



**HAL**  
open science

# Rôle des cavéoles dans la formation des tubules-T et dans la physiopathologie des cavéolinopathies

Eline Lemerle

► **To cite this version:**

Eline Lemerle. Rôle des cavéoles dans la formation des tubules-T et dans la physiopathologie des cavéolinopathies. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS010 . tel-03660519

**HAL Id: tel-03660519**

**<https://theses.hal.science/tel-03660519>**

Submitted on 6 May 2022

**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.

Sorbonne Université

École doctorale Complexité du Vivant (ED 515)

*Centre de Recherche en Myologie*

*Équipe 2 - Organisation de la cellule musculaire et thérapie de la myopathie  
centronucléaire autosomique dominante*

---

# Rôle des cavéoles dans la formation des tubules-T et dans la physiopathologie des cavéolinopathies

---

Par **Eline Lemerle**

Thèse de Doctorat

Dirigée par **Stéphane Vassilopoulos**

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 04/05/2021

Devant un jury composé de :

Pr Onnik Agbulut

Président du jury

Dr Isabelle Marty

Rapporteur

Dr Marc Bartoli

Rapporteur

Dr Christophe Lamaze

Examineur

Dr Stéphane Vassilopoulos

Directeur de thèse



Sorbonne Université

École doctorale Complexité du Vivant (ED 515)

*Centre de Recherche en Myologie*

*Équipe 2 - Organisation de la cellule musculaire et thérapie de la myopathie  
centronucléaire autosomique dominante*

---

# Rôle des cavéoles dans la formation des tubules-T et dans la physiopathologie des cavéolinopathies

---

Par **Eline Lemerle**

Thèse de Doctorat

Dirigée par **Stéphane Vassilopoulos**

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 04/05/2021

Devant un jury composé de :

Pr Onnik Agbulut

Président du jury

Dr Isabelle Marty

Rapporteur

Dr Marc Bartoli

Rapporteur

Dr Christophe Lamaze

Examineur

Dr Stéphane Vassilopoulos

Directeur de thèse



you have only scratched the surface  
of what you're capable of  
there are decades  
of victories ahead of you  
- rupi kaur



## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord je souhaiterais remercier Stéphane Vassilopoulos, mon directeur de thèse. Tu m'as fait découvrir les cavéoles et la microscopie électronique pendant mon stage de M2 avec le projet un peu fou de découvrir la formation des tubules-T. Merci d'avoir persévéré sur le sujet, d'avoir voulu aller toujours plus loin, de m'avoir fait confiance pour mettre au point la microscopie corrélative. Merci d'avoir été là quand je pensais que ma thèse n'était qu'un artéfact, quand j'avais besoin de croire de nouveau en mon projet. Tu m'as fait voir ce qu'était de travailler avec passion et je ne l'oublierai jamais. Merci d'avoir passé des nuits à corréliser les images pour que je puisse observer le résultat de toutes mes heures de manip. Merci pour les sushis à Jussieu, merci de m'avoir donné envie de partir en Grèce. En bref, merci pour tout. Cette thèse c'est la mienne mais aussi la tienne. Et j'espère que tu pourras continuer ce projet dans le futur.

Gilles, merci pour les tableaux Excel, les cours de génétique, les PCRs, le design de mes siARNs, merci de m'avoir remonté le moral quand j'en avais besoin, d'avoir répondu à mes interrogations même après que tu sois parti, et de toujours poser les bonnes questions pour faire avancer mon projet.

Merci Marc Bitoun, notre chef ultime de m'avoir confié la mission de maitre des réunions. D'avoir été pertinent et à l'écoute. Je te remercie aussi par avance de l'aide que tu vas m'apporter dans la préparation de ma soutenance.

Je voudrais aussi remercier Jeanne Lainé pour l'aide qu'elle m'a apporté pour la microscopie électronique. Merci d'avoir écouté Stéphane et moi parler de *daisies* et de cavéoles pendant de longues heures. Ma thèse est plus belle grâce à ton expertise.

Je remercie les commères du 103, Agathe Franck, Anaïs Fongy et Margot Saunier pour m'avoir accueillie et adoptée au labo, pour avoir été à mes côtés pendant le concours de l'école doctorale et pour avoir toujours cru en moi. Agathe, mes quatre années de thèse ont été rendues plus belles grâce à tes conseils, tes encouragements, tes lasagnes, tes photos de chats, tes rats, ta maison à la campagne, les soirées au salon du livre, le vin rouge, la raclette et Dr Who. Je ne viendrai probablement pas habiter à Cesson pour faire pousser des courges dans ton potager mais je viendrai surveiller les légumes régulièrement avec une bouteille de champagne parce que c'est ce qui fonctionne le mieux. Anaïs, tu m'as appris à donner de l'amour aux western blots pour qu'ils fonctionnent bien, j'essaie tant bien que mal de garder cette tradition au labo. Merci pour les petits déjeuners de confinements et pour le yoga du samedi matin. Margot, merci pour tes folies du vendredi après-midi, de m'avoir fait rêver avec ton voyage au Canada, et de continuer à me faire rêver avec la montagne.

Merci au bureau 103, ma famille de l'institut qui m'a écoutée me plaindre et que j'ai écoutée se plaindre pendant ces années. Corine, merci d'avoir toujours été là pour me remonter le moral, et de m'avoir nourrie avec de la gâche et des gâteaux. Bernard,

merci d'avoir demandé des nouvelles et regardé des photos de mon chat tous les matins depuis maintenant plus d'un an. Delphine, merci de m'avoir aidé quand j'en avais le plus besoin et merci de m'avoir raconté les histoires de tes enfants quand j'avais envie de me changer les idées. Camila, même si tu es partie du labo depuis quelques temps et que je n'ai plus de farine pour faire les petits pains au fromage, je ne t'oublie pas et je sais que lire cette thèse te fera réviser ton français. Lyliia, merci de m'avoir nourrie quand j'étais déprimée, merci pour ton oreille attentive quand j'étais énervée et merci d'avoir été ma voisine de bureau !

Merci à mes partenaires de thèse Alexandra, Charles, Saline. J'ai eu besoin de vous tout au long de cette thèse et je resterai à votre disposition jusqu'à la fin des vôtres. Alex, si tu savais comment je suis contente de t'avoir rencontré ! Merci pour tout ! Le chocolat, les tisanes le matin, le reblochon, les chocolats chauds dans les tasses de Serpentard, le vélo, les soirées. Charles, merci d'être toujours de mon côté quand je gagne à n'importe quel jeu, merci pour le twister de couvre-feu, la bronzette dans le parc et les pauses dehors. Saline, merci d'être toujours là même quand tu n'es pas là. Merci de dire « Je t'aime » aux gens, merci de me faire rire, merci d'avoir mis des paillettes dans ma vie. Et je remercie aussi toute l'Elite de la nation, les « jeunes » du labo, ceux qui pique-niquent dans le parc même quand il fait 10°C juste parce qu'il y a un rayon de soleil, et ceux qui m'ont regardée boire de l'eau chaude pendant 4 ans.

Cloé et Alexandrine, merci pour les soirées sans valentin à base de tartiflettes.

Merci au congrès EMBO Cavéoles qui m'a permis de rencontrer Camille et de passer 5 jours à la mer sans même voir la mer. Camille je serai là pour toi et pour tes cavéoles jusqu'au bout !

Ce travail a été réalisé grâce aux plateformes d'imagerie. Merci à la plateforme d'imagerie de l'Institut de Biologie Paris-Seine, à Michaël Trichet et à Alexis Canette pour leur aide dans la réalisation de répliques métalliques de nos échantillons. Merci à Andrée Rouche de m'avoir tout appris sur l'antiquité qu'est notre microscope électronique. Et merci à Bruno Cadot pour le Spinning Disk de la plateforme MyoImage sur lequel j'ai passé beaucoup plus d'heures qu'autorisées.

Ce travail s'est également appuyé sur les biopsies données par les patients atteints cavéolinopathies. Nous sommes reconnaissants à Anne Bigot et Kamel Mamchaoui de la plateforme d'immortalisation MyoLine de l'Institut de Myologie pour l'immortalisation des cellules et des myoblastes des patients. Merci à Christophe Lamaze de m'avoir permis d'observer au mieux la cavéoline 3 grâce au lentivirus Cav3-GFP. Et enfin merci à Nicolas Charlet-Bergerand de l'IGBMC pour les adénovirus Bin1 qui nous ont permis des observations dont nous n'aurions pas rêvé.

Je remercie également Pedro et Philippe Chavrier pour la collaboration qui m'a permis de mettre au point ma technique de microscopie corrélative et de corrélérer trois fluorescences différentes sur les images de microscopie électronique.

Je suis reconnaissant aux membres du comité de thèse qui m'ont suivi tout au long de ces années : Anne Bigot, Christophe Lamaze et Daniel Levy. Vos avis nombreux et pertinents m'ont été très précieux.

Je suis reconnaissant au comité d'attribution des contrats doctoraux d'avoir cru en mon projet.

Je remercie bien sur mes parents, pour le soutien pendant toutes mes années d'études et pendant ma vie en général, surtout pendant cette dernière année. Pour le ski, pour les cadeaux, le courrier, les restos à Paris, les après-midis musées ou shopping. Merci pour tout Maman et Papa. Simon, le bro, toi aussi tu sais comme ça fait du bien de finir sa thèse. Merci d'avoir décidé de faire une thèse en même temps que moi histoire que les parents ne soient pas trop dépaysés. Et merci de l'avoir faite en Italie pour que je puisse venir te voir et qu'on fasse des bêtises à Rome.

Merci à toute ma famille qui est toujours là pour moi, qui m'invite à manger des crêpes, qui me fait du far breton, qui m'héberge pour que je prenne l'air à la campagne et qui ne s'impatiente pas trop de me voir finir mes études.

Les sardines, je ne sais pas si vous pensiez que j'allais finir un jour. Mais ça y est. Merci d'avoir relu la page de garde de ma thèse et d'avoir déjà fait des blagues nulles en ayant vu qu'une page. Merci pour les weekends, les vacances, les restos, le théâtre.

Je remercie mon chat, Meiji, qui ne sait pas lire mais qui m'a tenu chaud et accompagnée pendant cette rédaction et ces nombreux confinements.

