscle by Developmentally Regulated Tethering Structures. *Mol. Biol. Cell.* 20, 1058–1067.
- Bong, A.H.L., and Monteith, G.R. (2018). Calcium Signaling and the Therapeutic Targeting of Cancer Cells. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 1865, 1786-1794.
- Bossert, F., and Vater, W. (1989). 1,4-Dihydropyridines - a Basis for Developing New Drugs. *Med. Res. Rev.* 9, 291–324.
- Bottinelli, R., and Reggiani, C. (200). Human Skeletal Muscle Fibres: Molecular and Functional Diversity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 73, 195–262.
- Brandt, N.R., Franklin, G., Brunschwig, J.P., and Caswell, A.H. (2001). The Role of Mitsugumin 29 in Transverse Tubules of Rabbit Skeletal Muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 406–409.
- Braubach, P., Orynbayev, M., Andronache, Z., Hering, T., Landwehrmeyer, G.B., Lindenberg, K.S., and Melzer, W. (2014). Altered Ca(2+) Signaling in Skeletal Muscle Fibers of the R6/2 Mouse, a Model of Huntington’s Disease. *The Journal of General Physiology* 144, 393-413.
- Brejč, K., Sixma, T.K.; Kitts, P. A., Kain, S. R.; Tsien, R. Y.; Ormö, M.; and Remington, S. J. (1997). Structural Basis for Dual Excitation and Photoisomerization of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2306–2311
- Brum, G., and Rios, E. (1987). Intramembrane Charge Movement in Frog Skeletal Muscle Fibres. Properties of Charge 2. *J. Physiol.* 387, 489–517.
- Brum, G., Ríos, E., and Stéfani, E. (1988). Effects of Extracellular Calcium on Calcium Movements of Excitation-Contraction Coupling in Frog Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* 398, 441–473.
- Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J.J., and Pessah, I.N. (1992). Ryanodine Stabilizes Multiple Conformational States of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel. *J. Biol. Chem.* 267, 23560–23567.

Burkholder, T.J., and Lieber, R.L. (2001). Sarcomere Length Operating Range of Vertebrate Muscles during Movement. *J. Exp. Biol.* 204, 1529–1536.

- C -

Calì, T., Brini, M., and Carafoli, E. (2018). The PMCA Pumps in Genetically Determined Neuronal Pathologies. *Neurosci. Lett.* 663, 2–11.

Campbell, K.P., Knudson, C.M., Imagawa, T., Leung, A.T., Sutko, J.L. Kahl, S.D., Raab, C.R., and Madson, L. (1987). Identification and Characterization of the High Affinity [3H]Ryanodine Receptor of the Junctional Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release Channel. *J. Biol. Chem.* 262, 6460–6463.

Canato, M., Scorzeto, M., Giacomello, M., Protasi, F., Reggiani, C., and Stienen, G.J.M. (2010). Massive Alterations of Sarcoplasmic Reticulum Free Calcium in Skeletal Muscle Fibers Lacking Calsequestrin Revealed by a Genetically Encoded Probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22326–22331.

Cannon, S.C. (2010). Voltage-Sensor Mutations in Channelopathies of Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 588, 1887–1895.

Cannon, S.C. (2015). Channelopathies of Skeletal Muscle Excitability. *Compr. Physiol.* 5, 761–790.

Cao, G., Platisa, J., Pieribone, V.A., Raccuglia, D., Kunst, M., and Nitabach, M.N. (2013). Genetically Targeted Optical Electrophysiology in Intact Neural Circuits. *Cell.* 154, 904–913.

Carpenter, D., Ringrose, C., Leo, V., Morris, A., Robinson, R.L., Halsall, P.J., Hopkins, P.M., and Shaw, M.A. (2009). The Role of CACNA1S in Predisposition to Malignant Hyperthermia. *BMC Med. Genet.* 10, 104.

Casas, M., Figueroa, R., Jorquera, G., Escobar, M., Molgó, J., and Jaimovich, E. (2010). IP<sub>3</sub>-Dependent, Post-Tetanic Calcium Transients Induced by Electrostimulation of Adult Skeletal Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* 136, 455–467

Catterall, W.A. (1986). Molecular Properties of Voltage-Sensitive Sodium Channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 953–985.

Catterall, W.A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555.

Catterall, W.A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

Censier, K., Urwyler, A., Zorzato, F., and Treves, S. (1998). Intracellular Calcium Homeostasis in Human Primary Muscle Cells from Malignant Hyperthermia-Susceptible and Normal Individuals. Effect Of Overexpression of Recombinant Wild-Type and Arg163Cys Mutated Ryanodine Receptors. *J. Clin. Invest.* 101, 1233–1242.

Chamberland, S., Yang, H.H., Pan, M.M., Evans, S.W., Guan, S., Chavarha, M., Yang, Y., Salesse, C., Wu, H., Wu, J.C., et al. (2017). Fast Two-Photon Imaging of Subcellular Voltage Dynamics in Neuronal Tissue with Genetically Encoded Indicators. *eLife* 6, e25690.

- Chattoraj, M., King, B.A., Bublitz, G.U., and Boxer, S.G. (1996). Ultra-Fast Excited State Dynamics in Green Fluorescent Protein: Multiple States and Proton Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8362–8367.
- Chelu, M.G., Goonasekera, S.A., Durham, W.J., Tang, W., Lueck, J.D., Riehl, J., Pessah, I.N.; Zhang, P., Bhattacharjee, M.B., Dirksen, R.T., et al. (2005). Heat- and Anesthesia-Induced Malignant Hyperthermia in an RyR1 Knock-in Mouse. *FASEB J.* *20*, 329–330.
- Chen, S. R., and MacLennan, D.H. (1994). Identification of Calmodulin-, Ca(2+)-, and Ruthenium Red-Binding Domains in the Ca<sup>2+</sup> Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* *269*, 22698–22704.
- Chen, S.R., Li, X., Ebisawa, K., and Zhang, L. (1997). Functional Characterization of the Recombinant Type 3 Ca<sup>2+</sup> Release Channel (Ryanodine Receptor) Expressed in HEK293 Cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 24234–24246.
- Chen, T.W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity. *Nature* *499*, 295–300.
- Cheng, H., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1993). Calcium Sparks: Elementary Events Underlying Excitation-Contraction Coupling in Heart Muscle. *Science*. *262*, 740–744.
- Cherednichenko, G., Hurne, A.M., Fessenden, J.D., Lee, E.H., Allen, P.D., Beam, K.G., and Pessah, I.N. (2004). Conformational Activation of Ca<sup>2+</sup> Entry by Depolarization of Skeletal Myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 15793–15798.
- Chevessier, F., Bauché-Godard, S., Leroy, J.P., Koenig, J., Paturneau-Jouas, M., Eymard, B., Hantaï, D., and Verdière-Sahuqué, M. (2005). The Origin of Tubular Aggregates in Human Myopathies. *J. Pathol.* *207*, 313–323.
- Chin, D., and Means, A.R. (2000). Calmodulin: A Prototypical Calcium Sensor. *Trends Cell Biol.* *10*, 322–328.
- Choi, R.H., Koenig, X., and Launikonis, B.S. (2017). Dantrolene Requires Mg<sup>2+</sup> to Arrest Malignant Hyperthermia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 4811–4815.
- Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A.S., Qian, X., Chuong, A.S.; Li, M., Henninger, M.A., Belfort, G.M., Lin, Y., Monahan, P.E.; et al. (2010). High-Performance Genetically Targetable Optical Neural Silencing via Light-Driven Proton Pumps. *Nature* *463* (7277), 98–102.
- Chu, A., Fill, M., Stefani, E., and Entman, M.L. (1993). Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Does Not Inhibit the Cardiac Muscle Sarcoplasmic Reticulum Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Channel, Although Ca(2+)-Induced Ca<sup>2+</sup> Inactivation of Ca<sup>2+</sup> Release Is Observed in Native Vesicles. *J. Membr. Biol.* *135*, 49–59.
- Chua, M., and Dulhunty, A.F. (1988). Inactivation of Excitation-Contraction Coupling in Rat Extensor Digitorum Longus and Soleus Muscles. *J. Gen. Physiol.* *91*, 737–757.
- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010). Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol. Rev.* *90*, 1103–1163.

- Cifuentes, F., Vergara, J., and Hidalgo, C. (2000). Sodium/Calcium Exchange in Amphibian Skeletal Muscle Fibers and Isolated Transverse Tubules. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 279, 89–97.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., and Gregorio, C.C. (2002). Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 637–706.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W.W. (1993). Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Biochemistry* 3, 1212–1218.
- Collet, C., and Jacquemond, V. (2002). Sustained Release of Calcium Elicited by Membrane Depolarization in Ryanodine-Injected Mouse Skeletal Muscle Fibers. *Biophys. J.* 82, 1509–1523.
- Collet, C., Csernoch, L., and Jacquemond, V. (2003). Intramembrane Charge Movement and L-Type Calcium Current in Skeletal Muscle Fibers Isolated from Control and mdx Mice. *Biophys. J.* 84, 251–265.
- Collet, C., Pouvreau, S., Csernoch, L., Allard, B., and Jacquemond, V. (2004). Calcium Signaling in Isolated Skeletal Muscle Fibers Investigated under “Silicone Voltage-Clamp” Conditions. *Cell Biochem. Biophys.* 40, 225–236.
- Conklin, M.W., Barone, V., Sorrentino, V., and Coronado, R. (1999). Contribution of Ryanodine Receptor Type 3 to Ca<sup>2+</sup> Sparks in Embryonic Mouse Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 77, 1394–1403.
- Copello, J. A., Barg, S., Sonnleitner, A., Porta, M., Diaz-Sylvester, P., Fill, M., Schindler, H., and Fleischer, S. (2002). Differential Activation by Ca<sup>2+</sup>, ATP and Caffeine of Cardiac and Skeletal Muscle Ryanodine Receptors after Block by Mg<sup>2+</sup>. *J. Membr. Biol.* 187, 51–64.
- Coronado, R., Rosenberg, R.L., and Miller, C. (1980). Ionic Selectivity, Saturation, and Block in a K<sup>+</sup>-Selective Channel from Sarcoplasmic Reticulum. *J. Gen. Physiol.* 76, 425–446.
- Coronado, R., and Affolter, H. (1986). Insulation of the Conduction Pathway of Muscle Transverse Tubule Calcium Channels from the Surface Charge of Bilayer Phospholipid. *J. Gen. Physiol.* 87, 933–953.
- Coronado, R., and Affolter, H. (1986). Characterization of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels from Purified Skeletal Muscle Transverse Tubules. In *Ion Channel Reconstitution*; Miller, C., Ed.; Springer US: Boston, MA, pp 483–505.
- Craig, R., and Woodhead, J.L. (2006). Structure and Function of Myosin Filaments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 204–212.
- Csernoch, L., Zhou, J., Stern, M. D., Brum, G., and Ríos, E. (2004). The Elementary Events of Ca<sup>2+</sup> Release Elicited by Membrane Depolarization in Mammalian Muscle. *J. Physiol.* 557, 43–58.
- Csernoch, L. (2007). Sparks and Embers of Skeletal Muscle: The Exciting Events of Contractile Activation. *Pflugers Arch.* 454, 869–878.
- Csernoch, L., Pouvreau, S., Ronjat, M., and Jacquemond, V. (2008). Voltage-Activated Elementary Calcium Release Events in Isolated Mouse Skeletal Muscle Fibers. *J. Membr. Biol.* 226, 43–55.

Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995). Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20, 448–455.

Cui, Y., Tae, H.S., Norris, N.C., Karunasekara, Y., Pouliquin, P., Board, P.G., Dulhunty, A.F., and Casarotto, M.G.A. (2009). Dihydropyridine Receptor A1s 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.

Cusimano, V., Pampinella, F., Giacomello, E., and Sorrentino, V. (2009). Assembly and Dynamics of Proteins of the Longitudinal and Junctional Sarcoplasmic Reticulum in Skeletal Muscle Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 4695–4700.

## - D -

Dayal, A., Schrötter, K., Pan, Y., Föhr, K., Melzer, W., and Grabner, M. (2017). The Ca<sup>2+</sup> Influx through the Mammalian Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Is Irrelevant for Muscle Performance. *Nat. Commun.* 8, 475.

Delbono, O., and Stefani, E. (1993). Calcium Transients in Single Mammalian Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* 463, 689–707.

Delbono, O. (1995). Ca<sup>2+</sup> Modulation of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release in Rat Skeletal Muscle Fibers. *J. Membr. Biol.* 146, 91–99.

Denmeade, S.R., and Isaacs, J.T. (2005). The SERCA Pump as a Therapeutic Target: Making a “Smart Bomb” for Prostate Cancer. *Cancer Biol. Ther.* 4, 21–29.

Des Georges, A., Clarke, O.B., Zalk, R., Yuan, Q., Condon, K.J., Grassucci, R.A., Hendrickson, W.A., Marks, A.R., and Frank, J. (2016). Structural Basis for Gating and Activation of RyR1. *Cell* 167, 145–157.

Despa, S., Shui, B., Bossuyt, J., Lang, D., Kotlikoff, M.I., and Bers, D.M. (2014). Junctional Cleft [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Measurements Using Novel Cleft-Targeted Ca<sup>2+</sup> Sensors. *Circ. Res.* 115, 339–347

Dimitrov, D., He, Y., Mutoh, H., Baker, B.J., Cohen, L., Akemann, W., and Knöpfel, T. (2007). Engineering and Characterization of an Enhanced Fluorescent Protein Voltage Sensor. *PLoS ONE* 2, e440.

Dombeck, D.A., Harvey, C.D., Tian, L., Looger, L.L., and Tank, D.W. (2010). Functional Imaging of Hippocampal Place Cells at Cellular Resolution during Virtual Navigation. *Nat. Neurosci.* 13, 1433–1440.

Donoso, P., Prieto, H., and Hidalgo, C. (1995). Luminal Calcium Regulates Calcium Release in Triads Isolated from Frog and Rabbit Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 68, 507–515.

Du, G.G., Ashley, C.C., and Lea, T.J. (1994). Effects of Thapsigargin and Cyclopiazonic Acid on the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Pump of Skinned Fibres from Frog Skeletal Muscle. *Pflug. Arch.* 429, 169–175.

Dubowitz, V., and Pearse, A.G. (1960). Oxidative Enzymes And Phosphorylase in Central Core Disease of Muscle. *The Lancet* 276, 23–24.



Dubowitz, V., and Roy, S. (1970). Central Core Disease of Muscle: Clinical, Histochemical and Electron Microscopic Studies of an Affected Mother and Child. *Brain J. Neurol.* 93 (1), 133–146.

Dulhunty, A.F. (1991). Activation and Inactivation of Excitation-Contraction Coupling in Rat Soleus Muscle. *J. Physiol.* 439, 605–626.

Dulhunty, A.F. (1992). The Voltage-Activation of Contraction in Skeletal Muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 57, 181–223.

Dulhunty, A.F., and Lavert, D.R.A. (2002). Ca<sup>2+</sup>-Activated Anion Channel in the Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle. In *Current Topics in Membranes; Calcium-Activated Chloride Channels*. Academic Press 53, 59–80.

Dulhunty, A.F., Wei-LaPierre, L., Casarotto, M.G., and Beard, N.A. (2017). Core Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Calcium Release Complex. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 44, 3–12.

Dumont, N.A., Bentzinger, C.F. Sincennes, M.C., and Rudnicki, M.A. (2015). Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr. Physiol.* 5, 1027–1059.