J'ai gardé le meilleur pour la fin, Noémie, ma sœur de la fac et de la vie. Merci d'avoir été aux deux coins du monde avec moi (il manque encore deux coins), merci pour les Mcdos, le cheval, RuPaul, les manucures, merci de m'avoir soutenue et été ma fan numéro 1 pendant toutes ces années. J'espère que cette thèse te plaira et que tu comprendras dans quoi j'étais fourrée depuis tout ce temps (titre).

Pour finir je voudrai remercier mon stagiaire préféré, Thomas. Tu fais des dosages en trois semaines et tu perds tout le temps aux cartes mais tu as changé ma vie pour le mieux et je ne peux plus l'imaginer sans toi. Merci d'avoir été mon partenaire de confinement, d'avoir mis en page cette thèse, d'avoir persévéré quand je craquais, d'avoir cru en moi et de m'avoir motivée. Merci de faire des blagues presque aussi drôles que les miennes. Vivement qu'on profite de la vie tous les deux. Jtm. Cœur.

# TABLE DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIERES .....	8
TABLE DES FIGURES.....	13
TABLE DES TABLEAUX .....	17
ABSTRACT .....	18
RESUME .....	19
ABBREVIATIONS .....	20

---

INTRODUCTION .....	23
--------------------	----

---

I. LE MUSCLE SQUELETTIQUE .....	26
I.1. LE TISSU MUSCULAIRE.....	26
I.2. STRUCTURE.....	26
I.3. DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE.....	28
I.3.1. Embryogénèse et différenciation musculaire .....	28
I.3.2. Cellules satellites .....	29
I.3.3. Régénération musculaire .....	30
I.4. COMPARTIMENTATION DE LA FIBRE MUSCULAIRE .....	32
I.4.1. L'appareil contractile .....	32
I.4.2. Noyaux périphériques .....	33
I.4.3. La jonction neuromusculaire.....	33
I.4.4. Les tubules transverses .....	37
I.4.5. Réticulum Sarcoplasmique et Triades .....	38
I.5. CONTRACTION MUSCULAIRE : LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION .....	41
I.5.1. Modifications du sarcomère.....	41
I.5.2. Le couplage excitation-contraction et le complexe de relâchement du calcium.....	42
I.6. LA BIOGENESE DES TUBULES-T .....	45
II. CAVEOLES.....	50
II.1. HISTORIQUE.....	50
II.1.1. Premières observations.....	50
II.1.2. Organisation des cavéoles .....	51
II.2. BIOGENESE DES CAVEOLES .....	51
II.2.1. Une composition hétérogène.....	51
II.2.1.1. Les cavéolines comme squelette de la cavéole .....	51

II.2.1.2.	<i>Les cavines comme manteau de la cavéole</i> .....	54
II.2.1.3.	<i>Les protéines accessoires stabilisatrices de la cavéole</i> .....	58
II.2.1.4.	<i>La cavéole comme compartiment lipidique</i> .....	59
II.2.2.	Synthèse et formation des cavéoles : Du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique .....	60
<b>II.3.</b>	<b>FONCTIONS</b> .....	<b>62</b>
II.3.1.	L'endocytose des cavéoles .....	62
II.3.2.	La mécano-protection par les cavéoles .....	63
II.3.2.1.	<i>Les cavéoles comme mécano-senseurs</i> .....	64
II.3.2.2.	<i>Les cavéoles comme signalisation du stress</i> .....	65
II.3.3.	Les autres fonctions des cavéoles .....	66
<b>III.</b>	<b>CAVEOLINE 3 ET CAVEOLES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE</b> .....	<b>68</b>
<b>III.1.</b>	<b>LES CAVEOLES SPECIFIQUES DU MUSCLE STRIE</b> .....	<b>68</b>
<b>III.2.</b>	<b>LES FONCTIONS DIVERSES DES CAVEOLES MUSCULAIRES</b> .....	<b>71</b>
III.2.1.	L'histoire des cavéoles et des tubules-T .....	71
III.2.2.	Une variété de fonctions cavéolaires .....	74
<b>IV.</b>	<b>PATHOLOGIES DES CAVEOLES ET DES TUBULES-T</b> .....	<b>76</b>
<b>IV.1.</b>	<b>PATHOLOGIES DES CAVEOLES</b> .....	<b>76</b>
IV.1.1.	En dehors du muscle .....	76
IV.1.1.1.	<i>Lipodystrophie</i> .....	76
IV.1.1.2.	<i>Défauts vasculaires et pulmonaires</i> .....	77
IV.1.1.3.	<i>Cancer</i> .....	77
IV.1.2.	Cavéolinopathies .....	80
IV.1.2.1.	<i>Un gène pour différentes pathologies</i> .....	80
IV.1.2.2.	<i>Différents phénotypes associés</i> .....	83
IV.1.2.3.	<i>Phénotypes cardiaques</i> .....	84
IV.1.3.	Maladies musculaires des cavéoles sans mutation dans CAV-3 .....	85
<b>IV.2.</b>	<b>AUTRES PATHOLOGIES DES TUBULES-T</b> .....	<b>87</b>
IV.2.1.	La dystrophie myotonique .....	87
IV.2.2.	La myopathie centronucléaire .....	88
<b>V.</b>	<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>90</b>

<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>93</b>
<b>I. CULTURE CELLULAIRE .....</b>	<b>95</b>
<b>I.1. CELLULES PRIMAIRES MURINES .....</b>	<b>96</b>
I.1.1. Préparation des cellules primaires murines .....	96
I.1.2. Culture des cellules primaires murines.....	97
I.1.3. Différenciation des cellules primaires .....	97
<b>I.2. CELLULES IMMORTALISEES HUMAINES CONTROLES ET MUTEES .....</b>	<b>98</b>
I.2.1. Différenciation des cellules immortalisées .....	99
I.2.2. Transduction par le vecteur lentiviral Cav-3 GFP .....	99
<b>I.3. INACTIVATION DES PROTEINES PAR TRANSFECTION ARN INTERFERENCE .....</b>	<b>99</b>
<b>I.4. TRANSDUCTION PAR LE VECTEUR ADENO-VIRAL BIN1 +/- EXON 11.....</b>	<b>100</b>
<b>II. ANALYSES HISTOMORPHOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES .....</b>	<b>102</b>
<b>II.1. IMMUNOFLUORESCENCE .....</b>	<b>102</b>
<b>II.2. MARQUAGE DES MEMBRANES SUR DES MYOTUBES DIFFERENCIES POUR L'IMAGERIE DES TUBULES-T.....</b>	<b>103</b>
II.2.1. Étude de la connexion des tubules à la membrane plasmique .....	103
II.2.2. Étude des tubules induits connectés à la membrane plasmique.....	104
<b>II.3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE .....</b>	<b>105</b>
II.3.1. Préparation des échantillons de microscopie électronique .....	105
II.3.2. Anaglyphes et Tomogrammes.....	108
II.3.3. Étude des structures membranaires.....	108
II.3.4. Microscopie Corrélative.....	109
<b>III. BIOCHIMIE.....</b>	<b>112</b>
<b>III.1. WESTERN BLOT.....</b>	<b>112</b>
<b>III.2. EXTRACTION D'ARN ET RT-QPCR .....</b>	<b>112</b>
<b>III.3. ANALYSE STATISTIQUE.....</b>	<b>113</b>

---

**RESULTATS ..... 115**

---

<b>I.</b>	<b>LES CAVEOLES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE .....</b>	<b>117</b>
<b>I.1.</b>	<b>LES PROTEINES DES CAVEOLES .....</b>	<b>118</b>
<b>I.2.</b>	<b>LES CAVEOLES MUSCULAIRES AU SARCOLEMME.....</b>	<b>121</b>
I.2.1.	L'organisation et la structure des cavéoles est différente entre les myotubes humains et les myotubes murins.....	121
I.2.2.	Les cavéoles s'accumulent entre les fibres de stress d'actine mais ne fusionnent pas en tubes .....	121
<b>I.3.</b>	<b>MISE EN EVIDENCE D'UNE NOUVELLE ORGANISATION CAVEOLAIRE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES : LES ANNEAUX DE CAVEOLES.....</b>	<b>123</b>
<b>II.</b>	<b>LA BIOGENESE DES TUBULES-T .....</b>	<b>130</b>
<b>II.1.</b>	<b>LES TUBULES-T PRESENTENT UNE ORIENTATION LONGITUDINALE DANS LES MYOTUBES <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>130</b>
<b>II.2.</b>	<b>LA BIOGENESE DES TUBULES-T .....</b>	<b>135</b>
II.2.1.	Les cavéoles semblent fusionner au niveau des anneaux de cavéoles ..	137
II.2.2.	Bin1 entraîne la formation de plateformes circulaires à la membrane plasmique tout en tubulant les lipides.....	138
II.2.3.	Cav-3 et les cavéoles utilisent Bin1 comme échafaudage afin de former des tubules.....	142
<b>II.3.</b>	<b>DEPLETION DE CAV-3 DANS LES CELLULES MUSCULAIRES .....</b>	<b>151</b>
II.3.1.	Validation des siARN dirigés contre CAV-3.....	151
II.3.2.	Effet fonctionnel de la diminution de l'expression de Cav-3 sur la formation de tubes par Bin1 .....	151
<b>III.</b>	<b>CAVEOLES, TUBULES-T ET PATHOLOGIES MUSCULAIRES.....</b>	<b>153</b>
<b>III.1.</b>	<b>LES CAVEOLES DANS LE CAS DES CAVEOLINOPATHIES.....</b>	<b>153</b>
III.1.1.	L'expression de la cavéoline 3 diminue au cours de la différenciation dans les cellules de patients.....	153
III.1.2.	La morphologie des cavéoles est altérée dans les cellules de patients ..	155
III.1.3.	La morphologie des anneaux de cavéoles est altérée dans les cellules de patients .....	157
<b>III.2.</b>	<b>L'EFFET DES MUTATIONS DE CAV-3 DANS LES CELLULES DE PATIENTS .....</b>	<b>159</b>

---

<b>DISCUSSION ET FUTURES DIRECTIONS</b> .....	<b>161</b>
---	------------

---

<b>I. LA MICROSCOPIE CORRELATIVE, UN NOUVEL OUTIL D'OBSERVATION DES OBJETS MEMBRANAIRES</b> .....	<b>164</b>
<b>II. COMPOSITION ET ORGANISATION DES CAVEOLES DANS LES CELLULES MUSCULAIRES</b> .....	<b>164</b>
<b>III. LA BIOGENESE DES TUBULES-T</b> .....	<b>167</b>
<b>III.1. BIN 1, LA PROTEINE INSTIGATRICE DU PROCESSUS</b> .....	<b>168</b>
<b>III.2. LES CAVEOLES, LES STRUCTURES STABILISANTS LE PROCESSUS</b> .....	<b>170</b>
<b>IV. CONSEQUENCES SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DES CAVEOLINOPATHIES</b> .....	<b>180</b>