Durham, W.J., Aracena-Parks, P., Long, C., Rossi, A.E., Goonasekera, S.A., Boncompagni, S., Galvan, D.L., Gilman, C.P., Baker, M.R., Shirokova, N., et al. (2008). RyR1 S-Nitrosylation Underlies Environmental Heat Stroke and Sudden Death in Y522S RyR1 Knockin Mice. *Cell* 133, 53–65.

#### - E -

Efremov, R.G., Leitner, A., Aebersold, R., and Raunser, S. (2015). Architecture and Conformational Switch Mechanism of the Ryanodine Receptor. *Nature* 517, 39–43.

Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002). The Dystrophin-Associated Protein Complex. *J. Cell Sci.* 115, 2801–2803.

Eisenberg, B.R. (1982). The T-SR Junction in Contracting Single Skeletal Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* 79, 1–19.

Endo, M. (1977). Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum. *Physiol. Rev.* 57, 71–108.

Endo, M. (2009). Calcium-Induced Calcium Release in Skeletal Muscle. *Physiol. Rev.* 89, 1153–1176.

Engel, A., and Franzini-Armstrong, C. (1994). *Myology: Basic and Clinical*. 2nd edition. McGraw-Hill: New York.

Eu, J.P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2000). The Skeletal Muscle Calcium Release Channel: Coupled O<sub>2</sub> Sensor and NO Signaling Functions. *Cell* 102, 499–509.

#### - F -

Felder, E., and Franzini-Armstrong, C. (2002). Type 3 Ryanodine Receptors of Skeletal Muscle Are Segregated in a Parajunctional Position. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1695–1700.

- Feldmeyer, D., Melzer, W., and Pohl, B. (1990). Effects of Gallopamil on Calcium Release and Intramembrane Charge Movements in Frog Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* 421, 343–362.
- Ferreira Gregorio, J., Pequera, G., Manno, C., Ríos, E., and Brum, G. (2017). The Voltage Sensor of Excitation-Contraction Coupling in Mammals: Inactivation and Interaction with Ca<sup>2+</sup>. *J. Gen. Physiol.* 149, 1041–1058.
- Fill, M., and Copello, J.A. (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol. Rev.* 82, 893–922.
- Fink, R.H.A., and Veigel, C. (1996). Calcium Uptake and Release Modulated by Counter-Ion Conductances in the Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle. *Acta Physiol. Scand.* 156, 387–396.
- Fleig, A., Takeshima, H., and Penner, R. (1996). Absence of Ca<sup>2+</sup> Current Facilitation in Skeletal Muscle of Transgenic Mice Lacking the Type 1 Ryanodine Receptor. *J. Physiol.* 496, 339–345.
- Fleischer, S., and Inui, M. (1989). Biochemistry and Biophysics of Excitation-Contraction Coupling. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18, 333–364.
- Fliegel, L., Newton, E., Burns, K., and Michalak, M. (1990). Molecular Cloning of cDNA Encoding a 55-KDa Multifunctional Thyroid Hormone Binding Protein of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 15496–15502.
- Flucher, B.E., Conti, A., Takeshima, H., and Sorrentino, V. (1999). Type 3 and Type 1 Ryanodine Receptors Are Localized in Triads of the Same Mammalian Skeletal Muscle Fibers. *J. Cell Biol.* 146, 621–630.
- Flytzanis, N.C., Bedbrook, C.N., Chiu, H., Engqvist, M.K.M., Xiao, C., Chan, K.Y., Sternberg, P.W., Arnold, F.H., and Gradinaru, V. (2014). Archaelhodopsin Variants with Enhanced Voltage-Sensitive Fluorescence in Mammalian and *Caenorhabditis Elegans* Neurons. *Nat. Commun.* 5, 4894.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55–75.
- Fourest-Lieuvain, A., Rendu, J., Osseni, A., Pernet-Gallay, K., Rossi, D., Oddoux, S., Brocard, J., Sorrentino, V., Marty, I., and Fauré, J. (2012). Role of Triadin in the Organization of Reticulum Membrane at the Muscle Triad. *J. Cell Sci.* 125, 3443–3453.
- Franzini-Armstrong, C. (1970). Studies of the Triads. *J. Cell Biol.* 47, 488–499.
- Franzini-Armstrong, C., Landmesser, L., and Pilar, G. (1975). Size and Shape of Transverse Tubule Openings in Frog Twitch Muscle Fibers. *J. Cell Biol.* 64, 493–497.
- Franzini-Armstrong, C., and Peachey, L.D. (1981). Striated muscle-contraction and control mechanisms. *J. Cell Biol.* 91, 166–86.
- Franzini-Armstrong, C., and Nunzi, G. (1983). Junctional Feet and Particles in the Triads of a Fast-Twitch Muscle Fibre. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4, 233–252.

Franzini-Armstrong, C. (1991). Simultaneous Maturation of Transverse Tubules and Sarcoplasmic Reticulum during Muscle Differentiation in the Mouse. *Dev. Biol.* 146, 353–363.

Freise, D., Held, B., Wissenbach, U., Pfeifer, A., Trost, C., Himmerkus, N., Schweig, U. et al. (2000). Absence of the Subunit of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Increases L-Type Ca<sup>2+</sup> Currents and Alters Channel Inactivation Properties. *J. Biol. Chem.* 275, 14476–14481.

Frommer, W.B., Davidson, M.W. and Campbell, R.E. (2009). Genetically Encoded Biosensors Based on Engineered Fluorescent Proteins. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2833–2841.

Fruen, B.R., Bardy, J.M., Byrem, T.M., Strasburg, G.M., and Louis, C.F. (2000). Differential Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Skeletal and Cardiac Muscle Ryanodine Receptors in the Presence of Calmodulin. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 279, C724–C733.

Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J., and MacLennan, D.H. (1991). Identification of a Mutation in Porcine Ryanodine Receptor Associated with Malignant Hyperthermia. *Science* 253, 448–451.

Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., and Allard, B. (2017a). Elevated Resting H<sup>+</sup> Current in the R1239H Type 1 Hypokalaemic Periodic Paralysis Mutated Ca<sup>2+</sup> Channel. *J. Physiol.* 595, 6417–6428.

Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., Charnet, P., and Allard, B. (2017b). Na Leak with Gating Pore Properties in Hypokalemic Periodic Paralysis V876E Mutant Muscle Ca Channel. *J. Gen. Physiol.* 149, 1139–1148.

## - G -

Gach, M.P., Cherednichenko, G., Haarmann, C., Lopez, J.R., Beam, K.G., Pessah, I.N., Franzini-Armstrong, C., and Allen, P.D. (2008). A2 $\delta$ 1 Dihydropyridine Receptor Subunit Is a Critical Element for Excitation-Coupled Calcium Entry but Not for Formation of Tetrads in Skeletal Myotubes. *Biophys. J.* 94, 3023–3034.

Gailly, P. (2012). TRP Channels in Normal and Dystrophic Skeletal Muscle. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 326–334.

Gan, W.B., and Lichtman, J.W. (1998). Synaptic Segregation at the Developing Neuromuscular Junction. *Science* 282, 1508–1511.

Garaschuk, O., Griesbeck, O., and Konnerth, A. (2007). Troponin C-Based Biosensors: A New Family of Genetically Encoded Indicators for in Vivo Calcium Imaging in the Nervous System. *Cell Calcium* 42, 351–361.

García, J., and Schneider, M.F. (1993). Calcium Transients and Calcium Release in Rat Fast-Twitch Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* 463, 709–728.

García, J., Tanabe, T., and Beam, K.G. (1994). Relationship of Calcium Transients to Calcium Currents and Charge Movements in Myotubes Expressing Skeletal and Cardiac Dihydropyridine Receptors. *J. Gen. Physiol.* 103, 125–147.

- Gautam, S.G., Perron, A., Mutoh, H., and Knöpfel, T. (2009). Exploration of Fluorescent Protein Voltage Probes Based on Circularly Permuted Fluorescent Proteins. *Front. Neuroeng.* 2, 14.
- Geeves, M.A., and Holmes, K.C. (1999). Structural Mechanism of Muscle Contraction. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 687–728.
- Gillespie, D., Xu, L., Wang, Y., and Meissner, G. (2005). (De)Constructing the Ryanodine Receptor: Modeling Ion Permeation and Selectivity of the Calcium Release Channel. *J. Phys. Chem. B.* 109, 15598–15610.
- Gillespie, D., and Fill, M. (2008). Intracellular Calcium Release Channels Mediate Their Own Countercurrent: The Ryanodine Receptor Case Study. *Biophys. J.* 95, 3706–3714.
- Gillespie, D., Chen, H., and Fill, M. (2012). Is Ryanodine Receptor a Calcium or Magnesium Channel? Roles of K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> during Ca<sup>2+</sup> Release. *Cell Calcium* 51, 427–433.
- Gillies, A.R., and Lieber, R.L. (2011). Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. *Muscle Nerve* 44, 318–331.
- Goedhart, J., Van Weeren, L., Hink, M.A., Vischer, N.O.E., Jalink, K., and Gadella, T.W.J. (2010). Bright Cyan Fluorescent Protein Variants Identified by Fluorescence Lifetime Screening. *Nat. Methods* 7, 137–139.
- Golini, L., Chouabe, C., Berthier, C., Cusimano, V., Fornaro, M., Bonvallet, R., Formoso, L., Giacomello, E., Jacquemond, V., and Sorrentino, V. (2011). Junctophilin 1 and 2 Proteins Interact with the L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Dihydropyridine Receptors (DHPRs) in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 286, 43717–43725.
- Gomes, A.V., Potter, J.D., and Szczesna-Cordary, D. (2002). The Role of Troponins in Muscle Contraction. *IUBMB Life* 54, 323–333.
- González, A., Kirsch, W.G., Shirokova, N., Pizarro, G., Stern, M.D., and Ríos, E. (2000). The Spark and Its Ember: Separately Gated Local Components of Ca<sup>2+</sup> Release in Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 115, 139–158.
- Gonzalez-Serratos, H., Valle-Aguilera, R., Lathrop, D. A., and Garcia, M. C. (1982). Slow Inward Calcium Currents Have No Obvious Role in Muscle Excitation-Contraction Coupling. *Nature* 298, 292–294.
- Goonasekera, S.A., Lam, C.K.; Millay, D.P., Sargent, M.A., Hajjar, R.J., Kranias, E.G., and Molkentin, J.D. (2011). Mitigation of Muscular Dystrophy in Mice by SERCA Overexpression in Skeletal Muscle. *J. Clin. Invest.* 121, 1044–1052.
- Gouadon, E., Schuhmeier, R.P., Ursu, D., Anderson, A.A., Treves, S., Zorzato, F., Lehmann-Horn, F., and Melzer, W. A. (2006). Possible Role of the Junctional Face Protein JP-45 in Modulating Ca<sup>2+</sup> Release in Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 572, 269–280.
- Govorunova, E.G., Sineshchekov, O.A., Li, H., and Spudich, J.L. (2017). Microbial Rhodopsins: Diversity, Mechanisms, and Optogenetic Applications. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 845–872.

Grabner, M., Dirksen, R.T., Suda, N., and Beam, K.G. (1999). The II-III Loop of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Is Responsible for the Bi-Directional Coupling with the Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 21913–21919.

Gradinaru, V., Thompson, K.R., and Deisseroth, K. (2008). ENpHR: A Natronomonas Halorhodopsin Enhanced for Optogenetic Applications. *Brain Cell Biol.* 36, 129–139.

Gradinaru, V., Zhang, F., Ramakrishnan, C., Mattis, J., Prakash, R., Diester, I., Goshen, I., Thompson, K. R., and Deisseroth, K. (2010). Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics. *Cell* 141, 154–165.

Gregg, R.G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J. A., Coronado, R., et al. (1996). Absence of the  $\beta$  Subunit (Cchb1) of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Alters Expression of the A1 Subunit and Eliminates Excitation-Contraction Coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13961–13966.

Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001). Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein MECHANISM AND APPLICATIONS. *J. Biol. Chem.* 276, 29188–29194.

Griffiths, E. J., and Rutter, G.A. Mitochondrial Calcium as a Key Regulator of Mitochondrial ATP Production in Mammalian Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1324–1333.

Guo, W., and Campbell, K.P. (1995). Association of Triadin with the Ryanodine Receptor and Calsequestrin in the Lumen of the Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 270, 9027–9030.

Guo, T., Nani, A., Shonts, S., Perryman, M., Chen, H., Shannon, T., Gillespie, D., and Fill, M. (2013). Sarcoplasmic Reticulum K(+) (TRIC) Channel Does Not Carry Essential Countercurrent during Ca(2+) Release. *Biophys. J.* 105, 1151–1160.

Guy, H.R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular Model of the Action Potential Sodium Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 508–512.

Györke, I., and Györke, S. (1998). Regulation of the Cardiac Ryanodine Receptor Channel by Luminal Ca<sup>2+</sup> Involves Luminal Ca<sup>2+</sup> Sensing Sites. *Biophys. J.* 75, 2801–2810.

Györke, I., Hester, N., Jones, L.R., and Györke, S. (2004). The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. *Biophys. J.* 86, 2121–2128.

## - H -

Han, P., Cai, W., Wang, Y., Lam, C.K., Arvanitis, D.A., Singh, V.P., Chen, S., Zhang, H., Zhang, R., Cheng, H., et al. (2011). Catecholaminergic-Induced Arrhythmias in Failing Cardiomyocytes Associated with Human HRCS96A Variant Overexpression. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 301, 1588–1595.

Hayashi, K., Miller, R.G., and Brownell, A.K.W. (1989). Central Core Disease: Ultrastructure of the Sarcoplasmic Reticulum and T-Tubules. *Muscle Nerve* 12, 95–102.

- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12501–12504.
- Heim, R., and Tsien, R.Y. (1996). Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Curr. Biol.* *6*, 178–182.
- Heim, N., and Griesbeck, O. (2004). Genetically Encoded Indicators of Cellular Calcium Dynamics Based on Troponin C and Green Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 14280–14286.
- Henry, P. D. (1980). Comparative Pharmacology of Calcium Antagonists: Nifedipine, Verapamil and Diltiazem. *Am. J. Cardiol.* *46*, 1047–1058.
- Hermann-Frank, A., Richter, M., and Lehmann-Horn, F. (1996). 4-Chloro-m-Cresol: A Specific Tool to Distinguish between Malignant Hyperthermia-Susceptible and Normal Muscle. *Biochem. Pharmacol.* *52*, 149–155.
- Hernández-Ochoa, E.O., and Schneider, M.F. (2012). Voltage Clamp Methods for the Study of Membrane Currents and SR Ca(2+) Release in Adult Skeletal Muscle Fibres. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *108*, 98–118.
- Hernández-Ochoa, E.O., Olojo, R.O., Rebbeck, R.T., Dulhunty, A.F., and Schneider, M.F. (2014).  $\beta$ 1a490-508, a 19-Residue Peptide from C-Terminal Tail of Cav1.1 B1a Subunit, Potentiates Voltage-Dependent Calcium Release in Adult Skeletal Muscle Fibers. *Biophys. J.* *106*, 535–547.
- Herrmann-Frank, A., Richter, M., Sarközi, S., Mohr, U., and Lehmann-Horn, F. (1996). 4-Chloro-m-Cresol, a Potent and Specific Activator of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1289*, 31–40.
- Herrmann-Frank, A., Lüttgau, H.C., and Stephenson, D. G. (1999). Caffeine and Excitation-contraction Coupling in Skeletal Muscle: A Stimulating Story. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *20*, 223–237.
- Herron, T.J., Lee, P., and Jalife, J. (2012). Optical Imaging of Voltage and Calcium in Cardiac Cells & Tissues. *Circ. Res.* *110*, 609–623.
- Herz, R., and Weber, A. (1965). Caffeine Inhibition of Ca Uptake by Muscle Reticulum. *Fed. Proc.* *24*, 208.
- Herzberg, O., Moulton, J., and James, M.N.A. (1986). Model for the Ca<sup>2+</sup>-Induced Conformational Transition of Troponin C. A Trigger for Muscle Contraction. *J. Biol. Chem.* *261*, 2638–2644.
- Higashijima, S., Masino, M.A., Mandel, G., and Fetcho, J.R. (2003). Imaging Neuronal Activity During Zebrafish Behavior With a Genetically Encoded Calcium Indicator. *J. Neurophysiol.* *90*, 3986–3997.
- Hochreiter, B., Garcia, A.P., and Schmid, J.A. (2015). Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors* *15*, 26281–26314.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., and Katz, B. (1952). Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo. *J. Physiol.* *116*, 424–448.