---

<b>REFERENCES</b> .....	<b>183</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>209</b>

---

## TABLE DES FIGURES

---

Figure 1. Le muscle squelettique.....	26
Figure 2. Organisation de la fibre musculaire.....	27
Figure 3. La différenciation myogénique.....	29
Figure 4. La régénération musculaire suite à une lésion.....	31
Figure 5. Le sarcomère.....	33
Figure 6. La jonction neuromusculaire.....	35
Figure 7. La jonction neuromusculaire.....	36
Figure 8. Les tubules-T dans le tissu musculaire de différentes espèces.....	38
Figure 9. La triade et le complexe de relâchement du $Ca^{2+}$ .....	40
Figure 10. Structure du sarcomère et contraction musculaire.....	41
Figure 11. Le complexe de relâchement du calcium.....	44
Figure 12. Tubule-T et les protéines impliquées dans sa biogenèse.....	48
Figure 13. Les cavéoles à la membrane plasmique.....	50
Figure 14. La cavéoline et son insertion dans la membrane plasmique.....	52
Figure 15. La famille des cavéolines et la conservation de ses domaines.....	54
Figure 16. Structure des cavines.....	58
Figure 17. Assemblage des cavéoles à la membrane plasmique.....	61
Figure 18. Mécano-protection par les cavéoles dans les fibres musculaires squelettiques.....	64
Figure 19. La protéine cavéoline 3.....	68
Figure 20. Cav-3 et le complexe $\beta$ dystroglycan.....	70
Figure 21. Les différents types d'organisation des cavéoles à la membrane plasmique.....	71
Figure 22. Tubules T en formation dans des myotubes immatures.....	72
Figure 23. Représentation schématique de l'hypothèse de la biogenèse des tubules-T médiée par les cavéoles.....	74
Figure 24. Modification de la composition cellulaire du tissu adipeux chez les souris Cav-1-KO.....	76
Figure 25. Mutations de Cav-1 (KO et P132L) cancer du sein.....	79
Figure 26. Mutations de Cav-3 et maladies musculaires associées.....	82
Figure 27. Mutations de CAV-3 dans le muscle squelettique.....	84
Figure 28. Défauts d'organisation des tubules-T dus à des défauts d'expression des protéines impliquées dans l'organisation des triades dans le muscle squelettique.....	86

<b>Figure 29. Défauts dans l'organisation des triades et des tubules-T dans les muscles de patients atteints de DM1.....</b>	<b>87</b>
<b>Figure 30. Défauts de BIN1 et de T-tubules/triades dans la myopathie centronucléaire. ....</b>	<b>88</b>
<b>Figure 31. Fusion des myoblastes en culture .....</b>	<b>98</b>
<b>Figure 32. Mécanisme d'activation des sondes MemBright.....</b>	<b>104</b>
<b>Figure 33. Réplique de métal révélant la structure de la membrane interne/cytoplasmique des cellules. ....</b>	<b>106</b>
<b>Figure 34. Mesure des structures membranaires d'intérêt.....</b>	<b>109</b>
<b>Figure 35. Protocole de préparation des échantillons pour la microscopie corrélative.....</b>	<b>110</b>
<b>Figure 36. Corrélation des images de microscopie à super-résolution et des images de microscopie électronique.....</b>	<b>111</b>
<b>Figure 37. Expression de la cavéoline au cours de la différenciation musculaire.....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 38. Les cavéoles musculaires ont une structure et une organisation différente des cavéoles de fibroblastes.....</b>	<b>120</b>
<b>Figure 39. Les cavéoles musculaires s'organisent longitudinalement dans les myotubes en cours de différenciation.....</b>	<b>122</b>
<b>Figure 40. Organisation des cavéoles à la membrane des cellules musculaires en cours de différenciation.....</b>	<b>123</b>
<b>Figure 41. Taille des anneaux de cavéoles.....</b>	<b>124</b>
<b>Figure 42. Microscopie corrélative de Cav-3 à la surface des myotubes humains.....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 43. Organisation des cavéoles en anneaux à la surface des myotubes visualisée par microscopie corrélative.....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 44. Les anneaux de cavéoles entrent en contact avec le réticulum endo/sarcoplasmique cortical.....</b>	<b>126</b>
<b>Figure 45. Images de microscopie corrélative des anneaux de cavéoles entrant en contact avec le réticulum endo/sarcoplasmique cortical.....</b>	<b>128</b>
<b>Figure 46. Les tubules formés par Bin1 sont en contact avec le milieu extracellulaire.....</b>	<b>132</b>
<b>Figure 47. Les tubules-T sont organisés longitudinalement lors de la différenciation in vitro avec un départ transversal depuis la membrane plasmique. ....</b>	<b>133</b>
<b>Figure 48. Les marqueurs des triades sont organisés longitudinalement puis transversalement lors de la différenciation in vitro.....</b>	<b>135</b>
<b>Figure 49. Les cavéoles forment des tubes qui sont marqués par Cav-3. ....</b>	<b>136</b>
<b>Figure 50. Les tubes émanent des anneaux de cavéoles.....</b>	<b>137</b>
<b>Figure 51. Les anneaux de cavéoles forment des plateformes à partir desquelles émanent des tubules sur lesquels on peut détecter du Bin1 endogène. ....</b>	<b>138</b>

<b>Figure 52. La surexpression de Bin1-GFP entraîne la formation de tubes qui émanent de la membrane plasmique.</b> .....	140
<b>Figure 53. Anneaux et tubes de Bin1-GFP à la surface des myotubes humains.</b> .....	141
<b>Figure 54. Surexpression de Bin1 in vivo dans des myotubes humains</b> .....	143
<b>Figure 55. Formation d'assemblages in vitro sur des bicouches lipidiques artificielles.</b> .....	145
<b>Figure 56. Microscopie corrélative de Bin1+exon 11-GFP sur des myotubes humains en culture.</b> .....	146
<b>Figure 57. Microscopie corrélative de Bin1-GFP sur des myotubes humains en culture.</b> .....	147
<b>Figure 58. Microscopie corrélative de Bin1-GFP sur des myotubes murins primaires extensivement différenciés.</b> .....	148
<b>Figure 59. Analyse des structures d'origine cavéolaire de la surface des myotubes.</b>	149
<b>Figure 60. Association des tubules naissants avec des citernes terminales du RS.</b> ...	150
<b>Figure 61. L'utilisation de siARN dirigés contre Cav-3 permet de diminuer la quantité de Cav-3 dans les myotubes et de mimer la diminution de Cav-3 décrite dans les cellules de patients.</b> .....	151
<b>Figure 62. La diminution de Cav-3 entraîne une diminution de la tubulation excessive induite par la surexpression de Bin1.</b> .....	152
<b>Figure 63. L'expression de la cavéoline dans les myotubes de patients présentant des mutations de Cav-3 est altérée.</b> .....	154
<b>Figure 64. Les mutations dans la protéine Cav-3 entraîne son accumulation intracellulaire.</b> .....	155
<b>Figure 65. L'organisation des cavéoles est altérée dans les myotubes de patients atteints de cavéolinopathie.</b> .....	156
<b>Figure 66. Tubulation anarchique et excessives des cavéoles dans les cellules de patients présentant la mutation CAV-3 R26Q.</b> .....	157
<b>Figure 67. Les myotubes de patients présentent une altération dans l'organisation des anneaux de cavéoles.</b> .....	158
<b>Figure 68. Les mutations de Cav-3 présentent dans les myotubes de patients entraînent une diminution de la sur-tubulation induite par la surexpression de Bin1 + exon 11.</b> .....	160
<b>Figure 69. Bin1 à l'origine de plateformes de membranes plasmiques dans les cellules musculaires.</b> .....	170
<b>Figure 70. Les cavéoles s'organisent sur la plateforme pour former les anneaux de cavéoles.</b> .....	171
<b>Figure 71. Les cavéoles fusionnent au niveau de la plateforme et s'agrègent à certaines zones de l'anneau de cavéoles.</b> .....	173
<b>Figure 72. La fusion des cavéoles et Bin1 permettent la formation de tubes provenant des anneaux de cavéoles.</b> .....	175

<b>Figure 73. Les protéines cavéolaires quittent le tubule permettant la mise en place de la triade. ....</b>	<b>177</b>
<b>Figure 74. Vue en coupe transversale du mécanisme de formation des tubules-T à partir d'un anneau membranaire de Bin1. ....</b>	<b>178</b>

## TABLE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1. Mutations de Cav-3 et pathologies musculaires associées.....</b>	<b>81</b>
<b>Tableau 2. Lignées de cellules immortalisées utilisées. ....</b>	<b>98</b>
<b>Tableau 3. Schéma de pipetage pour la transfection de cellules adhérentes avec Lipofectamine RNAiMax .....</b>	<b>100</b>
<b>Tableau 4. Liste des anticorps primaires utilisés .....</b>	<b>103</b>
<b>Tableau 5. Liste des anticorps secondaires utilisés.....</b>	<b>103</b>

## ABSTRACT

---

Caveolae are flask-shaped invaginations of the plasma membrane, particularly abundant in skeletal muscle. Caveolin 3, the main component of muscle caveolae, is thought to be involved in the formation of transversal tubules (T-tubules), the muscle structures that allow propagation of the action potential in the muscle fiber's depth. It has been suggested that caveolae fuse together and form a substrate for proteins, such as Bin1, capable of tubulating membrane lipids however the mechanisms at play remain obscure. The importance of caveolae and caveolins in skeletal muscle is underscored by the presence of defects in the function and organisation of caveolae in many myopathies. In particular in caveolinopathies, a family of autosomal dominant neuromuscular diseases due to mutations in the CAV-3 gene. However, the pathophysiological mechanisms of these diseases are still unclear.

The objective of my project was to understand the role of caveolae in the early formation of T-tubules. By developing a correlative microscopy technique combining super-resolution fluorescence and electron microscopy on metal replicas, I was able to examine in detail the molecular components of caveolae and T-tubules in human and murine myotubes. I showed that caveolae are organised in a new ring-like structure that we termed "caveolae daisies". I next showed that caveolae daisies organize themselves on Bin1 platforms at the sarcolemma and this structure seems to optimize membrane tubulation to initiate T-tubule formation. Lastly, I showed caveolae daisy defects, a disorganisation of caveolae rings as well as defects in Bin1-mediated membrane tubulation in both Cav-3 depleted myotubes using siRNA against Cav-3 or human caveolinopathy patient myotubes. My work suggests that caveolae daisies are the site of initiation of T-tubule elongation and provides the basis for a precise characterisation of T-tubule biogenesis in healthy skeletal muscle and in the pathophysiology of caveolinopathies.

## RESUME

---

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique particulièrement abondantes dans le muscle squelettique. Il a été proposé que la cavéoline 3 (Cav-3), principal composant des cavéoles musculaires, serait impliquée dans le processus de formation des tubules transverses (tubules-T). Les tubules-T sont des structures musculaires qui permettent de propager le potentiel d'action en profondeur dans la fibre musculaire. Pourtant à ce jour le mécanisme par lequel Cav-3 et les cavéoles participent à la formation de ces structures demeure inconnu. L'importance des cavéoles et de l'isoforme musculaire de la cavéoline est accentuée par la présence de défauts dans l'organisation et la fonction des cavéoles dans de nombreuses myopathies. En particulier les cavéolinopathies, une famille de maladies neuromusculaires autosomiques dominantes sont dues à des mutations dans le gène CAV-3. Cependant, les mécanismes physiopathologiques de ces myopathies sont à ce jour incompris.

L'objectif de mon projet était de comprendre le rôle des cavéoles dans la formation précoce des tubules-T. En mettant au point une technique de microscopie corrélative combinant de la fluorescence à super résolution et de la microscopie électronique sur répliques de métal j'ai pu examiner en détails les composants moléculaires des cavéoles et des tubules-T dans des myotubes humains et des myotubes murins extensivement différenciés. J'ai ainsi montré l'organisation des cavéoles en une nouvelle structure en anneaux. De plus, mes résultats montrent que les cavéoles s'organisent circulairement au sarcolemme sur des plateformes de Bin1 et cette structure semble optimiser la tubulation de la membrane afin d'initier la formation des tubules-T. Enfin, j'ai montré une désorganisation des anneaux de cavéoles ainsi que des défauts de tubulation des membranes par Bin1 dans le cas de défauts d'expression de Cav-3 ou dans les myotubes de patients cavéolinopathes. Mes travaux font penser que les anneaux de cavéoles constituent le site d'initiation de l'élongation des tubules-T et apportent les bases d'une caractérisation précise de la biogénèse des tubules-T dans le muscle squelettique et dans la physiopathologie des cavéolinopathies.

## ABBREVIATIONS

---

### - A -

**ACh** – Acétylcholine  
**ACTC1** – *Actin alpha cardiac muscle 1*  
**ADNc** – Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
**ADP** – Adénosine diphosphate  
**Adv** – Adénovirus  
**ARN** – Acide Ribonucléique  
**ARNm** – ARN messager  
**siARN** – *small interferent* ARN  
**shARN** – *small hairpin* ARN  
**ATP** – Adénosine triphosphate

### - B -

**BIN1** – Bridging integrator 1  
**Bcr-Abl** – Breakpoint Cluster Region-Abelson

### - C -

**Ca<sup>2+</sup>** – Calcium  
**CACNA1S** – *Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 S*  
**CAMKII** – Protéine kinases Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendantes II  
**Cav-3** – Cavéoline 3  
**CD44** – *Cluster of differentiation 44*  
**CdK4** – *Cyclin dependent kinase*  
**CK** – Créatine Kinase  
**CNM** – Myopathie Centronucléaire  
**COPII** – *Coat protein complex II*  
**CRC** – Complexe de Relâchement du Calcium  
**CS** – Cellule Satellite  
**C-term** – Carboxy-Terminal

### - D -

**DAPI** – 4',6-diamidino-2-phénylindole  
**DGC** – *Dystroglycan complex*

**DHPR** – Récepteur des dihydropyridines  
**DM** – Dystrophie Myotonique  
**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMPK** – *DM1 protein kinase*  
**DMSO** – Diméthylsulfoxyde  
**DNM2** – Dynamine 2  
**Dok7** – *Docking protein 7*

### - E -

**E-C** – Excitation-Contraction  
**Ect2** – *Epithelial Cell Transforming 2*  
**EDL** – Muscle long extenseur des orteils  
**EHD** – EH-domain containing  
**ERK** – *Extracellular signal-regulated kinase*

### - G -

**GDP** – Guanosine diphosphate  
**GFP** – *Green fluorescent protein*  
**GFR** – *Growth Factor Reduced*  
**GM1** – Monosialotetrahexosylganglioside  
**GTP** – Guanosine triphosphate

### - H -

**h-cavéoles** – Cavéoles hétérologues  
**HCK** – HyperCKémie  
**HGF** – *Human Growth Factor*  
**HMDS** – Hexaméthylidisilazane  
**HPRT1** – Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1  
**HR1-2** – *Helical Regions 1 and 2*  
**HRP** – Peroxydase de Raifort

- I -

**IL6/STAT3** – *Interleukine 6/Signal transducer and activator of transcription 3*

- J -

**JNM** – Jonction Neuromusculaire

- K -

**KO** – *Knock-out*

- L -

**LGMD1c** – *Limb Girdle Muscular Dystrophy 1c*

**LRP4** – *Low density lipoprotein receptor-related protein 4*

- M -

**MAPK** – *Mitogen-activated protein kinases*

**MBNL1** – *Muscleblind Like Splicing Regulator*

**MD** – Myopathie Distale

**ME** – Microscopie électronique

**MET** – Microscopie électronique à transmission

**MG** - Mitsugumine

**MHC** – *Myosin Heavy Chain*

**MLC** – *Myosin Light Chain*

**MOI** – *Multiplicity of infection*

**MP** – Membrane Plasmique

**MTM1** – Myotubularine 1

**MURC** – *Muscle-restricted coiled-coil protein*

**MuSK** – *Muscle Specific Kinase*

**Myf5** – *Myogenic factor 5*

**MyoD** – *Myoblast determination protein 1*

**MYH8** – Myosin Heavy Chain 8

- N -

**Na<sup>+</sup>** – Sodium

**N-BAR** – Amino-Bin-Amphiphysin-Rvs

**NLS** – *Nuclear localization signal*

**nNOS** – *neuronal Nitric Oxyde Synthase*

**NO** – Monoxyde d'azote

**N-term** – Amino-Terminal

- P -

**PA** – Potentiel d'action

**Pax3/7** – *Paired box gene 3*

**PBS** – *Phosphate-buffered saline*

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**PI** – Phosphoinositide

**PI3K** – Phosphoinositide 3-kinase

**PKC** – Protéine Kinase C

**PoII** – Polymérase I

**PS** – Phosphatidylsérine

**PREM** – *Platinum-replica electron microscopy*

**PTRF** – *Polymerase I and transcript release factor*

- R -

**RACH** – Récepteurs à l'Acétylcholine

**Ras** - *Rat sarcoma*

**RE** – Réticulum Endoplasmique

**Rho** – *Ras homolog*

**RISC** – *RNA-induced silencing complex*

**RMD** – *Rippling Muscle Disease*

**ROCK** – *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*

**ROS** – *Reactive oxygen species*

**RPLP0** – *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*

**Rpm** – *Rotor per minute*

**RS** – Réticulum Sarcoplasmique

**RyR** – Récepteur à la Ryanodine

- S -

**SAGE** – Serial analysis gene expression

**SDPR** – *Serum Deprivation Response Protein*

**SDR** – *Serum Deprivation Response*

**SERCA** – *Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases*

**SNARE** – *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*

**SOCS3** – *Suppressor of cytokine signaling 3*

**SR** – Super résolution

**SRBC** – *Serum deprivation response factor-related*

**SV40** – Virus Simien 40

- T -

**TERT** – *Telomerase Reverse Transcriptase*

**TRAF2** – *TNF receptor-associated factor 2*

**TriSk** – *Triadin Skeletal muscle*

**Tubule-T** – Tubule transverse

- U -

**UV** – Ultra-Violet

- V -

**VEGF** – *Vascular endothelial growth factor*

**VCAM** – *Vascular cell adhesion protein*

- W -

**WT** – *Wild type*

---

# INTRODUCTION

---



Le muscle squelettique est un tissu complexe permettant le mouvement du corps. La contraction musculaire est induite par l'arrivée d'un potentiel d'action (PA) provenant d'un motoneurone. Ce PA se propage le long de la membrane plasmique où il active le complexe de relâchement du calcium au niveau de la connexion entre le tubule transverse (tubule-T) et les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Ceci entraîne une sortie massive de calcium dans le cytosol et la contraction des sarcomères.

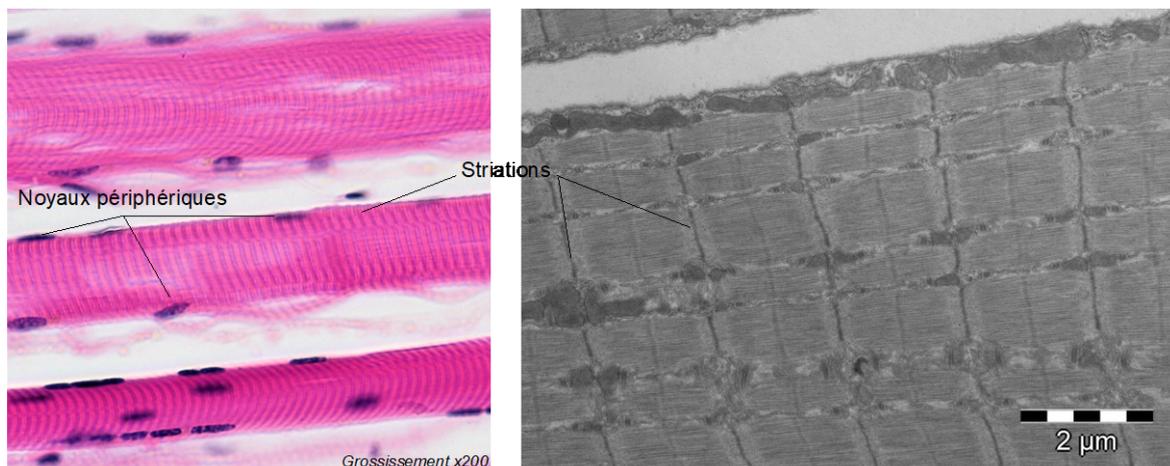
Le mouvement dépend donc de la mise en place correcte de différentes structures musculaires les unes par rapport aux autres. Le bon développement de ces structures est primordial. En effet, de nombreuses pathologies neuromusculaires induisent une mauvaise organisation des structures et des défauts de fonctionnement de la cellule musculaire.