Hodgkin, A.L., and Horowicz, P. (1960). Potassium Contractures in Single Muscle Fibres. *J. Physiol.* 153, 386–403.

Hollingworth, S., Harkins, A.B., Kurebayashi, N., Konishi, M., and Baylor, S.M. (1992). Excitation-Contraction Coupling in Intact Frog Skeletal Muscle Fibers Injected with Mmolar Concentrations of Fura-2. *Biophys. J.* 63, 224–234.

Hollingworth, S., and Baylor, S.M. (2013). Comparison of Myoplasmic Calcium Movements during Excitation-Contraction Coupling in Frog Twitch and Mouse Fast-Twitch Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* 141, 567–583.

Houdusse, A., Love, M.L., Dominguez, R., Grabarek, Z., and Cohen, C. (1997). Structures of Four Ca<sup>2+</sup>-Bound Troponin C at 2.0 Å Resolution: Further Insights into the Ca<sup>2+</sup>-Switch in the Calmodulin Superfamily. *Structure* 5, 1695–1711.

Hsieh, C.M., Fukumoto, S., Layne, M.D., Maemura, K., Charles, H., Patel, A., Perrella, M.A., and Lee, M.E. (2000). Striated Muscle Preferentially Expressed Genes  $\alpha$  and  $\beta$  Are Two Serine/Threonine Protein Kinases Derived from the Same Gene as the Aortic Preferentially Expressed Gene-1. *J. Biol. Chem.* 275, 36966–36973.

Huang, G.N., Zeng, W., Kim, J.Y., Yuan, J.P., Han, L., Muallem, S., and Worley, P.F. (2006). STIM1 Carboxyl-Terminus Activates Native SOC, I Crac and TRPC1 Channels. *Nat. Cell Biol.* 8, 1003.

Hui, C.S., and Milton, R.L. (1987). Suppression of Charge Movement in Frog Skeletal Muscle by D600. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 8, 195–208.

Hurne, A.M., O'Brien, J.J., Wingrove, D., Cherednichenko, G., Allen, P.D., Beam, K.G., and Pessah, I.N. (2005). Ryanodine Receptor Type 1 (RyR1) Mutations C4958S and C4961S Reveal Excitation-Coupled Calcium Entry (ECCE) Is Independent of Sarcoplasmic Reticulum Store Depletion. *J. Biol. Chem.* 280, 36994–37004.

- I -

Igami, K., Yamaguchi, N., and Kasai, M. (1999). Regulation of Depolarization-Induced Calcium Release from Skeletal Muscle Triads by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *Jpn. J. Physiol.* 49, 81–87.

Ikemoto, N., Antoniu, B., Kang, J.J., Mészáros, L.G., and Ronjat, M. (1991). Intravesicular Calcium Transient during Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum. *Biochemistry* 30, 5230–5237.

Imagawa, T., Smith, J.S., Coronado, R., and Campbell, K.P. (1987). Purified Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Is the Ca<sup>2+</sup>-Permeable Pore of the Calcium Release Channel. *J. Biol. Chem.* 262, 16636–16643.

Inesi, G., and Tadini-Buoninsegni, F. (2014). Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange, Lumenal Ca<sup>2+</sup> Release and Ca<sup>2+</sup>/ATP Coupling Ratios in the Sarcoplasmic Reticulum ATPase. *J. Cell Commun. Signal.* 8, 5–11.

Irving, M. (1989). Simultaneous Monitoring of Changes in Magnesium and Calcium Concentrations in Frog Cut Twitch Fibers Containing Antipyrylazo III. *J. Gen. Physiol.* 93, 585–608.

Isaeva, E.V., Shkryl, V.M., and Shirokova, N. (2005). Mitochondrial Redox State and Ca<sup>2+</sup> Sparks in Permeabilized Mammalian Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 565, 855–872.

Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura, K., and Takeshima, H. (2001). Deficiency of Triad Junction and Contraction in Mutant Skeletal Muscle Lacking Junctophilin Type 1. *J. Cell Biol.* 154, 1059–1067.

- J -

Jacquemond, V., and Rougier, O. (1988). Nifedipine and BAY K Inhibit Contraction Independently from Their Action on Calcium Channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 1002–1007.

Jacquemond, V., Csernoch, L., Klein, M.G., and Schneider, M.F. (1991). Voltage-Gated and Calcium-Gated Calcium Release during Depolarization of Skeletal Muscle Fibers. *Biophys. J.* 60, 867–873.

Jacquemond, V., and Schneider, M.F. (1992). Effects of Low Myoplasmic Mg<sup>2+</sup> on Calcium Binding by Parvalbumin and Calcium Uptake by the Sarcoplasmic Reticulum in Frog Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 100, 115–135.

Jacquemond, V. (1997). Indo-1 Fluorescence Signals Elicited by Membrane Depolarization in Enzymatically Isolated Mouse Skeletal Muscle Fibers. *Biophys. J.* 73, 920–928.

Jane Lalli, M., Yong, J., Prasad, V., Hashimoto, K., Plank, D., Babu, G.J., Kirkpatrick, D., Walsh, R.A., Sussman, M., Yatani, A., et al. (2001). Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) 1a Structurally Substitutes for SERCA2a in the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum and Increases Cardiac Ca<sup>2+</sup> Handling Capacity. *Circ. Res.* 89, 160–167.

Jares-Erijman, E.A., and Jovin, T.M. (2003). FRET Imaging. *Nat. Biotechnol.* 21, 1387–1395.

Jenden, D.J., and Fairhurst, A.S. (1969). The Pharmacology of Ryanodine. *Pharmacol. Rev.* 21, 1–25.

Ji, Y., Loukianov, E., Loukianova, T., Jones, L.R., and Periasamy, M. (1999). SERCA1a Can Functionally Substitute for SERCA2a in the Heart. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 276, H89–H97.

Jiang, T., Guo, D., Wang, Q., Wu, X., Li, Z., Zheng, Z., Yin, B., Xia, L., Tang, J., Luo, W., et al. (2015). Developing a Genetically Encoded Green Fluorescent Protein Mutant for Sensitive Light-up Fluorescent Sensing and Cellular Imaging of Hg(II). *Anal. Chim. Acta* 876, 77–82.

Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R. (2003). The Principle of Gating Charge Movement in a Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel. *Nature* 423, 42.

Jin, L., Han, Z., Platasa, J., Woollorton, J.R.A., Cohen, L B., and Pieribone, V.A. (2012). Single Action Potentials and Subthreshold Electrical Events Imaged in Neurons with a Fluorescent Protein Voltage Probe. *Neuron* 75, 779–785.

Jones, R.A.; Harrison, C., Eaton, S.L., Llaverro Hurtado, M., Graham, L.C., Alkhamash, L., Oladiran, O.A., Gale, A., Lamont, D. J., Simpson, H., et al. (2017). Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep.* 21, 2348–2356.



Jones, S.W. (1998). Overview of Voltage-Dependent Calcium Channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 299–312.

Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., Jaimovich, E., and Casas, M. (2013). Cav1.1 Controls Frequency-Dependent Events Regulating Adult Skeletal Muscle Plasticity. *J. Cell Sci.* 126, 1189–1198.

Julian, F.J., Moore, J.W., and Goldman, D.E. (1962). Current-Voltage Relations in the Lobster Giant Axon Membrane Under Voltage Clamp Conditions. *J. Gen. Physiol.* 45, 1217–1238.

Jungbluth, H. (2007). Central Core Disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 2, 25.

Jungbluth, H., Treves, S., Zorzato, F., Sarkozy, A., Ochala, J., Sewry, C., Phadke, R., Gautel, M., and Muntoni, F. (2018). Congenital Myopathies: Disorders of Excitation-Contraction Coupling and Muscle Contraction. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 151–167.

## - K -

Kabbara, A.A., and Allen, D.G. (2001). The Use of the Indicator Fluo-5N to Measure Sarcoplasmic Reticulum Calcium in Single Muscle Fibres of the Cane Toad. *J. Physiol.* 534, 87–97.

Kaestner, L., and Lipp, P. (2011). Screening Action Potentials: The Power of Light. *Front. Pharmacol.* 2, 42.

Kamp, F., Donoso, P., and Hidalgo, C. (1998). Changes in Luminal PH Caused by Calcium Release in Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. *Biophys. J.* 74, 290–296.

Kannan, M., Vasan, G., and Pieribone, V.A. (2019). Optimizing Strategies for Developing Genetically Encoded Voltage Indicators. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 53.

Kasai, H., Yao, A., Oyama, T., Hasegawa, H., Akazawa, H., Toko, H., Nagai, T., Kinugawa, K., Kohmoto, O., Maruyama, K., et al. (2004). Direct Measurement of Ca<sup>2+</sup> Concentration in the SR of Living Cardiac Myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 1014–1020.

Kasai, M., and Ide, T. (1996). Regulation of Calcium Release Channel in Sarcoplasmic Reticulum. *Ion Channels* 4, 303–331.

Kasuya, G., Hiraizumi, M., Maturana, A.D., Kumazaki, K., Fujiwara, Y., Liu, K., Nakada-Nakura, Y.; Iwata, S., Tsukada, K., Komori, T., et al. (2016). Crystal Structures of the TRIC Trimeric Intracellular Cation Channel Orthologues. *Cell Res.* 26, 1288–1301.

Kawano, S., Nakamura, F., Tanaka, T., and Hiraoka, M. (1992). Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Chloride Channels Regulated by Protein Kinase A. *Circ. Res.* 71, 585–589.

Kawano S; and Hiraoka M. (1993). Protein Kinase A-Activated Chloride Channel Is Inhibited by the Ca(2+)-Calmodulin Complex in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Circ. Res.* 73, 751–757.

Kelly, D.E. (1969). The Fine Structure of Skeletal Muscle Triad Junctions. *J. Ultrastruct. Res.* 29, 37–49.

- Kerr, R., Lev-Ram, V., Baird, G., Vincent, P., Tsien, R.Y., and Schafer, W.R. (2000). Optical Imaging of Calcium Transients in Neurons and Pharyngeal Muscle of *C. Elegans*. *Neuron* 26, 583–594.
- Kettlun, C., González, A., Ríos, E., and Fill, M. (2003). Unitary Ca<sup>2+</sup> Current through Mammalian Cardiac and Amphibian Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Channels under Near-Physiological Ionic Conditions. *J. Gen. Physiol.* 122, 407–417.
- Kibat, C. Krishnan, S., Ramaswamy, M., Baker, B.J., and Jesuthasan, S. (2016). Imaging Voltage in Zebrafish as a Route to Characterizing a Vertebrate Functional Connectome: Promises and Pitfalls of Genetically Encoded Indicators. *J. Neurogenet.* 30, 80–88.
- Kimura, J., Noma, A., and Irisawa, H. (1986). Na-Ca Exchange Current in Mammalian Heart Cells. *Nature* 319, 596–597.
- Kirsch, W.G., Uttenweiler, D., and Fink, R.H.A. (2001). Spark- and Ember-like Elementary Ca<sup>2+</sup> Release Events in Skinned Fibres of Adult Mammalian Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 537, 379–389.
- Klarenbeek, J.B., Goedhart, J., Hink, M.A., Gadella, T.W.J., and Jalink, K. (2011). A mTurquoise-Based CAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-out Has Improved Dynamic Range. *PLoS One* 6, e19170.
- Klarenbeek, J., and Jalink, K. (2014). Detecting CAMP with an EPAC-Based FRET Sensor in Single Living Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1071, 49–58.
- Klein, M.G., Cheng, H., Santana, L.F., Jiang, Y.H., Lederer, W.J., and Schneider, M.F. (1996). Two Mechanisms of Quantized Calcium Release in Skeletal Muscle. *Nature* 379, 455.
- Klein, M. G., Lacampagne, A., and Schneider, M. F. (1997). Voltage Dependence of the Pattern and Frequency of Discrete Ca<sup>2+</sup> Release Events after Brief Repriming in Frog Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11061–11066.
- Klopfenstein, D. R., Klumperman, J., Lustig, A. Kammerer, R. A., Oorschot, V., and Hauri, H.P. (2001). Subdomain-Specific Localization of Climp-63 (P63) in the Endoplasmic Reticulum Is Mediated by Its Luminal  $\alpha$ -Helical Segment. *J. Cell Biol.* 153, 1287–1300.
- Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., and Verkman, A.S. (1998). Green Fluorescent Protein as a Noninvasive Intracellular pH Indicator. *Biophys. J.* 74, 1591–1599.
- Knöpfel, T., Tomita, K., Shimazaki, R., and Sakai, R. (2003). Optical Recordings of Membrane Potential Using Genetically Targeted Voltage-Sensitive Fluorescent Proteins. *Methods* 30, 42–48.
- Kobayashi, Y.M., Alseikhan, B.A., and Jones, L.R. (2000). Localization and Characterization of the Calsequestrin-Binding Domain of Triadin 1 EVIDENCE FOR A CHARGED  $\beta$ -STRAND IN MEDIATING THE PROTEIN-PROTEIN INTERACTION. *J. Biol. Chem.* 275, 17639–17646.
- Koshita, M., and Oba, T. (1989). Caffeine Treatment Inhibits Drug-Induced Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum and Caffeine Contracture but Not Tetanus in Frog Skeletal Muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 890–895.

Kourie, J.I. (1997). Chloride Channels in the Sarcoplasmic Reticulum of Muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68, 263–300.

Kourie, J.I. (1999). pH-Modulation of Chloride Channels from the Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle. *J. Membr. Biol.* 167, 73–83.

Kovács, L., Ríos, E., and Schneider, M.F. (1979). Calcium Transients and Intramembrane Charge Movement in Skeletal Muscle Fibres. *Nature* 279, 391–396.

Kovács, L., Schümperli, R.A., and Szücs, G. (1983). Comparison of Birefringence Signals and Calcium Transients in Voltage-clamped Cut Skeletal Muscle Fibres of the Frog. *J. Physiol.* 341, 579–593.

Kralj, J.M., Hochbaum, D.R., Douglass, A.D., and Cohen, A.E. (2011a). Electrical Spiking in Escherichia Coli Probed with a Fluorescent Voltage-Indicating Protein. *Science* 333, 345–348.

Kralj, J. M., Douglass, A.D., Hochbaum, D.R., Maclaurin, D., and Cohen, A.E. (2011b). Optical Recording of Action Potentials in Mammalian Neurons Using a Microbial Rhodopsin. *Nat. Methods* 9, 90–95.

Krause, T., Gerbershagen, M.U., Fiege, M., Weisshorn, R., and Wappler, F. (2004). Dantrolene--a Review of Its Pharmacology, Therapeutic Use and New Developments. *Anaesthesia* 59, 364–373.

Kretsinger, R.H., and Nockolds, C.E. (1973). Carp Muscle Calcium-Binding Protein. II. Structure Determination and General Description. *J. Biol. Chem.* 248, 3313–3326.

Kutchukian, C., Lo Scudato, M., Tourneur, Y., Poulard, K., Vignaud, A., Berthier, C., Allard, B., Lawlor, M.W., Buj-Bello, A., and Jacquemond, V. (2016). Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition Restores Ca<sup>2+</sup> Release Defects and Prolongs Survival in Myotubularin-Deficient Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 14432–14437.

Kutchukian, C., Szentesi, P., Allard, B., Trochet, D., Beuvin, M., Berthier, C., Tourneur, Y., Guicheney, P., Csernoch, L., Bitoun, M., et al. (2017). Impaired Excitation-Contraction Coupling in Muscle Fibres from the Dynamin2R465W Mouse Model of Centronuclear Myopathy. *J. Physiol.* 595, 7369–7382.

Kuum, M., Veksler, V., Liiv, J., Ventura-Clapier, R., and Kaasik, A. (2012). Endoplasmic Reticulum Potassium–Hydrogen Exchanger and Small Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Activities Are Essential for ER Calcium Uptake in Neurons and Cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* 125, 625–633.

- L -

Lacampagne, A., Lederer, W.J., Schneider, M.F., and Klein, M.G. (1996). Repriming and Activation Alter the Frequency of Stereotyped Discrete Ca<sup>2+</sup> Release Events in Frog Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 497, 581–588.

Lacampagne, A., Liu, X., Reiken, S., Bussiere, R., Meli, A. C., Lauritzen, I., Teich, A.F., Zalk, R., Saint, N., Arancio, O., et al. (2017). Post-Translational Remodeling of Ryanodine Receptor Induces Calcium Leak Leading to Alzheimer's Disease-like Pathologies and Cognitive Deficits. *Acta Neuropathol.* 134, 749–767.

- Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q. Y., and Meissner, G. (1988). Purification and Reconstitution of the Calcium Release Channel from Skeletal Muscle. *Nature* 331, 315–319.
- Lamb, G.D., and Stephenson, D.G. (1991). Effect of Mg<sup>2+</sup> on the Control of Ca<sup>2+</sup> Release in Skeletal Muscle Fibres of the Toad. *J. Physiol.* 434, 507–528.
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Launikonis, B.S., Zhou, J., Royer, L., Shannon, T.R., Brum, G., and Ríos, E. (2005). Confocal Imaging of [Ca<sup>2+</sup>] in Cellular Organelles by SEER, Shifted Excitation and Emission Ratioing of Fluorescence. *J. Physiol.* 567, 523–543.
- Launikonis, B.S. Stephenson, D. G., and Friedrich, O. (2009). Rapid Ca<sup>2+</sup> Flux through the Transverse Tubular Membrane, Activated by Individual Action Potentials in Mammalian Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 587, 2299–2312.
- Launikonis, B.S., Murphy, R.M., and Edwards, J.N. (2010). Toward the Roles of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Skeletal Muscle. *Pflugers Arch.* 460, 813–823.
- Lee, C.S., Dagnino-Acosta, A., Yarotsky, V., Hanna, A., Lyfenko, A., Knoblauch, M., Georgiou, D.K., Poché, R.A., Swank, M.W., Long, C., et al. (2015). Ca<sup>2+</sup> Permeation and/or Binding to CaV1.1 Fine-Tunes Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Signaling to Sustain Muscle Function. *Skelet. Muscle* 5, 4.
- Lee, J.M.; Rho, S.H., Shin, D.W., Cho, C., Park, W.J., Eom, S.H., Ma, J., and Kim, D.H. (2004). Negatively Charged Amino Acids within the Intraluminal Loop of Ryanodine Receptor Are Involved in the Interaction with Triadin. *J. Biol. Chem.* 279, 6994–7000.
- Lefebvre, R., Legrand, C., González-Rodríguez, E., Groom, L., Dirksen, R.T., and Jacquemond, V. (2011). Defects in Ca<sup>2+</sup> Release Associated with Local Expression of Pathological Ryanodine Receptors in Mouse Muscle Fibres. *J. Physiol.* 589, 5361–5382.
- Lefebvre, R., Legrand, C., Groom, L., Dirksen, R.T., and Jacquemond, V. (2013). Ca<sup>2+</sup> Release in Muscle Fibers Expressing R4892W and G4896V Type 1 Ryanodine Receptor Disease Mutants. *PloS One* 8, e54042.
- LeFurgey, A., Davilla, S.D., Kopf, D.A., Sommer, J.R., and Ingram, P. (1992). Real-Time Quantitative Elemental Analysis and Mapping: Microchemical Imaging in Cell Physiology. *J. Microsc.* 165, 191–223.
- Legrand, C., Giacomello, E., Berthier, C., Allard, B., Sorrentino, V., and Jacquemond, V. (2008). Spontaneous and Voltage-Activated Ca<sup>2+</sup> Release in Adult Mouse Skeletal Muscle Fibres Expressing the Type 3 Ryanodine Receptor: Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signals Due to Type 3 Ryanodine Receptor in Muscle. *J. Physiol.* 586, 441–457.
- Lei, C., Wang, Z., Nie, Z., Deng, H., Hu, H., Huang, Y., and Yao, S. (2015). Resurfaced Fluorescent Protein as a Sensing Platform for Label-Free Detection of Copper(II) Ion and Acetylcholinesterase Activity. *Anal. Chem.* 87, 1974–1980.
- Lewit-Bentley, A., and Réty, S. (2000). EF-Hand Calcium-Binding Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 637–643.

Li, L., Mirza, S., Richardson, S.J., Gallant, E.M., Thekkedam, C., Pace, S.M., Zorzato, F., Liu, D., Beard, N. A., and Dulhunty, A.F. (2015). A New Cytoplasmic Interaction between Junctin and Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Release Channels. *J Cell Sci* 128, 951–963.

Li, Q., Wanderling, S., Paduch, M., Medovoy, D., Singharoy, A., McGreevy, R., Villalba-Galea, C., Hulse, R.E., Roux, B., Schulten, K., et al. (2014). Structural Mechanism of Voltage-Dependent Gating in an Isolated Voltage-Sensing Domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 244–252.

Li, Z., Matsuoka, S., Hryshko, L.V., Nicoll, D.A., Bersohn, M.M., Burke, E.P.; Lifton, R.P.; and Philipson, K.D. (1994). Cloning of the NCX2 Isoform of the Plasma Membrane Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger. *J. Biol. Chem.* 269, 17434–17439.

Liou, J., Kim, M.L., Do Heo, W., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., and Meyer, T. (2005). STIM Is a Ca<sup>2+</sup> Sensor Essential for Ca<sup>2+</sup>-Store-Depletion-Triggered Ca<sup>2+</sup> Influx. *Curr. Biol.* 15, 1235–1241.

Lipp, P., and Niggli, E. (1996). Submicroscopic Calcium Signals as Fundamental Events of Excitation–Contraction Coupling in Guinea-Pig Cardiac Myocytes. *J. Physiol.* 492, 31–38.

Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H., and Hirschberg, K. (2000). Secretory Protein Trafficking and Organelle Dynamics in Living Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 557–589.

Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G., and Tsien, R.Y. (1998). Measurement of Cytosolic, Mitochondrial, and Golgi pH in Single Living Cells with Green Fluorescent Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6803–6808.

Loy, R. E., Orynbayev, M., Xu, L., Andronache, Z., Apostol, S., Zvaritch, E., MacLennan, D.H., Meissner, G., Melzer, W., and Dirksen, R.T. (2011). Muscle Weakness in Ryr1I4895T/WT Knock-in Mice as a Result of Reduced Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Ion Permeation and Release from the Sarcoplasmic Reticulum. *J. Gen. Physiol.* 137, 43–57.

Lu, X., Xu, L., and Meissner, G. (1994). Activation of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel by a Cytoplasmic Loop of the Dihydropyridine Receptor. *J. Biol. Chem.* 69, 6511–6516.

Lundby, A., Mutoh, H., Dimitrov, D., Akemann, W., and Knöpfel, T. (2008). Engineering of a Genetically Encodable Fluorescent Voltage Sensor Exploiting Fast Ci-VSP Voltage-Sensing Movements. *PLoS One* 3, e2514.

## - M -

MacLennan, D.H., and Wong, P.T.S. (1971). Isolation of a Calcium-Sequestering Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1231–1235.

MacLennan, D.H., Toyofuku, T., and Lytton, J. (1992). Structure-Function Relationships in Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Type Ca<sup>2+</sup> Pumps. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 671, 1–10.

Mank, M., Reiff, D.F., Heim, N., Friedrich, M.W., Borst, A., and Griesbeck, O. (2006). A FRET-Based Calcium Biosensor with Fast Signal Kinetics and High Fluorescence Change. *Biophys. J.* 2006, 90 (5), 1790–1796.

- Mank, M., and Griesbeck, O. (2008). Genetically Encoded Calcium Indicators. *Chem. Rev.* *108*, 1550–1564.
- Mank, M., Santos, A.F., Drenth, S., Mrcic-Flogel, T.D., Hofer, S.B., Stein, V., Hendel, T., Reiff, D.F., Levelt, C., Borst, A., et al. (2008). A Genetically Encoded Calcium Indicator for Chronic in Vivo Two-Photon Imaging. *Nat. Methods* *5*, 805–811.
- Manno, C., Sztretye, M., Figueroa, L., Allen, P.D., and Ríos, E. (2013). Dynamic Measurement of the Calcium Buffering Properties of the Sarcoplasmic Reticulum in Mouse Skeletal Muscle. *J. Physiol.* *591*, 423–442.
- Manno, C., Figueroa, L.C., Gillespie, D., Fitts, R., Kang, C.; Franzini-Armstrong, C., and Rios, E. (2017). Calsequestrin Depolymerizes When Calcium Is Depleted in the Sarcoplasmic Reticulum of Working Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 638–647.
- Marques, M.J., Conchello, J.A., and Lichtman, J.W. (2000). From Plaque to Pretzel: Fold Formation and Acetylcholine Receptor Loss at the Developing Neuromuscular Junction. *J. Neurosci.* *20*, 3663–3675.
- Martonosi, A.N., and Pikula, S. (2003). The Network of Calcium Regulation in Muscle. *Acta Biochim. Pol.* *50*, 1–30.
- Marty, I., Thevenon, D., Scotto, C., Groh, S., Sainnier, S., Robert, M., Grunwald, D., and Villaz, M. (2000). Cloning and Characterization of a New Isoform of Skeletal Muscle Triadin. *J. Biol. Chem.* *275*, 8206–8212.
- Marty, I. (2015). Triadin Regulation of the Ryanodine Receptor Complex: Triadin Regulation of the Ryanodine Receptor Complex. *J. Physiol.* *593*, 3261–3266.
- Marty, I., and Fauré, J. (2016). Excitation-Contraction Coupling Alterations in Myopathies. *J. Neuromuscul. Dis.* *3*, 443–453.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Roseblit, N., and Marks, A.R. (2000). PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts. *Cell* *101*, 365–376.
- Matyjaszkiewicz, A., Venturi, E., O'Brien, F., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H., Tsaneva-Atanasova, K., and Sitsapesan, R. (2015). Subconductance Gating and Voltage Sensitivity of Sarcoplasmic Reticulum K<sup>+</sup> Channels: A Modeling Approach. *Biophys. J.* *109*, 265–276.
- McCombs, J.E., and Palmer, A.E. (2008). Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods* *46*, 152–159.
- Meissner, G. (1975). Isolation and Characterization of Two Types of Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *389*, 51–68.
- Meissner, G. (1983). Monovalent Ion and Calcium Ion Fluxes in Sarcoplasmic Reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* *55*, 65–82.
- Meissner, G., Darling, E., and Eveleth, J. (1986). Kinetics of Rapid Ca<sup>2+</sup> Release by Sarcoplasmic Reticulum. Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Adenine Nucleotides. *Biochemistry* *25*, 236–244.

- Meissner, G., and McKinley, D. (1989). Permeability of Canine Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Vesicles to K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, and Cl<sup>-</sup>. *J. Biol. Chem.* 257, 7704–7711.
- Meissner, G. (1994). Ryanodine Receptor/Ca<sup>2+</sup> Release Channels and Their Regulation by Endogenous Effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 485–508.
- Meissner, G., Rios, E., Tripathy, A., and Pasek, D.A. (1997). Regulation of Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channel (Ryanodine Receptor) by Ca<sup>2+</sup> and Monovalent Cations and Anions. *J. Biol. Chem.* 272, 1628–1638.
- Meissner, G. (2017). The Structural Basis of Ryanodine Receptor Ion Channel Function. *J. Gen. Physiol.* 149, 1065–1089.
- Melzer, W., Rios, E., and Schneider, M.F. (1984). Time Course of Calcium Release and Removal in Skeletal Muscle Fibers. *Biophys. J.* 45, 637–641.
- Melzer, W., Schneider, M.F., Simon, B. J., and Szucs, G. (1986). Intramembrane Charge Movement and Calcium Release in Frog Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 373, 481–511.
- Michelangeli, F., and East, J.M. (2011). A Diversity of SERCA Ca<sup>2+</sup> Pump Inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 789–797.
- Michelucci, A., García-Castañeda, M., Boncompagni, S., and Dirksen, R.T. (2018). Role of STIM1/ORAI1-Mediated Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry in Skeletal Muscle Physiology and Disease. *Cell Calcium* 76, 101–115.
- Miesenböck, G., Angelis, D.A.D., and Rothman, J.E. (1998). Visualizing Secretion and Synaptic Transmission with PH-Sensitive Green Fluorescent Proteins. *Nature* 394, 192–195.
- Mignery, G.A., and Südhof, T.C. (1990). The Ligand Binding Site and Transduction Mechanism in the Inositol-1,4,5-Triphosphate Receptor. *EMBO J.* 9, 3893–3898.
- Miledi, R., Parker, I., and Schalow, G. (1977). Calcium Transients in Frog Slow Muscle Fibres. *Nature* 268, 750–752.
- Miller, C. (1978). Voltage-Gated Cation Conductance Channel from Fragmented Sarcoplasmic Reticulum: Steady-State Electrical Properties. *J. Membr. Biol.* 40, 1–23.
- Mitchell, G., and Heffron, J.J.A. (1982). Porcine Stress Syndromes. In *Advances in Food Research*; Chichester, C. O., Mrak, E. M., Stewart, G. F., Eds.; Academic Press, 1982; Vol. 28, pp 167–230.
- Mitchell, R.D., Simmerman, H.K., and Jones, L.R. (1988). Ca<sup>2+</sup> Binding Effects on Protein Conformation and Protein Interactions of Canine Cardiac Calsequestrin. *J. Biol. Chem.* 263, 1376–1381.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent Indicators for Ca<sup>2+</sup> Based on Green Fluorescent Proteins and Calmodulin. *Nature* 388, 882–887.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R.Y. (1999). Dynamic and Quantitative Ca<sup>2+</sup> Measurements Using Improved Cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 2135–2140.