Lors de ma thèse j'ai entrepris de comprendre la formation d'une de ces structures, le tubule-T, essentiel à la propagation du PA au cœur de la fibre musculaire et désorganisé dans des pathologies musculaires telles que la myopathie centronucléaire, la dystrophie myotonique et les cavéolinopathies. Des études antérieures ont relié sa biogenèse à une structure membranaire très abondante dans le muscle squelettique, la cavéole. C'est dans cette optique que mon introduction générale se divise en quatre parties afin de comprendre l'état de l'art sur la recherche actuelle concernant le muscle squelettique, les cavéoles et leurs fonctions dans le développement musculaire ainsi que les pathologies associées.

## I. LE MUSCLE SQUELETTIQUE

### I.1. LE TISSU MUSCULAIRE

Le tissu musculaire compose 43% de la masse corporelle et se divise en trois familles. Les muscles lisses, entourant par exemple les vaisseaux sanguins, la vessie ou les bronches, se contractent lentement et indépendamment de la volonté sous le contrôle du système nerveux autonome. Les muscles striés désignent le muscle cardiaque et les muscles squelettiques. Le muscle squelettique représente la majorité des muscles du corps (comme par exemple biceps, quadriceps...), il présente une contraction volontaire et est constitué de cellules multinucléées appelées fibres musculaires (Figure 1).



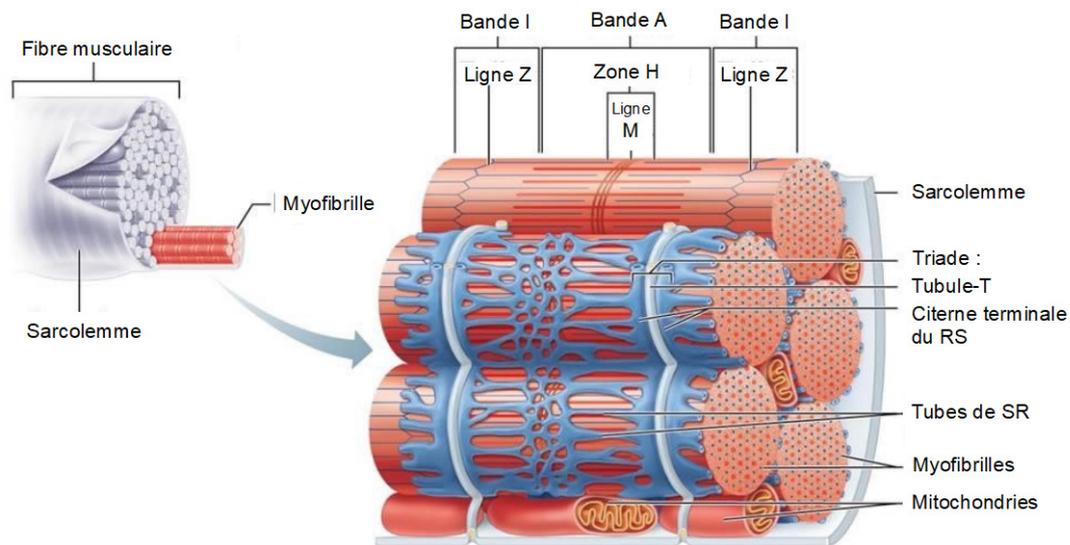
**Figure 1. Le muscle squelettique.**

Les cellules musculaires présentent des striations dues à la présence de sarcomères visibles en microscopie à contraste de phase (à gauche) et en microscopie électronique à transmission (à droite). Les fibres musculaires sont multinucléées et présentent des noyaux périphériques. (Image de gauche adaptée de Berkshire Community College Bioscience Image Library, image de droite issue de la collection de J. Lainé).

### I.2. STRUCTURE

Le tissu musculaire a quatre fonctions principales ; la mobilisation du corps dans son environnement extérieur, le maintien de la posture globale, la stabilité des articulations et la production de chaleur. Les muscles squelettiques sont rattachés au squelette par les tendons afin de permettre les mouvements. Un tissu conjonctif appelé épimysium ancre le tissu musculaire aux tendons. Le périmysium englobe des faisceaux de fibres musculaires et l'endomysium enferme chacune des fibres. Ces

différents tissus conjonctifs permettent le passage des nerfs et de la circulation sanguine, la mobilisation des différents faisceaux ainsi que la protection des muscles du frottement. Différents types cellulaires sont retrouvés dans le tissu musculaire tels que des fibroblastes, des cellules du système immunitaire, des terminaisons nerveuses et des cellules souches (cf. 1.3.2 Cellules satellites).



**Figure 2. Organisation de la fibre musculaire.**

La fibre musculaire est constituée de myofibrilles contenant l'unité contractile du muscle, le sarcomère, donnant son aspect strié au muscle squelettique. La propagation de l'influx nerveux provenant d'un motoneurone le long des tubules-T et jusqu'aux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique entraîne la libération de  $Ca^{2+}$  responsable des changements conformationnels au niveau des sarcomères provoquant ainsi la contraction musculaire. (Adapté de Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman, Inc. 2001).

L'unité cellulaire du muscle strié squelettique est donc appelée fibre musculaire (Figure 2). La fibre musculaire est de forme cylindrique et d'une taille pouvant varier de 10 à  $100\mu m$  de diamètre et jusqu'à plusieurs cm de longueur (parfois sur toute la longueur du muscle), ce qui en fait la plus grande cellule des mammifères (Fishman 1994). Il existe deux types de fibres musculaires. Les fibres de type I sont oxydatives, à contraction lente, c'est-à-dire une contraction longue et de faible intensité, et représentent majoritairement les muscles posturaux comme par exemple le muscle soléaire composé à 80% de fibres de type I (Johnson et al. 1973). Les fibres de type II sont glycolytiques, à contraction rapide, c'est-à-dire avec une forte intensité mais avec une fatigue rapide. Elles représentent les muscles du mouvement et ont un potentiel de développement accru, comme par exemple le muscle orbicularis oculi et le quadriceps composés respectivement de 85% et 52% de fibres de type II (Johnson et al. 1973). Chez l'humain, les types de fibres peuvent évoluer en fonction de l'activité

physique. Des humains sédentaires présentent respectivement 45% et 55% de fibres de types II et I. Chez les sportifs de haut niveau la quantité de fibres de type I augmente considérablement (Wilson et al. 2012).

Les fibres musculaires sont composées de myofibrilles contractiles, présentent de multiples noyaux périphériques issus de la fusion de cellules mononucléées et leur membrane plasmique est appelée sarcolemme.

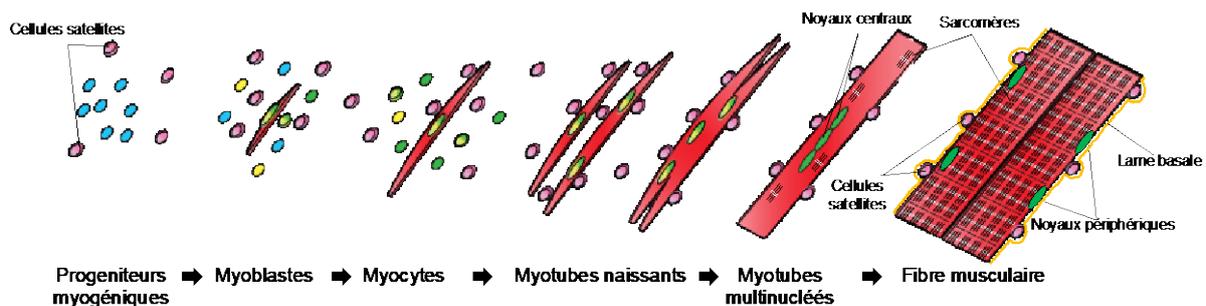
### **I.3. DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE**

#### **I.3.1. Embryogénèse et différenciation musculaire**

Le muscle squelettique est établi à partir de la segmentation du mésoderme en somites. Chaque somite se divise pour donner ventralement le sclérotome et dorsalement le dermamyotome (Buckingham et al. 2003). Le premier donne naissance au cartilage et au squelette, le second s'organisant en dermatome et myotome. Ce dernier se différencie en muscle squelettique (Mohun 1992). Chez la souris le muscle squelettique est établi à partir de 8,5 jours d'embryogénèse (E 8,5) avec une maturation post-natale de 2 à 3 semaines (Tajbakhsh 2009). Les précurseurs musculaires sont appelés myoblastes. Sous l'action de facteurs de transcription tels que MyoD, Myf5 et Pax3, les myoblastes s'activent et prolifèrent avant de se différencier et de fusionner en myotubes (Buckingham et al. 2003). Ces derniers se différencient en fibres musculaires matures avec des noyaux périphériques et un appareil contractile central (Figure 3). Chez la souris les fibres musculaires primaires apparaissent vers E11-14 et deviennent les fibres secondaires après innervation à E14-16 (Buckingham et al. 2003). Dans le muscle humain, les jonctions neuromusculaires, c'est-à-dire la zone d'innervation des fibres musculaires par les motoneurones, apparaissent à partir de la neuvième semaine du développement embryonnaire et permettent la transmission du message nerveux et la contraction musculaire (Robelin 1990).

La formation des myofibrilles au sein des fibres musculaires a lieu en trois étapes (Sanger et al. 2017). Les pré-myofibrilles sont des mini sarcomères composés de filaments fins d'actine, de myosine non musculaire de type II, et d'amas denses d' $\alpha$ -actinine qui forment ce qu'on appelle les Z-bodies (corps Z). Au cours de la maturation,

les myofibrilles naissantes recrutent la titine et la myosine musculaire de type II à l'origine des filaments épais des sarcomères. Finalement les myofibrilles arrivent à maturité lorsque les amas d' $\alpha$ -actinine fusionnent pour former la bande Z, la myosine non musculaire laisse entièrement la place à la myosine II musculaire, les filament fins et épais sont alignés et les myofibrilles sont organisées au centre de la fibre musculaire (White et al. 2014).