Miyawaki, A., and Tsien, R.Y. (2000). Monitoring Protein Conformations and Interactions by Fluorescence Resonance Energy Transfer between Mutants of Green Fluorescent Protein. *Methods in enzymology - Elsevier* 327, 472–500.

Møller, J. V., Nissen, P., Sørensen, T.L.M., and Le Maire, M. (2005). Transport Mechanism of the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Pump. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 387–393.

Monnier, N., Procaccio, V., Stieglitz, P., and Lunardi, J. (1997). Malignant-Hyperthermia Susceptibility Is Associated with a Mutation of the Alpha 1-Subunit of the Human Dihydropyridine-Sensitive L-Type Voltage-Dependent Calcium-Channel Receptor in Skeletal Muscle. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1316–1325.

Moremen, K.W., Tiemeyer, M., and Nairn, A.V. (2012). Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 448–462.

Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., and Winant, J. (1974). Intermolecular Energy Transfer in the Bioluminescent System of Aequorea. *Biochemistry* 13, 2656–2662.

Moutin, M.J., and Dupont, Y. (1988). Rapid Filtration Studies of Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release from Skeletal Sarcoplasmic Reticulum. Role of Monovalent Ions. *J. Biol. Chem.* 263, 4228–4235.

Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., and Okamura, Y. (2005). Phosphoinositide Phosphatase Activity Coupled to an Intrinsic Voltage Sensor. *Nature* 435, 1239-1243.

Murayama, T., and Ogawa, Y. (2002). Roles of Two Ryanodine Receptor Isoforms Coexisting in Skeletal Muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 305–311.

Muto, A., Ohkura, M., Kotani, T., Higashijima, S., Nakai, J., and Kawakami, K. (2011). Genetic Visualization with an Improved GCaMP Calcium Indicator Reveals Spatiotemporal Activation of the Spinal Motor Neurons in Zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5425–5430.

Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., and Kawakami, K. (2013). Real-Time Visualization of Neuronal Activity during Perception. *Curr. Biol.* 23, 307–311.

Mutoh, H., Perron, A., Dimitrov, D., Iwamoto, Y., Akemann, W., Chudakov, D.M., and Knöpfel, T. (2009). Spectrally-Resolved Response Properties of the Three Most Advanced FRET Based Fluorescent Protein Voltage Probes. *PLoS ONE* 4, e4455.

Mutoh, H., Akemann, W., and Knöpfel, T. (2012). Genetically Engineered Fluorescent Voltage Reporters. *ACS Chem. Neurosci.* 3, 585–592.

## - N -

Nakajima, S., Bastian, J. (1975). Membrane properties of the transverse tubular system of amphibian skeletal muscle. In Reuben JP, Purbura DP, Benlett MUL, Kandel ER (eds): *Electrobiology of Nerve, Muscle and Synapse*. New York, Raven Press, 243-267

Nagai, T., Sawano, A., Park, E.S., and Miyawaki, A. (2001). Circularly Permuted Green Fluorescent Proteins Engineered to Sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3197–3202.



Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A.A (2002). Variant of Yellow Fluorescent Protein with Fast and Efficient Maturation for Cell-Biological Applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87-90.

Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Miyawaki, A. (2004). Expanded Dynamic Range of Fluorescent Indicators for Ca<sup>2+</sup> by Circularly Permuted Yellow Fluorescent Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 10554–10559.

Nagasaki, K., and Kasai, M. (1983). Fast Release of Calcium from Sarcoplasmic Reticulum Vesicles Monitored by Chlorotetracycline Fluorescence. *J. Biochem.* 94, 1101–1109.

Nagasaki, K., and Fleischer, S. (1988). Ryanodine Sensitivity of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum. *Cell Calcium* 9, 1–7.

Nakai, J., Dirksen, R.T., Nguyen, H.T., Pessah, I.N., Beam, K.G., and Allen, P.D. (1996). Enhanced Dihydropyridine Receptor Channel Activity in the Presence of Ryanodine Receptor. *Nature* 380, 72–75.

Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B., and Beam, K.G. (1998). Localization in the II-III Loop of the Dihydropyridine Receptor of a Sequence Critical for Excitation-Contraction Coupling. *J. Biol. Chem.* 273, 24983–24986.

Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K.A (2001). High Signal-to-Noise Ca<sup>2+</sup> Probe Composed of a Single Green Fluorescent Protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 137-141.

Nekouzadeh, A., and Rudy, Y. (2007). Statistical properties of ion channel records. Part I: Relationship to the macroscopic current. *Math. Biosci.* 210, 291-314.

Nicoll, D.A., Quednau, B.D., Qui, Z., Xia, Y.R., Lusi, A.J., and Philipson, K.D. (1996). Cloning of a Third Mammalian Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger, NCX3. *J. Biol. Chem.* 271, 24914–24921.

Niggli, E., and Shirokova, N. (2007). A Guide to Sparkology: The Taxonomy of Elementary Cellular Ca<sup>2+</sup> Signaling Events. *Cell Calcium* 42, 379–387.

Niwa, H., Inouye, S., Hirano, T., Matsuno, T., Kojima, S., Kubota, M., Ohashi, M., and Tsuji, F.I. (1996). Chemical Nature of the Light Emitter of the Aequorea Green Fluorescent Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13617–13622.

Niwa, F., Sakuragi, S., Kobayashi, A., Takagi, S., Oda, Y., Bannai, H., and Mikoshiba, K. (2016). Dissection of Local Ca<sup>2+</sup> Signals inside Cytosol by ER-Targeted Ca<sup>2+</sup> Indicator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 67–73.

- O -

Obermair, G.J., Kugler, G., Baumgartner, S. Tuluc, P., Grabner, M., and Flucher, B.E. (2005). The Ca<sup>2+</sup> Channel A2δ-1 Subunit Determines Ca<sup>2+</sup> Current Kinetics in Skeletal Muscle but Not Targeting of A1S or Excitation-Contraction Coupling. *J. Biol. Chem.* 280, 2229–2237.

O'Brien, F., Eberhardt, D., Witschas, K., El-Ajouz, S., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H., Sitsapesan, R., and Venturi, E. (2019). Enhanced Activity of Multiple TRIC-B Channels: An Endoplasmic

Reticulum/Sarcoplasmic Reticulum Mechanism to Boost Counterion Currents. *J. Physiol.* 597, 2691–2705.

Oddoux, S., Brocard, J., Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, J., Fauré, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J., et al. (2009). Triadin Deletion Induces Impaired Skeletal Muscle Function. *J. Biol. Chem.* 284, 34918–34929.

Oetliker, H. (1989). Energetical Considerations Related to Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum in Skeletal Muscle. *Biomed. Biochim. Acta* 48, 313–318.

Ogawa, Y., Kurebayashi, N., and Murayama, T. (1999). Ryanodine Receptor Isoforms in Excitation-Contraction Coupling. *Adv. Biophys.* 36, 27–64.

Ohkura, M., Sasaki, T., Sadakari, J., Gengyo-Ando, K., Kagawa-Nagamura, Y., Kobayashi, C., Ikegaya, Y., and Nakai, J. (2012). Genetically Encoded Green Fluorescent Ca<sup>2+</sup> Indicators with Improved Detectability for Neuronal Ca<sup>2+</sup> Signals. *PLOS ONE* 7, e51286.

Okkenhaug, H., Weylandt, K.H., Carmena, D., Wells, D.J., Higgins, C.F., and Sardini, A. (2006). The Human ClC-4 Protein, a Member of the CLC Chloride Channel/Transporter Family, Is Localized to the Endoplasmic Reticulum by Its N-Terminus. *FASEB J.* 20, 2390–2392.

Olsen, S., and McKenzie, R.H.A. (2009). Diabatic Three-State Representation of Photoisomerization in the Green Fluorescent Protein Chromophore. *J. Chem. Phys.* 130, 184302.

Ondrias, K., Brillantes, A.M., Scott, A., Ehrlich, B.E., and Marks, A.R. (1996). Single Channel Properties and Calcium Conductance of the Cloned Expressed Ryanodine Receptor/Calcium-Release Channel. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 51, 29–45.

Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. (1996). Remington, S. J. Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein. *Science* 273, 1392–1395.

Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1996). Remington, S. J. Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein. *Science* 273, 1392–1395.

Osseni, A., Sébastien, M., Sarrault, O., Baudet, M., Couté, Y., Fauré, J., Fourest-Lieuvin, A.; and Marty, I. (2016). Triadin and CLIMP-63 Form a Link between Triads and Microtubules in Muscle Cells. *J Cell Sci* 129, 3744–3755.

- P -

Palade, P., and Vergara, J. (1982). Arsenazo III and Antipyrylazo III Calcium Transients in Single Skeletal Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* 79, 679–707.

Palmer, A.E., Jin, C., Reed, J.C., and Tsien, R.Y. (2004). Bcl-2-Mediated Alterations in Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Analyzed with an Improved Genetically Encoded Fluorescent Sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17404–17409.

Palmer, A.E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S.A., Lev-Ram, V, Baker, D., and Tsien, R.Y. (2006). Ca<sup>2+</sup> Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chem. Biol.* 13, 521–530.

- Palmer, A.E.; and Tsien, R.Y. (2006). Measuring Calcium Signaling Using Genetically Targetable Fluorescent Indicators. *Nat. Protoc.* 1, 1057–1065.
- Palmer, A.E., Qin, Y., Park, J.G., and McCombs, J.E. (2011). Design and Application of Genetically Encoded Biosensors. *Trends Biotechnol.* 29, 144–152.
- Pan, Z., Hirata, Y., Nagaraj, R.Y., Zhao, J., Nishi, M., Hayek, S.M., Bhat, M.B., Takeshima, H., and Ma, J. (2004). Co-Expression of MG29 and Ryanodine Receptor Leads to Apoptotic Cell Death EFFECT MEDIATED BY INTRACELLULAR Ca<sup>2+</sup> RELEASE. *J. Biol. Chem.* 279, 19387–19390.
- Paolini, C., Protasi, F., and Franzini-Armstrong, C. (2004). The Relative Position of RyR Feet and DHPR Tetrads in Skeletal Muscle. *J. Mol. Biol.* 342, 145–153.
- Paolini, C., Quarta, M., Nori, A., Boncompagni, S., Canato, M., Volpe, P., Allen, P.D., Reggiani, C., and Protasi, F. (2017). Reorganized Stores and Impaired Calcium Handling in Skeletal Muscle of Mice Lacking Calsequestrin-1. *J. Physiol.* 583, 767–784.
- Pape, P.C., Fénelon, K., and Carrier, N. (2002). Extra Activation Component of Calcium Release in Frog Muscle Fibres. *J. Physiol.* 542, 867–886.
- Pape, P.C., Konishi, M., Hollingworth, S., and Baylor, S.M. (1990). Perturbation of Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release and Phenol Red Absorbance Transients by Large Concentrations of Fura-2 Injected into Frog Skeletal Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* 96, 493–516.
- Parekh, A.B.; and Putney, J.W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 85, 757–810.
- Park, H., Park, I.Y., Kim, E., Youn, B., Fields, K., Dunker, A.K., and Kang, C. (2004). Comparing Skeletal and Cardiac Calsequestrin Structures and Their Calcium Binding A PROPOSED MECHANISM FOR COUPLED CALCIUM BINDING AND PROTEIN POLYMERIZATION. *J. Biol. Chem.* 279, 18026–18033.
- Park, S.H., Zhu, P.P., Parker, R.L., and Blackstone, C. (2010). Hereditary Spastic Paraplegia Proteins REEP1, Spastin, and Atlastin-1 Coordinate Microtubule Interactions with the Tubular ER Network. *J. Clin. Invest.* 120, 1097–1110.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., and Piston, D.W. (1997). Use of the Green Fluorescent Protein and Its Mutants in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* 73, 2782–2790.
- Paul-Pletzer, K., Yamamoto, T., Bhat, M.B., Ma, J., Ikemoto, N., Jimenez, L.S., Morimoto, H., Williams, P.G., and Parness, J. (2002). Identification of a Dantrolene-Binding Sequence on the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 34918–34923.
- Perez, C.F., Mukherjee, S., and Allen, P.D. (2003). Amino Acids 1-1,680 of Ryanodine Receptor Type 1 Hold Critical Determinants of Skeletal Type for Excitation-Contraction Coupling. Role of Divergence Domain D2. *J. Biol. Chem.* 278, 39644–39652.
- Pérez Koldenkova, V., and Nagai, T. (2013). Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators: Properties and Evaluation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 1787–1797.

- Perez-Reyes, E., Kim, H.S., Lacerda, A.E., Horne, W., Wei, X.Y., Rampe, D., Campbell, K. P., Brown, A.M., and Birnbaumer, L. (1989). Induction of Calcium Currents by the Expression of the Alpha 1-Subunit of the Dihydropyridine Receptor from Skeletal Muscle. *Nature* 340, 233–236.
- Periasamy, M., Reed, T.D., Liu, L.H., Ji, Y., Loukianov, E., Paul, R.J., Nieman, M.L., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T.; et al. (1999). Impaired Cardiac Performance in Heterozygous Mice with a Null Mutation in the Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Isoform 2 (SERCA2) Gene. *J. Biol. Chem.* 274, 2556–2562.
- Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA Pump Isoforms: Their Role in Calcium Transport and Disease. *Muscle Nerve* 35, 430–442.
- Perozzo, M.A., Ward, K.B., Thompson, R.B., and Ward, W.W. (1988). X-Ray Diffraction and Time-Resolved Fluorescence Analyses of Aequorea Green Fluorescent Protein Crystals. *J. Biol. Chem.* 263, 7713–7716.
- Perron, A., Mutoh, H., Akemann, W., Gautam, S.G., Dimitrov, D., Iwamoto, Y., and Knöpfel, T. (2009). Second and Third Generation Voltage-Sensitive Fluorescent Proteins for Monitoring Membrane Potential. *Front. Mol. Neurosci.* 2, 5.
- Picard, L., Côté, K., Teijeira, J., Greentree, D., and Rousseau, E. (2002). Sarcoplasmic Reticulum K<sup>+</sup> Channels from Human and Sheep Atrial Cells Display a Specific Electro-Pharmacological Profile. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1163–1172.
- Picher, M., Decrouy, A., Proteau, S., and Rousseau, E. (1997). Conducting and Voltage-Dependent Behaviors of the Native and Purified SR Ca<sup>2+</sup>-Release Channels from the Canine Diaphragm. The First Two Authors Contributed Equally to the Present Work. A.D. Generated the Idea and the Basic Electrophysiological Data. M.P. Recorded Complementary Data and Wrote the Manuscript, While S.P. Performed the Biochemical Experiments and E.R. Supervised the Project. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1328, 243–260.
- Pietraszewska-Bogiel, A., and Gadella, T.W.J. (2011). FRET Microscopy: From Principle to Routine Technology in Cell Biology. *J. Microsc.* 241, 111-118.
- Pitt, S. J., Park, K.H., Nishi, M., Urashima, T., Aoki, S., Yamazaki, D., Ma, J., Takeshima, H., and Sitsapesan, R. (2010). Charade of the SR K<sup>+</sup>-Channel: Two Ion-Channels, TRIC-A and TRIC-B, Masquerade as a Single K<sup>+</sup>-Channel. *Biophys. J.* 99, 417–426.
- Pizarro, G., Fitts, R., Uribe, I., and Ríos, E. (1989). The Voltage Sensor of Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. Ion Dependence and Selectivity. *J. Gen. Physiol.* 94, 405–428.
- Pizarro, G., Shirokova, N., Tsugorka, A., and Ríos, E. (1997). “Quantal” Calcium Release Operated by Membrane Voltage in Frog Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 501, 289–303.
- Polito, M., Klarenbeek, J., Jalink, K., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., Castro, L.R.V. (2013). The NO/CGMP Pathway Inhibits Transient Ca<sup>2+</sup> Signals through the Activation of PDE2 in Striatal Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 7.

Polito, M., Vincent, P., and Guiot, E. (2014). Biosensor Imaging in Brain Slice Preparations. *Methods Mol. Biol.* 1071, 175–194.

Porter, K.R. (1961). THE SARCOPLASMIC RETICULUM: Its Recent History and Present Status. *J. Cell Biol.* 10, 219–226

Porter, C., and Wall, B.T. (2012). Skeletal Muscle Mitochondrial Function: Is It Quality or Quantity That Makes the Difference in Insulin Resistance? *J. Physiol.* 590, 5935–5936.

Porumb, T., Yau, P., Harvey, T.S., and Ikura, M.A. (1994). Calmodulin-Target Peptide Hybrid Molecule with Unique Calcium-Binding Properties. *Protein Eng. Des. Sel.* 7, 109–115.

Pouvreau, S., Allard, B., Berthier, C., and Jacquemond, V. (2004). Control of Intracellular Calcium in the Presence of Nitric Oxide Donors in Isolated Skeletal Muscle Fibres from Mouse. *J. Physiol.* 560, 779–794.

Pouvreau, S., Royer, L., Yi, J., Brum, G., Meissner, G., Ríos, E., and Zhou, J. (2007). Ca<sup>2+</sup> Sparks Operated by Membrane Depolarization Require Isoform 3 Ryanodine Receptor Channels in Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5235–5240.

Prasad, V., Okunade, G.W., Miller, M.L., and Shull, G.E. (2004). Phenotypes of SERCA and PMCA Knockout Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1192–1203.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992). Primary Structure of the Aequorea Victoria Green-Fluorescent Protein. *Gene* 111, 229–233.

Prole, D.L., and Taylor, C.W. (2019). Structure and Function of IP3 Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11.

Protasi, F., Paolini, C., Canato, M., Reggiani, C., and Quarta, M. (2011). Lessons from Calsequestrin-1 Ablation in Vivo: Much More than a Ca<sup>2+</sup> Buffer after All. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 32, 257–270

Putney, J.W.A (1986). Model for Receptor-Regulated Calcium Entry. *Cell Calcium* 7, 1–12.

## - R -

Rad, M.S., Cohen, L.B., Braubach, O., and Baker, B.J. (2018). Monitoring Voltage Fluctuations of Intracellular Membranes. *Sci. Rep.* 8, 6911.

Ravikumar, Y., Nadarajan, S.P., Lee, C.S., Jung, S., Bae, D.H., and Yun, H. (2016). FMN-Based Fluorescent Proteins as Heavy Metal Sensors Against Mercury Ions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 530–539.

Realini, C., Rogers, S.W., and Rechsteiner, M. (1994). KEKE Motifs. *FEBS Lett.* 348, 109–113.

Reddish, F.N., Miller, C.L., Gorkhali, R., and Yang, J.J. (2017). Calcium Dynamics Mediated by the Endoplasmic/Sarcoplasmic Reticulum and Related Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1024.

Reid, B. G., and Flynn, G.C. (1997). Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. *Biochemistry* 36, 6786–6791.

- Reid, M.B. (1998). Role of Nitric Oxide in Skeletal Muscle: Synthesis, Distribution and Functional Importance. *Acta Physiol. Scand.* 162, 401–409.
- Reiff, D.F., Ihring, A., Guerrero, G., Isacoff, E.Y., Joesch, M., Nakai, J., and Borst, A. (2005). In Vivo Performance of Genetically Encoded Indicators of Neural Activity in Flies. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 4766–4778.
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S.E.; Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosemlit, N., et al. (2003). PKA Phosphorylation Activates the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) in Skeletal Muscle: Defective Regulation in Heart Failure. *J. Cell Biol.* 160, 919–928.
- Reuter, H. (1983). Calcium Channel Modulation by Neurotransmitters, Enzymes and Drugs. *Nature* 301, 569–574.
- Rezgui, S.S., Vassilopoulos, S., Brocard, J., Platel, J.C., Bouron, A., Arnoult, C., Oddoux, S., Garcia, L., Waard, M.D., and Marty, I. (2005). Triadin (Trisk 95) Overexpression Blocks Excitation-Contraction Coupling in Rat Skeletal Myotubes. *J. Biol. Chem.* 280, 39302–39308.
- Rios, E., and Brum, G. (1987). Involvement of Dihydropyridine Receptors in Excitation–Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *Nature* 325, 717–720.
- Ríos, E.; and Pizarro, G. (1988). Voltage Sensors and Calcium Channels of Excitation-Contraction Coupling. *Physiology* 3, 223–227.
- Ríos, E., Pizarro, G., and Stefani, E. (1992). Charge Movement and the Nature of Signal Transduction in Skeletal Muscle Excitation-Contraction Coupling. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 109–133.
- Ríos, E., Karhanek, M., Ma, J., and González, A. (1993). An Allosteric Model of the Molecular Interactions of Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 102, 449–481.
- Ríos, E., and Brum, G. (2002). Initiation and Termination of Calcium Sparks in Skeletal Muscle. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 7,1212-1222.
- Ríos, E. (2018). Calcium-Induced Release of Calcium in Muscle: 50 Years of Work and the Emerging Consensus. *J. Gen. Physiol.* 150, 521–537.
- Ríos, E., Gillespie, D., and Franzini-Armstrong, C. (2019). The Binding Interactions That Maintain Excitation-Contraction Coupling Junctions in Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 151, 593–605.
- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W. (2004). An Improved Cyan Fluorescent Protein Variant Useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* 22, 445–449.
- Robin, G., and Allard, B. (2012). Dihydropyridine Receptors Actively Control Gating of Ryanodine Receptors in Resting Mouse Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* 590, 6027–6036.
- Robin, G., Berthier, C., and Allard, B. (2012). Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Permeation Explored from the Lumen Side in Mdx Muscle Fibers under Voltage Control. *J. Gen. Physiol.* 139, 209–218.

Robin, G. and Allard, B. (2013). Major Contribution of Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+) Depletion during Long-Lasting Activation of Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 141, 557–565.

Robin, G., and Allard, B. (2015). Voltage-Gated Ca(2+) Influx through L-Type Channels Contributes to Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+) Loading in Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 593, 4781–4797.

Robinson, R., Carpenter, D., Shaw, M.A., Halsall, J., and Hopkins, P. (2006) Mutations in RYR1 in Malignant Hyperthermia and Central Core Disease. *Hum. Mutat.* 27, 977–989.

Rogers, E.F., Koniuszy, F.R., Shavel, J., and Folkers, K. (1948). Plant Insecticides. I. Ryanodine, A New Alkaloid from *Ryania Speciosa* Vahl. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 3086–3088.

Romoser, V.A., Hinkle, P.M., and Persechini, A. (1997). Detection in Living Cells of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Changes in the Fluorescence Emission of an Indicator Composed of Two Green Fluorescent Protein Variants Linked by a Calmodulin-Binding Sequence A NEW CLASS OF FLUORESCENT INDICATORS. *J. Biol. Chem.* 272, 13270–13274.

Roseblatt, M., Hidalgo, C., Vergara, C., and Ikemoto, N. (1981). Immunological and Biochemical Properties of Transverse Tubule Membranes Isolated from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 256, 8140–8148.

Rosenberg, H., Pollock, N., Schiemann, A., Bulger, T., and Stowell, K. (2015). Malignant Hyperthermia: A Review. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 93.

Rossi, D., Vezzani, B., Galli, L., Paolini, C., Toniolo, L., Pierantozzi, E., Spinozzi, S., Barone, V., Pegoraro, E., Bello, L., et al. (2014a). A Mutation in the CASQ1 Gene Causes a Vacuolar Myopathy with Accumulation of Sarcoplasmic Reticulum Protein Aggregates. *Hum. Mutat.* 35, 1163–1170.

Rossi, D., Bencini, C., Maritati, M., Benini, F., Lorenzini, S., Pierantozzi, E., Scarcella, A.M., Paolini, C., Protasi, F., and Sorrentino, V. (2014b). Distinct Regions of Triadin Are Required for Targeting and Retention at the Junctional Domain of the Sarcoplasmic Reticulum. *Biochem. J.* 458, 407–417.

Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q.Y., and Meissner, G. (1988). Activation of the Ca<sup>2+</sup> Release Channel of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum by Caffeine and Related Compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 75–86.

Roux-Buisson, N., Cacheux, M., Fourest-Lieuvain, A., Fauconnier, J., Brocard, J., Denjoy, I., Durand, P., Guicheney, P., Kyndt, F., Leenhardt, A., et al. (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.

Rüdel, R., Lehmann-Horn, F., Ricker, K., and Küther, G. (1984). Hypokalemic Periodic Paralysis: In Vitro Investigation of Muscle Fiber Membrane Parameters. *Muscle Nerve* 7, 110–120.

- S -

Sagara, Y., and Inesi, G. (1991). Inhibition of the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Transport ATPase by Thapsigargin at Subnanomolar Concentrations. *J. Biol. Chem.* 266, 13503–13506.

- Saito, A., Seiler, S., Chu, A., and Fleischer, S. (1984). Preparation and Morphology of Sarcoplasmic Reticulum Terminal Cisternae from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* 99, 875–885.
- Sakai, R., Repunte-Canonigo, V., Raj, C.D., and Knöpfel, T. (2001). Design and Characterization of a DNA-Encoded, Voltage-Sensitive Fluorescent Protein. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2314–2318.
- Sambuughin, N., Holley, H., Muldoon, S., Brandom, B.W., De Bantel, A.M., Tobin, J.R., Nelson, T.E., and Goldfarb, L. G. (2005). Screening of the Entire Ryanodine Receptor Type 1 Coding Region for Sequence Variants Associated with Malignant Hyperthermia Susceptibility in the North American Population. *Anesthesiology* 102, 515–521.
- Sanchez, J.A., and Stefani, E. (1978). Inward Calcium Current in Twitch Muscle Fibres of the Frog. *J. Physiol.* 283, 197–209.
- Sandow, A. (1952). Excitation-Contraction Coupling in Muscular Response. *Yale J. Biol. Med.* 25, 176–201.
- Sanes, J.R. (2003). The Basement Membrane/Basal Lamina of Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 278, 12601–12604.
- Sanford, L., and Palmer, A. (2017). Chapter One - Recent Advances in Development of Genetically Encoded Fluorescent Sensors. In *Methods in Enzymology - Eds.; Enzymes as Sensors*; Academic Press, 589, 1–49.
- Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J.E., and Ryan, T.A. (2000). The Use of PHluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity. *Biophys. J.* 79, 2199–2208.
- Santo-Domingo, J., and Demaurex, N. (2010). Calcium Uptake Mechanisms of Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1797, 907–912.
- Sárközi, S., Szentesi, P., Cseri, J., Kovács, L., and Csernoch, L. (1996). Concentration-Dependent Effects of Tetracaine on Excitation-Contraction Coupling in Frog Skeletal Muscle Fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 17, 647–656.
- Schiaffino, S., and Margreth, A. (1969). Coordinated Development of the Sarcoplasmic Reticulum and T System During Postnatal Differentiation of Rat Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* 41, 855–875.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol. Rev.* 91, 1447–1531.
- Schneider, M.F., and Chandler, W.K. (1973). Voltage Dependent Charge Movement in Skeletal Muscle: A Possible Step in Excitation–Contraction Coupling. *Nature* 242, 244–246.
- Schneider, M.F., and Simon, B.J. (1988). Inactivation of Calcium Release from the Sarcoplasmic Reticulum in Frog Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 405, 727–745.
- Schneider, M.F. (1999). Ca<sup>2+</sup> Sparks in Frog Skeletal Muscle: Generation by One, Some, or Many SR Ca<sup>2+</sup> Release Channels? *J. Gen. Physiol.* 113, 365–372.



- Schneider, J.S., Shanmugam, M., Gonzalez, J.P., Lopez, H., Gordan, R., Fraidenaich, D., and Babu, G.J. (2013). Increased Sarcolipin Expression and Decreased Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Uptake in Skeletal Muscles of Mouse Models of Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *34*, 349–356.
- Schredelseker, J., Di Biase, V., Obermair, G.J., Felder, E.T., Flucher, B.E., Franzini-Armstrong, C., and Grabner, M. (2005). The Beta 1a Subunit Is Essential for the Assembly of Dihydropyridine-Receptor Arrays in Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17219–17224.
- Schredelseker, J., Shrivastav, M., Dayal, A., and Grabner, M. (2010). Non-Ca<sup>2+</sup>-Conducting Ca<sup>2+</sup> Channels in Fish Skeletal Muscle Excitation-Contraction Coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5658–5663.
- Schweizer, F. E., Betz, H., and Augustine, G. J. (1995). From Vesicle Docking to Endocytosis: Intermediate Reactions of Exocytosis. *Neuron* *14*, 689–696.
- Scott, B.T., Simmerman, H.K., Collins, J.H., Nadal-Ginard, B., and Jones, L.R. (1988). Complete Amino Acid Sequence of Canine Cardiac Calsequestrin Deduced by cDNA Cloning. *J. Biol. Chem.* *263*, 8958–8964.
- Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M., and Martonosi, A. (1989). Cyclopiazonic Acid Is a Specific Inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* *264*; 17816–17823.
- Seo, J.A., Kim, B., Dhanasekaran, D.N., Tsang, B.K., and Song, Y.S. (2016). Curcumin Induces Apoptosis by Inhibiting Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase Activity in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Lett.* *371* (1), 30–37.
- Serysheva, I.I. (2004). Structural Insights into Excitation-Contraction Coupling by Electron Cryomicroscopy. *Biochemistry* *69*, 1226-1232
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., and Tsien, R.Y. (2004). Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from *Discosoma* Sp. Red Fluorescent Protein. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1567-1572.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A Guide to Choosing Fluorescent Proteins. *Nat. Methods* *2*, 905-909.
- Shaner, N.C.; Patterson, G.H., and Davidson, M.W. (2007). Advances in Fluorescent Protein Technology. *J. Cell Sci.* *120*, 4247–4260.
- Shang, W., Lu, F., Sun, T., Xu, J., Li, L.L., Wang, Y., Wang, G., Chen, L., Wang, X., Cannell, M.B., et al. (2014). Imaging Ca<sup>2+</sup> Nanosparks in Heart with a New Targeted Biosensor. *Circ. Res.* *114*, 412–420.
- Sharma, P., Ignatchenko, V., Grace, K., Ursprung, C., Kislinger, T., and Gramolini, A.O. (2010). Endoplasmic Reticulum Protein Targeting of Phospholamban: A Common Role for an N-Terminal Di-Arginine Motif in ER Retention? *PLoS One* *5*, e11496.
- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J.R., Jones, L.R., Kobayashi, Y.M., Wang, Y., Kerrick, W.G.L., Caswell, A.H., Potter, J.D., Miller, T., et al. (2007). Triadins Modulate Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis

but Are Not Essential for Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 282, 37864–37874.