**Figure 3. La différenciation myogénique.**

Représentation schématique des étapes majeures de la myogénèse. Dans un premier temps les myoblastes migrent et fusionnent entre eux pour former un myotube, composé de noyaux centraux et de sarcomères immatures et désorganisés. Puis le myotube mûrit en une fibre musculaire présentant des noyaux périphériques et un appareil contractile organisé. Des cellules satellites (en rose) sont retrouvées entre la lame basale et le sarcolemme et peuvent être recrutées à tout moment afin de régénérer la fibre musculaire. (Adapté de Jiwlawat et al. 2018).

La myosine appartient à une superfamille de protéines motrices, son activité dépend de l'ATP (Adénosine triphosphate) et permet une mobilité liée à l'actine. Elle est composée de deux chaînes lourdes (MHC de l'anglais *Myosin Heavy Chain*) et de deux chaînes légères (MLC de l'anglais *Myosin Light Chain*). Une étude dans le tissu musculaire de rat a permis de mettre en évidence différentes isoformes de MHC et MLC dans le muscle squelettique. MHC est exprimée sous quatre isoformes ; une lente appelée  $\beta$ -MHC et trois rapides appelées IIa, IIx et IIb-MHC. MLC quant à elle est exprimée sous 3 isoformes ; une lente appelée MLC1 et deux rapides appelées MLC1f et MLC3f (Schiaffino et Reggiani 1994). La distribution des MHC définit quatre types de fibres (lentes ou rapides) exprimant une seule isoforme et un certain nombre de fibres hybrides exprimant des MHC rapides et lentes.

### 1.3.2. Cellules satellites

Le muscle squelettique adulte et mature a un haut potentiel de régénération en cas de blessure ou de pathologie du muscle par sa capacité à récapituler le programme de développement embryonnaire (Relaix et al. 2005).

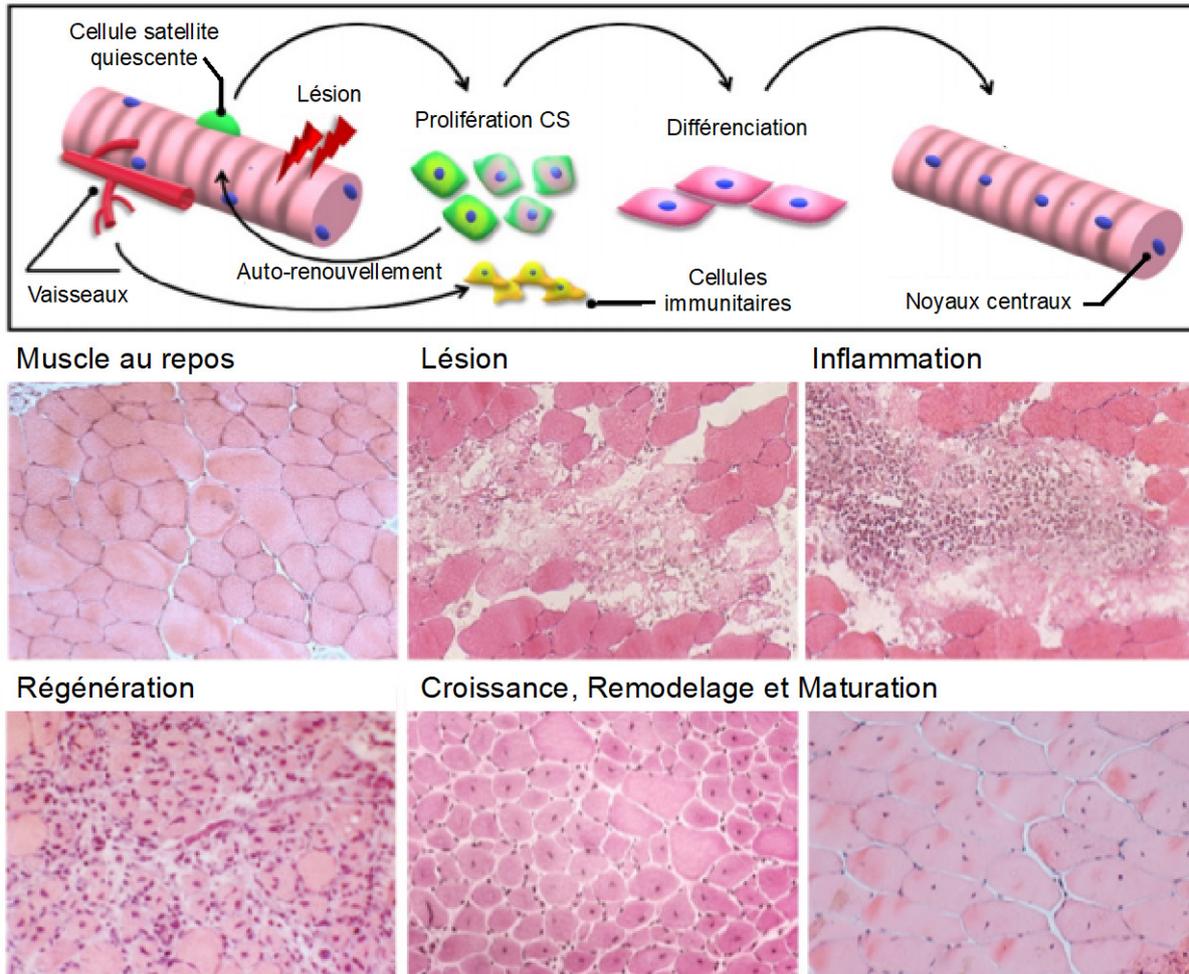
Ce phénomène est possible grâce aux cellules souches du muscle qui ont été observées pour la première fois dans le muscle de grenouille par microscopie électronique par Mauro en 1961. Ces cellules se situent sous la lame basale en contact direct avec les fibres musculaires et sont donc aussi appelées cellules satellites (Mauro 1961). Elles sont multipotentes et expriment le facteur de transcription Pax7 qui est nécessaire à leur spécialisation pendant le développement et à leur maintien dans la période postnatale (Relaix et al. 2005).

Lorsque le muscle subit une lésion les cellules souches s'activent, se divisent, et se différencient pour former une nouvelle fibre musculaire. En général, la régénération complète du muscle chez l'humain prend 3 à 4 semaines. Elle est fonctionnelle et presque parfaite avec la présence de fibrose dépendant de la gravité de la lésion (Tajbakhsh 2009).

Une portion de ces cellules retourne en quiescence afin de maintenir l'homéostasie du pool de cellules souches et de conserver l'intégrité du muscle en cas de nouvelle lésion. Les cellules satellites sont aussi capables de s'auto-renouveler, ce processus étant contrôlé par des facteurs de transcription intracellulaires ainsi que par des facteurs extracellulaires provenant de la niche et du microenvironnement (Relaix et al. 2005). Cependant cette capacité d'auto-renouvellement est limitée ce qui explique la dégénérescence du muscle dans des conditions pathologiques (Beauchamp et al. 2000).

### 1.3.3. Régénération musculaire

La régénération musculaire est un processus essentiel car les contraintes mécaniques appliquées aux muscles dépassent généralement les adaptations possibles, produisant des lésions. De plus la localisation relativement superficielle de nombreux muscles dans le corps les rend encore plus vulnérables aux températures extrêmes, contusions, lacération ou toxines (Tidball 2011) (Figure 4).



**Figure 4. La régénération musculaire suite à une lésion.**

Le panneau supérieur montre une représentation schématique des réponses biologiques activées dans le tissu musculaire suite à une lésion. Le panneau inférieur présente des images de colorations hématoxyline-éosine de coupes musculaires représentatives de chaque étape de la régénération du muscle suite à une injection de cardiotoxine (CTX). Sitôt après l'injection (1 jour), les myofibrilles nécrotiques sont mises en évidence dans le muscle endommagé. Au cours du deuxième jour, la lésion est envahie par des cellules inflammatoires infiltrées. Les cellules satellites activées prolifèrent activement et de nouvelles fibres musculaires apparaissent après la première semaine. Environ dix jours après l'injection, l'architecture des tissus est restaurée et la plupart des myofibrilles présentent des noyaux centraux. Les myofibrilles régénérées connaissent ensuite une croissance et une maturation progressives, mises en évidence par l'augmentation de la superficie de la section transversale et par la relocalisation des noyaux vers la périphérie. (Forcina, Cosentino, et Musarò 2020)

La régénération musculaire *in vivo* a été décrite pour la première fois en 1988 suite à des lésions induites par la cardiotoxine (Couteaux et al. 1988). La cardiotoxine a une action sélective et permet d'induire des dommages aux fibres mais pas aux cellules satellites, vaisseaux sanguins ou nerfs. Il a alors été montré que la lame basale persistante formait une base pour la régénération des myofibrilles. Le muscle régénéré étant différent du muscle sain au niveau de la forme des myofibrilles (plus petites), de l'organisation des myofibrilles, et de l'emplacement des noyaux (centraux). De plus ils

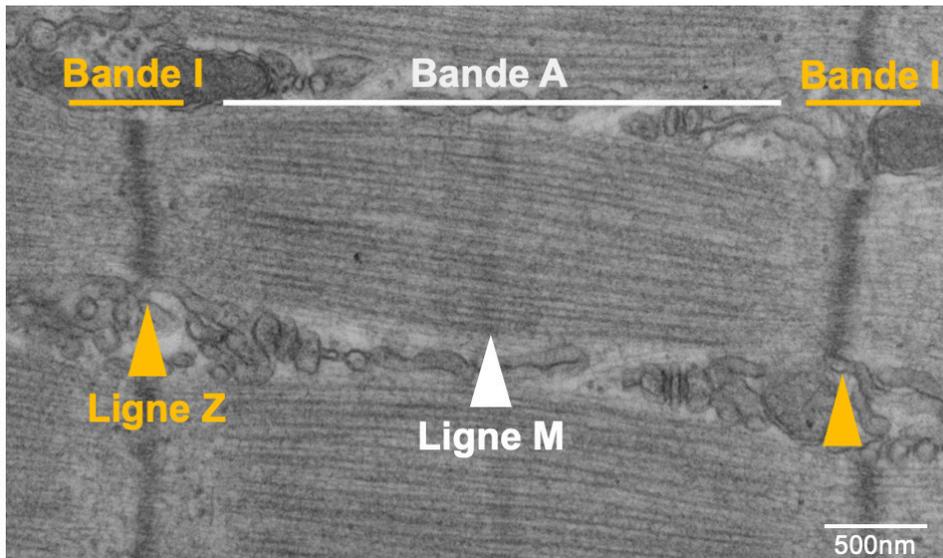
ont observé un réarrangement des unités motrice et de l'organisation des jonctions neuromusculaires (cf. I.4.3. La jonction neuromusculaire) (Couteaux et al. 1988).