Sheridan, D.C., Cheng, W., Carbonneau, L., Ahern, C.A., and Coronado, R. (2004). Involvement of a Heptad Repeat in the Carboxyl Terminus of the Dihydropyridine Receptor B1a Subunit in the Mechanism of Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 87, 929–942.

Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59 (3), 223–239.

Shirokova, N.J., García, J., Pizarro, G., and Ríos, E. (1996). Ca<sup>2+</sup> Release from the Sarcoplasmic Reticulum Compared in Amphibian and Mammalian Skeletal Muscle. *J. G. Physiol.* 107, 1-18.

Shirokova, N., García, J., and Ríos, E. (1998). Local Calcium Release in Mammalian Skeletal Muscle. *J. Physiol.* 512, 377–384.

Shirokova, N., Shirokov, R., Rossi, D., González, A., Kirsch, W.G., García, J., Sorrentino, V., and Ríos, E. (1999). Spatially Segregated Control of Ca<sup>2+</sup> Release in Developing Skeletal Muscle of Mice. *J. Physiol.* 521, 483–495.

Siegel, M.S., and Isacoff, E.Y. (1997). A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. *Neuron* 19, 735–741.

Silveira, L.R., Pereira-Da-Silva, L., Juel, C., and Hellsten, Y. (2003). Formation of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Rat Skeletal Muscle Cells during Contractions. *Free Radic. Biol. Med.* 35 (5), 455–464.

Sitsapesan, R., and Williams, A.J. (1995). The Gating of the Sheep Skeletal Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+)-Release Channel Is Regulated by Luminal Ca<sup>2+</sup>. *J. Membr. Biol.* 146, 133–144.

Smith, D.S. (1966). The Organization and Function of the Sarcoplasmic Reticulum and T-System of Muscle Cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 16, 107–142.

Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1985). Sarcoplasmic Reticulum Contains Adenine Nucleotide-Activated Calcium Channels. *Nature* 316, 446–449.

Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1986). Single Channel Measurements of the Calcium Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. Activation by Ca<sup>2+</sup> and ATP and Modulation by Mg<sup>2+</sup>. *J. Gen. Physiol.* 88, 573–588.

Smith, J.S., Imagawa, T., Ma, J., Fill, M., Campbell, K.P., and Coronado, R. (1988). Purified Ryanodine Receptor from Rabbit Skeletal Muscle Is the Calcium-Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum. *J. Gen. Physiol.* 92, 1–26.

Somlyo, A.V., Shuman, H., and Somlyo, A.P. (1977). Composition of Sarcoplasmic Reticulum in Situ by Electron Probe X-Ray Microanalysis. *Nature* 268, 556-558.

Somlyo, A.V. (1979). Bridging Structures Spanning the Junctioning Gap at the Triad of Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* 80, 743–750.

- Somlyo, A.V., Gonzalez-Serratos, H.G., Shuman, H., McClellan, G., and Somlyo, A.P. (1981). Calcium Release and Ionic Changes in the Sarcoplasmic Reticulum of Tetanized Muscle: An Electron-Probe Study. *J. Cell Biol.* 90, 577–594.
- Somlyo, A.V., McClellan, G., Gonzalez-Serratos, H., and Somlyo, A.P. (1985). Electron Probe X-Ray Microanalysis of Post-Tetanic Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> Movements across the Sarcoplasmic Reticulum in Situ. *J. Biol. Chem.* 260, 6801–6807.
- Sorenson, M.M., Coelho, H.S.L., and Reuben, J.P. (1986). Caffeine Inhibition of Calcium Accumulation by the Sarcoplasmic Reticulum in Mammalian Skinned Fibers. *J. Membr. Biol.* 90, 219–230.
- Sorrentino, V. (1995). The Ryanodine Receptor Family of Intracellular Calcium Release Channels. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 33, 67–90.
- Sorrentino, V., and Reggiani, C. (1999). Expression of the Ryanodine Receptor Type 3 in Skeletal Muscle: A New Partner in Excitation-Contraction Coupling? *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 54–61.
- Sorrentino, V. (2011). Sarcoplasmic Reticulum: Structural Determinants and Protein Dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1075–1078.
- Spudich, J.A. (2001). The Myosin Swinging Cross-Bridge Model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 387–392.
- Squire, J.M. (1997). Architecture and Function in the Muscle Sarcomere. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 247–257.
- Starace, D.M., and Bezanilla, F.A. (2004). Proton Pore in a Potassium Channel Voltage Sensor Reveals a Focused Electric Field. *Nature* 427, 548–553.
- Stern, M.D., Pizarro, G., and Ríos, E. (1997). Local Control Model of Excitation–Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* 110, 415–440.
- St-Pierre, F., Marshall, J.D., Yang, Y., Gong, Y., Schnitzer, M.J., and Lin, M.Z. (2014). High-Fidelity Optical Reporting of Neuronal Electrical Activity with an Ultrafast Fluorescent Voltage Sensor. *Nat. Neurosci.* 17, 884–889.
- St-Pierre, F., Chavarha, M., and Lin, M.Z. (2015). Designs and Sensing Mechanisms of Genetically Encoded Fluorescent Voltage Indicators. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 27, 31–38.
- Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. (2001). Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps. *Physiol. Rev.* 81, 21–50.
- Striessnig, J., Ortner, N.J., and Pinggera, A. (2015). Pharmacology of L-Type Calcium Channels: Novel Drugs for Old Targets? *Curr. Mol. Pharmacol.* 8, 110–122.
- Strube, C., Beurg, M., Powers, P.A., Gregg, R.G., and Coronado, R. (1996). Reduced Ca<sup>2+</sup> Current, Charge Movement, and Absence of Ca<sup>2+</sup> Transients in Skeletal Muscle Deficient in Dihydropyridine Receptor Beta 1 Subunit. *Biophys. J.* 71, 2531–2543.
- Su, M., Gao, F., Yuan, Q., Mao, Y., Li, D., Guo, Y., Yang, C., Wang, X.; Bruni, R., Kloss, B., et al. (2017). Structural Basis for Conductance through TRIC Cation Channels. *Nat. Commun.* 8, 15103.

Sudo, R.T., Cunha, L.B., Carmo, P.L., Matos, A.R., Trachez, M.M., Cardoso, L.A., Aguiar, M.I., Abreu, A.V., and Zapata-Sudo, G. (2010). Use of the Caffeine-Halothane Contracture Test for the Diagnosis of Malignant Hyperthermia in Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2010**, *43* (6), 549–556.

Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., Stamler, J.S., and Meissner, G. (2001). Classes of Thiols That Influence the Activity of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel. *J. Biol. Chem.* *276*, 15625–15630.

Sun, X.H., Protasi, F., Takahashi, M., Takeshima, H., Ferguson, D.G., and Franzini-Armstrong, C. (1995). Molecular Architecture of Membranes Involved in Excitation-Contraction Coupling of Cardiac Muscle. *J. Cell Biol.* *129*, 659–671.

Suzuki, J., Kanemaru, K., and Iino, M. (2016). Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Organellar Calcium Imaging. *Biophys. J.* *111*, 1119–1131.

Szentesi, P., Jacquemond, V., Kovács, L., and Csernoch, L. (1997). Intramembrane Charge Movement and Sarcoplasmic Calcium Release in Enzymatically Isolated Mammalian Skeletal Muscle Fibres. *J. Physiol.* *505*, 371–384.

Szentesi, P., Kovács, L., and Csernoch, L. (2000). Deterministic Inactivation of Calcium Release Channels in Mammalian Skeletal Muscle. *J. Physiol.* *528*, 447–456.

Szentesi, P., Collet, C., Sárközi, S., Szegedi, C., Jona, I., Jacquemond, V., Kovács, L., and Csernoch, L. (2001). Effects of Dantrolene on Steps of Excitation-Contraction Coupling in Mammalian Skeletal Muscle Fibers. *J. Gen. Physiol.* *118*, 355–375.

Sztretye, M., Yi, J., Figueroa, L., Zhou, J., Royer, L., and Ríos, E. (2011). D4cpv-Calsequestrin: A Sensitive Ratiometric Biosensor Accurately Targeted to the Calcium Store of Skeletal Muscle. *J. Gen. Physiol.* *138*, 211–229.

## - T -

Takahashi, M., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F., and Catterall, W.A. (1987). Subunit Structure of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels from Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 5478–5482.

Takasago, T., Imagawa, T., and Shigekawa, M. (1989). Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor by CAMP-Dependent Protein Kinase1. *J. Biochem.* *106*, 872–877.

Takekura, H., Flucher, B.E., and Franzini-Armstrong, C. (2001). Sequential Docking, Molecular Differentiation, and Positioning of T-Tubule/SR Junctions in Developing Mouse Skeletal Muscle. *Dev. Biol.* *239*, 204–214.

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., et al. (1989). Primary Structure and Expression from Complementary DNA of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *Nature* *339*, 439–445.

- Takeshima, H., Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H., and Noda, T. (1994). Excitation-Contraction Uncoupling and Muscular Degeneration in Mice Lacking Functional Skeletal Muscle Ryanodine-Receptor Gene. *Nature* 369, 556–559.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., and Kangawa, K. (2000). Junctophilins: A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins. *Mol. Cell* 6, 11–22.
- Takeshima, H., Venturi, E., and Sitsapesan, R. (2015). New and Notable Ion-Channels in the Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum: Do They Support the Process of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release?: New and Notable Ion Channels in the ER/SR. *J. Physiol.* 593, 3241–3251.
- Tallini, Y.N., Ohkura, M., Choi, B.R., Ji, G., Imoto, K., Doran, R., Lee, J., Plan, P., Wilson, J., Xin, H.B., et al. (2006). Imaging Cellular Signals in the Heart in Vivo: Cardiac Expression of the High-Signal Ca<sup>2+</sup> Indicator GCaMP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4753–4758.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary Structure of the Receptor for Calcium Channel Blockers from Skeletal Muscle. *Nature* 328, 313–318.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A., and Numa, S. (1988). Restoration of Excitation—Contraction Coupling and Slow Calcium Current in Dysgenic Muscle by Dihydropyridine Receptor Complementary DNA. *Nature* 336, 134–139.
- Tanabe, T., Beam, K.G., Adams, B.A., Niidome, T., and Numa, S. (1990). Regions of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Critical for Excitation—Contraction Coupling. *Nature* 346, 567–569.
- Tang, S., Wong, H.C., Wang, Z.M., Huang, Y., Zou, J., Zhuo, Y., Pennati, A., Gadda, G., Delbono, O., and Yang, J.J. (2011). Design and Application of a Class of Sensors to Monitor Ca<sup>2+</sup> Dynamics in High Ca<sup>2+</sup> Concentration Cellular Compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16265–16270.
- Tang, W., Ingalls, C.P., Durham, W.J., Snider, J., Reid, M.B., Wu, G., Matzuk, M.M., and Hamilton, S.L. (2004). Altered Excitation-Contraction Coupling with Skeletal Muscle Specific FKBP12 Deficiency. *FASEB J.* 18, 1597–1599.
- Tao, S., Yamazaki, D., Komazaki, S., Zhao, C., Iida, T., Kakizawa, S., Imaizumi, Y., and Takeshima, H. (2013). Facilitated Hyperpolarization Signaling in Vascular Smooth Muscle-Overexpressing TRIC-A Channels. *J. Biol. Chem.* 288, 15581–15589.
- Terai, K., Imanishi, A., Li, C., and Matsuda, M. (2019). Two Decades of Genetically Encoded Biosensors Based on Förster Resonance Energy Transfer. *Cell Struct. Funct.*
- Terentyev, D., Cala, S.E., Houle, T.D., Viatchenko-Karpinski, S., Gyorke, I., Terentyeva, R., Williams, S.C., and Gyorke, S. (2005). Triadin Overexpression Stimulates Excitation-Contraction Coupling and Increases Predisposition to Cellular Arrhythmia in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* 96, 651–658.
- Thevenon, D., Smida-Rezgui, S., Chevessier, F., Groh, S., Henry-Berger, J., Beatriz Romero, N., Villaz, M., DeWaard, M., and Marty, I. (2003). Human Skeletal Muscle Triadin: Gene Organization and Cloning of the Major Isoform, Trisk 51. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 669–675.

- Tian, L., Hires, S.A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M.E., Chalasani, S.H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S.A., Schreiter, E.R., et al. (2009). Imaging Neural Activity in Worms, Flies and Mice with Improved GCaMP Calcium Indicators. *Nat. Methods* 6, 875–881.
- Tian, X., Liu, Y., Liu, Y., Wang, R., Wagenknecht, T., Liu, Z., and Chen, S.R.W. (2013). Ligand-Dependent Conformational Changes in the Clamp Region of the Cardiac Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 4066–4075.
- Tinker, A., Lindsay, A.R., Williams, A.J.A. (1992). Model for Ionic Conduction in the Ryanodine Receptor Channel of Sheep Cardiac Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *J. Gen. Physiol.* 100, 495–517.
- Tintignac, L.A., Brenner, H.R., and Rüegg, M.A. (2015). Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol. Rev.* 95, 809–852.
- Tomosugi, W., Matsuda, T., Tani, T., Nemoto, T., Kotera, I., Saito, K., Horikawa, K., and Nagai, T. (2009). An Ultramarine Fluorescent Protein with Increased Photostability and pH Insensitivity. *Nat. Methods* 6, 351–353.
- Tong, J., Oyamada, H., Demarex, N., Grinstein, S., McCarthy, T.V., and MacLennan, D.H. (1997). Caffeine and Halothane Sensitivity of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release Is Altered by 15 Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Mutations Associated with Malignant Hyperthermia and/or Central Core Disease. *J. Biol. Chem.* 272, 26332–26339.
- Toppin, P.J., Chandy, T.T., Ghanekar, A., Kraeva, N., Beattie, W.S., and Riazi, S.A. (2010). Report of Fulminant Malignant Hyperthermia in a Patient with a Novel Mutation of the CACNA1S Gene. *Can. J. Anesth. Can. Anesth.* 57, 689–693.
- Townsend, C., and Rosenberg, R.L. (1995). Characterization of a Chloride Channel Reconstituted from Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *J. Membr. Biol.* 147, 121–136.
- Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004). Structural Basis of Ion Pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 269–292.
- Treves, S., Vukcevic, M., Maj, M., Thurnheer, R., Mosca, B., and Zorzato, F. (2009). Minor Sarcoplasmic Reticulum Membrane Components That Modulate Excitation-Contraction Coupling in Striated Muscles. *J. Physiol.* 587, 3071–3079.
- Triggle, D.J. (2003). 1,4-Dihydropyridines as Calcium Channel Ligands and Privileged Structures. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23, 293–303.
- Tripathy, A., and Meissner, G. (1996). Sarcoplasmic Reticulum Luminal Ca<sup>2+</sup> Has Access to Cytosolic Activation and Inactivation Sites of Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channel. *Biophys. J.* 70, 2600–2615.
- Tripathy, A., Xu, L., Mann, G., and Meissner, G. (1995). Calmodulin Activation and Inhibition of Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channel (Ryanodine Receptor). *Biophys. J.* 69, 106–119.
- Tsien, R.Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509–544.
- Tsugorka, A., Ríos, E., and Blatter, L.A. (1995). Imaging Elementary Events of Calcium Release in Skeletal Muscle Cells. *Science* 269, 1723–1726.