La régénération peut être divisée en cinq phases (Figure 4). D'abord les phases de dégénération et de nécrose pendant lesquelles le muscle présente des dommages et une perméabilité des myofibres. Puis l'arrivée des cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes et macrophages) induit une inflammation. Ensuite la prolifération, différenciation et le renouvellement des cellules satellites permettent la régénération du muscle. La formation d'une nouvelle matrice extracellulaire permet le remodelage et la maturation des nouvelles fibres et finalement la réinnervation des fibres permet la récupération fonctionnelle.

## I.4. COMPARTIMENTATION DE LA FIBRE MUSCULAIRE

### I.4.1. L'appareil contractile

Chaque myofibrille est composée de sarcomères leur donnant un aspect strié (Figure 5). Un sarcomère est défini comme le segment entre deux lignes Z espacées d'environ 2,5  $\mu\text{m}$  à l'état basal et composé de filaments fins d'actine, de filaments épais de myosine et de filaments élastiques de titine. La ligne Z est composée de nombreuses autres protéines telles que cap-Z, la nébuline et l' $\alpha$ -actinine (Faulkner et al. 2001). À côté de la ligne Z, on retrouve la bande I (pour *isotropique*) aussi appelée bande claire et constituée de filaments d'actine. La bande A (pour *anisotropique*) vient ensuite et est formée de filaments fins et épais. On retrouve une partie plus pâle dans cette région appelée la zone H et au centre de celle-ci la ligne M. La ligne M permet l'ancrage des chaînes perpendiculaires de myosine qui s'intercalent entre les filaments d'actine qui sont reliés à la titine dans la ligne Z (Maruyama 1997). La contraction du sarcomère est le résultat du mouvement entre la myosine et l'actine (cf I.5.1 Modifications du sarcomère).



**Figure 5. Le sarcomère.** Image en microscopie électronique à transmission d'une fibre musculaire à l'état de repos. Les filaments d'actine (Bande I et ligne Z) et de myosine (Bande A et ligne M) composent les différentes parties du sarcomère (Image issue de la collection de J. Lainé)

#### 1.4.2. Noyaux périphériques

Les myofibrilles occupant une place centrale dans la fibre musculaire, les noyaux sont donc situés à sa périphérie sous la membrane plasmique (Roman et Gomes 2018). Suite à la fusion des myoblastes entre eux les noyaux, d'abord centraux, se déplacent au cours de la maturation selon 5 processus ; la centration, l'alignement, l'étalement, le mouvement périphérique et finalement l'ancrage (Roman et Gomes 2018). Ces mouvements sont induits par les interactions entre le cytosquelette et la membrane nucléaire (Cadot et al. 2015). On retrouve des groupements de noyaux au niveau des jonctions neuromusculaires, les sites de contact entre la terminaison axonale du motoneurone et la fibre musculaire, ainsi qu'aux jonctions myo-tendineuses, mais globalement leur distribution est uniforme le long de la fibre (Roman et Gomes 2018).

#### 1.4.3. La jonction neuromusculaire

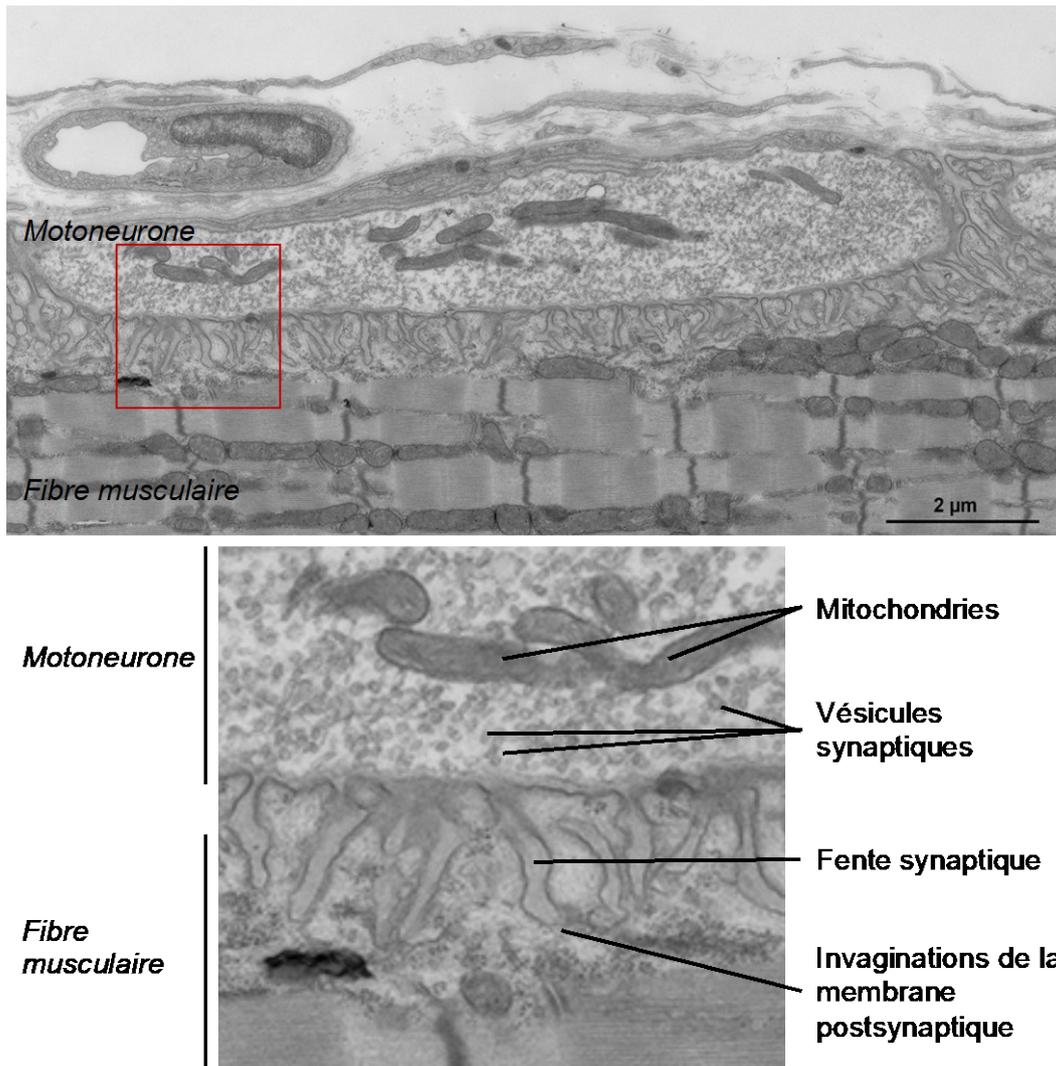
Les sites de contact entre la terminaison nerveuse et le muscle sont très spécialisés et sont appelés jonctions neuromusculaires (JNM) (Slater 2017). La JNM est une synapse chimique recouverte par une cellule de Schwann qui permet sa formation, son maintien et sa régénération (Li et al. 2017).

Au cours du développement les motoneurones forment des synapses avec plus de fibres musculaires que nécessaire. Une élimination synaptique est donc essentielle.

Ce concept a été introduit en 1970 par Redfern qui a décrit chez le rat, une élimination au cours des deux premières semaines post-natales (Redfern 1970). C'est un processus périphérique et déterminé (Jansen et Fladby 1990) qui implique uniquement les terminaisons axonales des motoneurones (Buffelli et al. 2004) et qui dépend de la stimulation physiologique et asynchrone des muscles *in vivo* (Thompson 1983). Chaque unité motrice (les fibres musculaires et le motoneurone qui les innerve) change son organisation, à la base large et chevauchante, pour une taille plus petite conservée au cours de la vie adulte (Buffelli et al. 2004).

Dans la JNM mature, l'axone du motoneurone se termine en bouton présynaptique à environ 30nm du sarcolemme (Figure 6). Afin d'augmenter l'aire de la synapse la membrane post-synaptique est invaginée et présente environ 10 000 récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (ACh) par  $\mu\text{m}$  (Sine 2012). En 1966, au cours d'une étude de la JNM de la grenouille, Katz a montré la présence au niveau du bouton présynaptique de vésicules d'environ 50 nm de diamètre contenant le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) (Katz et Miledi 1967). La transmission du message nerveux aux muscles débute lorsque le potentiel d'action (PA) entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et donc un influx de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le bouton présynaptique (Figure 7). L'augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  induit la fusion, médiée par le complexe des protéines SNARE, des vésicules avec la membrane plasmique du neurone et ainsi le relargage par exocytose de l'ACh (environ 10000 molécules), qui se fixe alors à son récepteur sur la membrane musculaire postsynaptique (Van der Kloot et Molgó 1994).

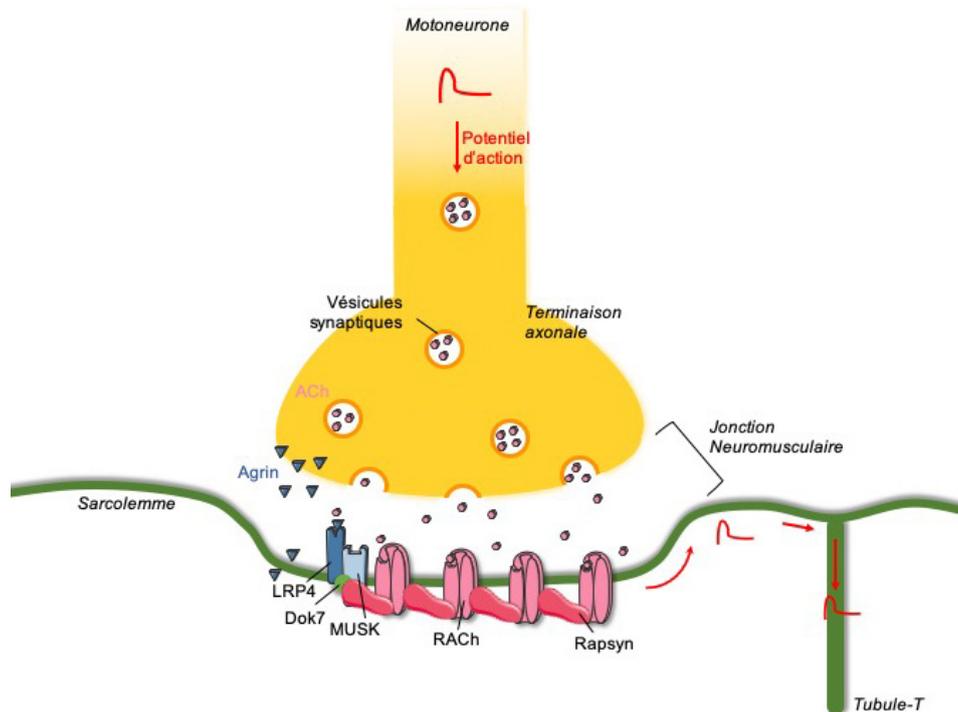
En 1979 Heuser et Reese ont mis au point une technique qui a permis d'observer pour la première fois chez la grenouille l'exocytose des vésicules synaptiques par microscopie électronique (Heuser et al. 1979). Les auteurs de cette étude ont utilisé la congélation rapide (quelques millisecondes après la stimulation du muscle) suivie de la cryofracture et de la métallisation rotative par platine et carbone (Pt/C) (Heuser et al. 1979). Ces expériences ont permis de confirmer le modèle de Katz et déduire les mécanismes impliqués dans le recyclage des vésicules synaptiques après le relargage des neurotransmetteurs.