Tsutsui, H., Karasawa, S., Okamura, Y., and Miyawaki, A. (2008). Improving Membrane Voltage Measurements Using FRET with New Fluorescent Proteins. *Nat. Methods* 5, 683–685.

Tsutsui, H., Jinno, Y., Tomita, A., Niino, Y., Yamada, Y., Mikoshiba, K., Miyawaki, A., and Okamura, Y. (2013a). Improved Detection of Electrical Activity with a Voltage Probe Based on a Voltage-Sensing Phosphatase. *J. Physiol.* 59, 4427–4437.

Tsutsui, H., Jinno, Y., Tomita, A., and Okamura, Y. (2013b). Optically Detected Structural Change in the N-Terminal Region of the Voltage-Sensor Domain. *Biophys. J.* 105, 108–115.

Tsutsui, H., Jinno, Y., Tomita, A., and Okamura, Y. (2014). Rapid Evaluation of a Protein-Based Voltage Probe Using a Field-Induced Membrane Potential Change. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1838, 1730–1737.

Turrina, A., Martinez-Gonzalez, M.A., and Stecco, C. (2013.) The Muscular Force Transmission System: Role of the Intramuscular Connective Tissue. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 17, 95–102.

### - U -

Ursu, D., Schuhmeier, R., and Melzer, W. (2005). Voltage-Controlled Ca<sup>2+</sup> Release and Entry Flux in Isolated Adult Muscle Fibres of the Mouse. *J. Physiol.* 562, 347–365.

### - V -

Vallverdu, G., Demachy, I., Mérola, F., Pasquier, H., Ridard, J., and Lévy, B. (2010). Relation between PH, Structure, and Absorption Spectrum of Cerulean: A Study by Molecular Dynamics and TD DFT Calculations. *Proteins* 78, 1040–1054.

Vandebrouck, C., Martin, D., Schoor, M.C.V., Debaix, H., and Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the Abnormal Calcium Influx Observed in Dystrophic (Mdx) Mouse Skeletal Muscle Fibers. *J. Cell Biol.* 158, 1089–1096

Van Oort, R.J., Garbino, A., Wang, W., Dixit, S.S., Landstrom, A.P., Gaur, N., De Almeida, A. C., Skapura, D. G., Rudy, Y., Burns, A.R., et al. (2011). Disrupted Junctional Membrane Complexes and Hyperactive Ryanodine Receptors after Acute Junctophilin Knockdown in Mice. *Circulation* 123, 979–988.

Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Rezgui, S.S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., DeWaard, M., and Marty, I. (2005). Triadins Are Not Triad-Specific Proteins TWO NEW SKELETAL MUSCLE TRIADINS POSSIBLY INVOLVED IN THE ARCHITECTURE OF SARCOPLASMIC RETICULUM. *J. Biol. Chem.* 280, 28601–28609.

Venturi, E., Sitsapesan, R., Yamazaki, D., and Takeshima, H. (2013). TRIC Channels Supporting Efficient Ca<sup>2+</sup> Release from Intracellular Stores. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 465, 187–195.

Vergara, J., Bezanilla, F., and Salzberg, B.M. (1978). Nile Blue Fluorescence Signals from Cut Single Muscle Fibers under Voltage or Current Clamp Conditions. *J. Gen. Physiol.* 72, 775–800.

Vetter, R., Rehfeld, U., Reissfelder, C., Weiss, W., Wagner, K.D., Günther, J., Hammes, A., Tschöpe, C., Dillmann, W., and Paul, M. (2002). Transgenic Overexpression of the Sarcoplasmic Reticulum

Ca<sup>2+</sup>ATPase Improves Reticular Ca<sup>2+</sup> Handling in Normal and Diabetic Rat Hearts. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1657–169.

Villalba-Galea, C.A., Sandtner, W., Dimitrov, D., Mutoh, H., Knöpfel, T., and Bezanilla, F. (2009). Charge Movement of a Voltage-Sensitive Fluorescent Protein. *Biophys. J.* 96, L19–L21.

Villoing, A., Ridhoir, M., Cinquin, B., Erard, M., Alvarez, L., Vallverdu, G., Pernot, P., Grailhe, R., Mérola, F., and Pasquier, H. (2008). Complex Fluorescence of the Cyan Fluorescent Protein: Comparisons with the H148D Variant and Consequences for Quantitative Cell Imaging. *Biochemistry* 47, 12483–12492.

## - W -

Wachter, R. M., Elsliger, M.A., Kallio, K., Hanson, G.T., and Remington, S.J. (1998). Structural Basis of Spectral Shifts in the Yellow-Emission Variants of Green Fluorescent Protein. *Structure* 6, 1267–1277.

Wachter, R.M., Yarbrough, D., Kallio, K., and Remington, S.J. (2000). Crystallographic and Energetic Analysis of Binding of Selected Anions to the Yellow Variants of Green Fluorescent Protein<sup>11</sup> Edited by D. C. Rees. *J. Mol. Biol.* 301, 157–171.

Wagenknecht, T., Radermacher, M. Grassucci, R., Berkowitz, J., Xin, H.B., and Fleischer, S. (1997). Locations of Calmodulin and FK506-Binding Protein on the Three-Dimensional Architecture of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 32463–32471.

Wallinga, W., Meijer, S.L., Alberink, M.J., Vliek, M., Wienk, E.D., and Ypey, D.L. (1999). Modelling Action Potentials and Membrane Currents of Mammalian Skeletal Muscle Fibres in Coherence with Potassium Concentration Changes in the T-Tubular System. *Eur. Biophys. J.* 28, 317–329.

Walsh, K.B., Bryant, S.H., and Schwartz, A. (1987). Suppression of Charge Movement by Calcium Antagonists Is Not Related to Calcium Channel Block. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 409, 217–219.

Wang, J., and Best, P.M. (1994). Characterization of the Potassium Channel from Frog Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Membrane. *J. Physiol.* 477, 279–290.

Wang, J.P., Needleman, D.H., and Hamilton, S.L. (1993). Relationship of Low Affinity [3]Ryanodine Binding Sites to High Affinity Sites on the Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channel. *J. Biol. Chem.* 268, 20974–20982.

Wang, L., Jackson, W.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2004). Evolution of New Nonantibody Proteins via Iterative Somatic Hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 16745–16749.

Wang, S., Trumble, W.R., Liao, H., Wesson, C.R., Dunker, A.K., and Kang, C. (1998). Crystal Structure of Calsequestrin from Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Nat. Struct. Biol.* 5, 476–483.

Ward, C.W., Schneider, M.F., Castillo, D., Protasi, F., Wang, Y., Chen, S.R.W., and Allen, P.D. (2000). Expression of Ryanodine Receptor RyR3 Produces Ca<sup>2+</sup> Sparks in Dyspedic Myotubes. *J. Physiol.* 525, 91–103.

Watras, J., and Katz, A.M. (1984). Calcium Release from Two Fractions of Sarcoplasmic Reticulum from Rabbit Skeletal Muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 769, 429–439.



- Wei, J., and Hendershot, L.M. (1996). Protein Folding and Assembly in the Endoplasmic Reticulum. *EXS*. 77, 41–55.
- Wei, L., Gallant, E.M., Dulhunty, A.F., and Beard, N.A. (2009). Junctin and Triadin Each Activate Skeletal Ryanodine Receptors but Junctin Alone Mediates Functional Interactions with Calsequestrin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2214–2224.
- Wei-LaPierre, L., Carrell, E.M., Boncompagni, S., Protasi, F., and Dirksen, R.T. (2013). Orai1-Dependent Calcium Entry Promotes Skeletal Muscle Growth and Limits Fatigue. *Nat. Commun.* 4, 2805.
- Weisleder, N., Zhou, J., and Ma, J. (2012). Detection of Calcium Sparks in Intact and Permeabilized Skeletal Muscle Fibers. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 798, 395–410.
- Weiss, R.G., O’Connell, K.M.S., Flucher, B.E., Allen, P.D., Grabner, M., and Dirksen, R.T. (2004). Functional Analysis of the R1086H Malignant Hyperthermia Mutation in the DHPR Reveals an Unexpected Influence of the III-IV Loop on Skeletal Muscle EC Coupling. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 287, 1094–1102
- Westerblad, H., Andrade, F.H., and Islam, M.S. (1998). Effects of Ryanodine Receptor Agonist 4-Chloro-m-Cresol on Myoplasmic Free Ca<sup>2+</sup> Concentration and Force of Contraction in Mouse Skeletal Muscle. *Cell Calcium* 24, 105–115.
- Whitaker, M. (2010). Chapter 6 - Genetically Encoded Probes for Measurement of Intracellular Calcium. In *Methods in Cell Biology; Whitaker, M., Ed.; Calcium in Living Cells; Academic Press, 99*, 153–182.
- Wolf, M., Eberhart, A., Glossmann, H., Striessnig, J., and Grigorieff, N. (2003). Visualization of the Domain Structure of an L-type Ca<sup>2+</sup> Channel Using Electron Cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 332, 171–82.
- Wong, V. K., Li, T., Law, B.Y., Ma, E.D., Yip, N.C., Michelangeli, F., Law, C.K., Zhang, M.M., Lam, K.Y., Chan, P.L., et al. (2013). Saikosaponin-d, a Novel SERCA Inhibitor, Induces Autophagic Cell Death in Apoptosis-Defective Cells. *Cell Death Dis.* 4, e720.
- Woods, C.E., Novo, D., DiFranco, M., Capote, J., and Vergara, J.L. (2005). Propagation in the Transverse Tubular System and Voltage Dependence of Calcium Release in Normal and Mdx Mouse Muscle Fibres. *J. Physiol.* 568, 867–880.
- Wootton, L.L., and Michelangeli, F. (2006). The Effects of the Phenylalanine 256 to Valine Mutation on the Sensitivity of Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) Ca<sup>2+</sup> Pump Isoforms 1, 2, and 3 to Thapsigargin and Other Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 281, 6970–6976.
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., and Yan, N. (2015). Structure of the Voltage-Gated Calcium Channel Cav1.1 Complex. *Science* 350.

- X -

Xiong, L., Zhang, J.Z., He, R., and Hamilton, S.L. (2006). A Ca<sup>2+</sup>-Binding Domain in RyR1 That Interacts with the Calmodulin Binding Site and Modulates Channel Activity. *Biophys. J.* 90, 173–182.

Xu, L., Mann, G., and Meissner, G. (1996). Regulation of Cardiac Ca<sup>2+</sup> Release Channel (Ryanodine Receptor) by Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Adenine Nucleotides under Normal and Simulated Ischemic Conditions. *Circ. Res.* 79, 1100–1109.

Xu, L., Tripathy, A., Pasek, D.A., and Meissner, G. (1999). Ruthenium Red Modifies the Cardiac and Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channels (Ryanodine Receptors) by Multiple Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 32680–32691.

Xu, L., Wang, Y., Gillespie, D., and Meissner, G. (2006). Two Rings of Negative Charges in the Cytosolic Vestibule of Type-1 Ryanodine Receptor Modulate Ion Fluxes. *Biophys. J.* 90, 443–453.

Xu, Y., Zou, P., and Cohen, A.E. (2017). Voltage Imaging with Genetically Encoded Indicators. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 39, 1–10.

### - Y -

Yan, Z., Bai, X., Yan, C., Wu, J., Li, Z., Xie, T., Peng, W., Yin, C., Li, X., Scheres, S.H.W., et al. (2015). Structure of the Rabbit Ryanodine Receptor RyR1 at Near-Atomic Resolution. *Nature* 517, 50–55.

Yang, F., Moss, L.G. and Phillips, G.N. (1996). The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246–1251.

Yang, H., Hu, M., Guo, J., Ou, X., Cai, T., and Liu, Z. (2016). Pore Architecture of TRIC Channels and Insights into Their Gating Mechanism. *Nature* 538, 537–541.

Yang, H.H., and St-Pierre F. (2016). Genetically Encoded Voltage Indicators: Opportunities and Challenges. *J. Neurosci.* 36, 9977–9989.

Yang, H.H., St-Pierre, F., Sun, X., Ding, X., Lin, M.Z., and Clandinin, T.R. (2016). Subcellular Imaging of Voltage and Calcium Signals Reveals Neural Processing in Vivo. *Cell* 166, 245–257.

Yang, T., Riehl, J., Esteve, E., Matthaei, K I., Goth, S., Allen, P. D., Pessah, I.N., and Lopez, J.R. (2006). Pharmacologic and Functional Characterization of Malignant Hyperthermia in the R163C RyR1 Knock-in Mouse. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* 105, 1164–1175.

Yano, K., and Zarain-Herzberg, A. (1994). Sarcoplasmic Reticulum Calsequestrins: Structural and Functional Properties. *Mol. Cell. Biochem.* 135, 61–70.

Yazawa, M., Ferrante, C., Feng, J., Mio, K., Ogura, T., Zhang, M., Lin, P.H., Pan, Z., Komazaki, S., Kato, K., et al. (2007). TRIC Channels Are Essential for Ca<sup>2+</sup> Handling in Intracellular Stores. *Nature*, 448, 78–82.

### - Z -

Zalk, R., Clarke, O. B., Des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J., and Marks, A.R. (2015). Structure of a Mammalian Ryanodine Receptor. *Nature* 517, 44–49.

Zeng, W., Yuan, J.P., Kim, M.S., Choi, Y.J., Huang, G.N., Worley, P.F., and Muallem, S. (2008). STIM1 Gates TRPC Channels, but Not Orai1, by Electrostatic Interaction. *Mol. Cell* 32, 439–448.

- Zeug, A., Woehler, A., Neher, E., and Ponimaskin, E.G. (2012). Quantitative Intensity-Based FRET Approaches — A Comparative Snapshot. *Biophys. J.* 103, 1821–1827.
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., and 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, L., Franzini-Armstrong, C., Ramesh, V., and Jones, L.R. (2001). Structural Alterations in Cardiac Calcium Release Units Resulting from Overexpression of Junctin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 233–247.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H.F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006). Genome-Wide RNAi Screen of Ca<sup>2+</sup> Influx Identifies Genes That Regulate Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channel Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9357–9362.
- Zhou, J., Brum, G., González, A., Launikonis, B.S. Stern, M. D., and Ríos, E. (2003). Ca<sup>2+</sup> Sparks and Embers of Mammalian Muscle. Properties of the Sources. *J. Gen. Physiol.* 122, 95–114.
- Zhou, J., Yi, J., Royer, L., Launikonis, B.S., González, A., García, J., and Ríos, E. (2006). A Probable Role of Dihydropyridine Receptors in Repression of Ca<sup>2+</sup> Sparks Demonstrated in Cultured Mammalian Muscle. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 290, 539–553.
- Ziman, A.P., Ward, C.W., Rodney, G.G., Lederer, W.J., and Bloch, R.J. (2010). Quantitative Measurement of Ca<sup>2+</sup> in the Sarcoplasmic Reticulum Lumen of Mammalian Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 99, 2705–2714.
- Zimányi, I., Buck, E., Abramson, J.J., Mack, M.M., and Pessah, I.N. (1992). Ryanodine Induces Persistent Inactivation of the Ca<sup>2+</sup> Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Mol. Pharmacol.* 42, 1049–1057.
- Zsolnay, V., Fill, M., and Gillespie, D. (2018). Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release Uses a Cascading Network of Intra-SR and Channel Countercurrents. *Biophys. J.* 114 (2), 462–473.
- Zucchi, R., and Ronca-Testoni, S. (1997). The Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Channel/Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States. *Pharmacol. Rev.* 49, 1-51.