**Figure 6. La jonction neuromusculaire.**

Observation par microscopie électronique à transmission de la jonction neuromusculaire. Le bouton présynaptique de l'axone du motoneurone contenant les vésicules synaptiques d'ACh forme une synapse avec la fibre musculaire. Le sarcolemme présente des invaginations permettant d'augmenter la surface de contact. (Image issue de la collection de J. Lainé).

La liaison de l'ACh à son récepteur entraîne un influx de  $\text{Na}^+$  et la dépolarisation de la membrane de la fibre musculaire. Cela permet la propagation du potentiel d'action (PA) le long du sarcolemme et dans les tubules transverses (tubules-T) grâce à des canaux sodiques voltage-dépendants, et donc la contraction musculaire (cf. 1.5.2 Le couplage excitation-contraction) (Van der Kloot et Molgó 1994) (Figure 7).



**Figure 7. La jonction neuromusculaire.**

Représentation schématique de la jonction neuromusculaire. L'arrivée du PA au niveau du bouton présynaptique entraîne l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération des molécules d'ACh. La fixation de l'ACh sur son récepteur le canal sodique RACH, permet la dépolarisation du sarcolemme, la propagation du PA dans le tubule-T et ainsi la contraction musculaire. Les récepteurs LRP4 et Dok7 ainsi que la kinase MuSK permettent l'agrégation des RACH et la stabilisation de la synapse.

Au cours du développement et avant la naissance le muscle produit déjà des RACHs qui s'organisent en « domaines postsynaptiques » selon un processus appelé le *prepatternning* (Li, Xiong, et Mei 2017). Ces domaines sont ensuite reconnus par l'axone qui lorsqu'il entre en contact avec le muscle induit la maturation de la synapse (Legay et Mei 2017). L'agrine est un protéoglycane héparane-sulfate essentiel à l'induction et à l'organisation des structures post-synaptiques (Bezakova et al. 2001). Elle est synthétisée et relâchée par le muscle lui-même (agrine musculaire) et par les motoneurones (agrine neurale) au niveau de la JNM. Elle active la kinase transmembranaire MuSK (Muscle specific kinase) afin de promouvoir l'agrégation des RACHs et stabiliser la synapse (Ngo et al. 2007). Il faut noter que les souris *Agrine<sup>-/-</sup>* présentent une paralysie à la naissance due à de défauts synaptiques importants. La taille des fibres musculaires est réduite et les clusters de RACHs, en plus d'être réduits, ne sont pas correctement positionnés face à des terminaisons axonales (Misgeld et al. 2005). L'agrine a donc un rôle important dans la différenciation musculaire et peut être

utilisée en culture cellulaire pour améliorer la différenciation (cf. Matériel et Méthodes I.1.3 Différenciation des cellules primaires).

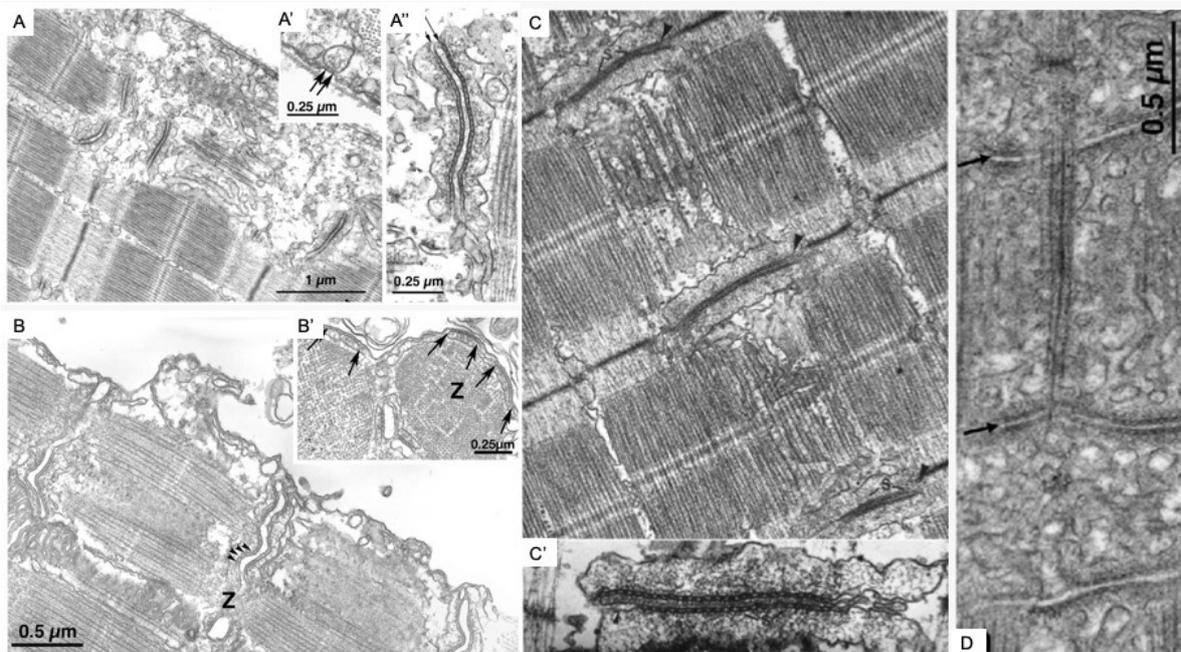
#### I.4.4. Les tubules transverses

Les tubules-T sont des invaginations du sarcolemme d'environ 20 à 40 nm de diamètre, insérés entre les myofibrilles. Chez les mammifères, ils sont situés à l'intersection entre les bandes A et I des sarcomères (McComas 1977), et chez les reptiles, batraciens et poissons au niveau de la bande Z (Franzini Armstrong 2005, Franzini Armstrong 1970) (Figure 8). Les tubules-T permettent la propagation du potentiel d'action (PA) dans la fibre musculaire et la régulation du relâchement de calcium par le réticulum sarcoplasmique (RS). Grâce au récepteur aux dihydropyridines (DHPR), un canal calcique voltage-dépendant qui, dans le muscle squelettique est directement en contact avec un second canal calcique, le récepteur à la Ryanodine RyR1, sur la membrane des citernes terminales (cf. I.5.2 Complexe de relâchement du calcium) (Al-Qusairi et Laporte 2011; Franzini-Armstrong 1991). Les tubules-T sont des tubes de membrane plasmique (Ezerman et Ishikawa 1967) pénétrant dans la fibre musculaire transversalement dans des régions définies du sarcolemme (Huxley 1964; Franzini-armstrong et Porter 1964a). Leur nombre et localisation exacte dépendent des espèces et des types de muscles (Hoyle 1969). Leur membrane est distincte de la membrane plasmique et de celle du RS par sa composition en phospholipides et sa haute concentration en cholestérol (Flucher et al. 1994).

La membrane des tubules-T présente une grande plasticité, avec un renouvellement constant des lipides qui la composent, nécessaire à sa stabilité lors de la contraction musculaire et facilitant sa réparation (Al-Qusairi et Laporte 2011). Cette membrane est riche en cholestérol et deux fois plus riche en sphingolipides que la membrane plasmique et la membrane du RS (Pediconi et al. 1987).

L'étude de la biogenèse des tubules-T chez la souris et le poulet a montré que celle-ci était plus tardive que celle du RS (Takekura et al. 2001; Flucher, Takekura, et Franzini-Armstrong 1993). Au cours du développement murin, les premiers tubules-T sont des petits tubes s'invaginant longitudinalement dans la fibre musculaire à partir de la membrane plasmique et ce dès le stade embryonnaire E15 (Veratti 1902;

Franzini-Armstrong 1991; Takekura et al. 2001). Puis durant la fin de la gestation les tubules envahissent l'entièreté de la fibre en restant majoritairement longitudinaux. Ce n'est qu'après trois semaines post-natales que les tubules-T s'organisent transversalement (Al-Qusairi et Laporte 2011; Franzini-Armstrong 1991).



**Figure 8. Les tubules-T dans le tissu musculaire de différentes espèces.**

**(A, A' et A'')** Coupe longitudinale de muscle de myxine. Les 'pieds' de RyR1 sont visibles au niveau de la triade (flèches) (Adapté de Di Biase et Franzini-Armstrong 2005). **(B, B')** Coupe longitudinale de muscle de lamproie. Les 'pieds' de RyR1 sont visibles au niveau de la triade (flèches) (Adapté de Di Biase et Franzini-Armstrong 2005). Les tubules-T ont différentes positions dans les muscles de grenouille et de lézard. **(C, C')** Coupe longitudinale de muscle de grenouille. Les tubules-T sont situés au niveau de la ligne Z du sarcomère. Les 'pieds' de RyR1 sont visibles au niveau de la triade (flèches) (Adapté de Franzini-Armstrong 1970). **(D)** Coupe longitudinale de muscle de lézard. Les tubules-T (flèches) sont situés au niveau de la bande A du sarcomère (Adapté de Franzini-Armstrong 2018).

#### 1.4.5. Réticulum Sarcoplasmique et Triades

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est une extension du réticulum endoplasmique spécialisé dans le stockage et la libération massive de calcium au cours des cycles de contraction/relaxation (Charuk et al.1992).

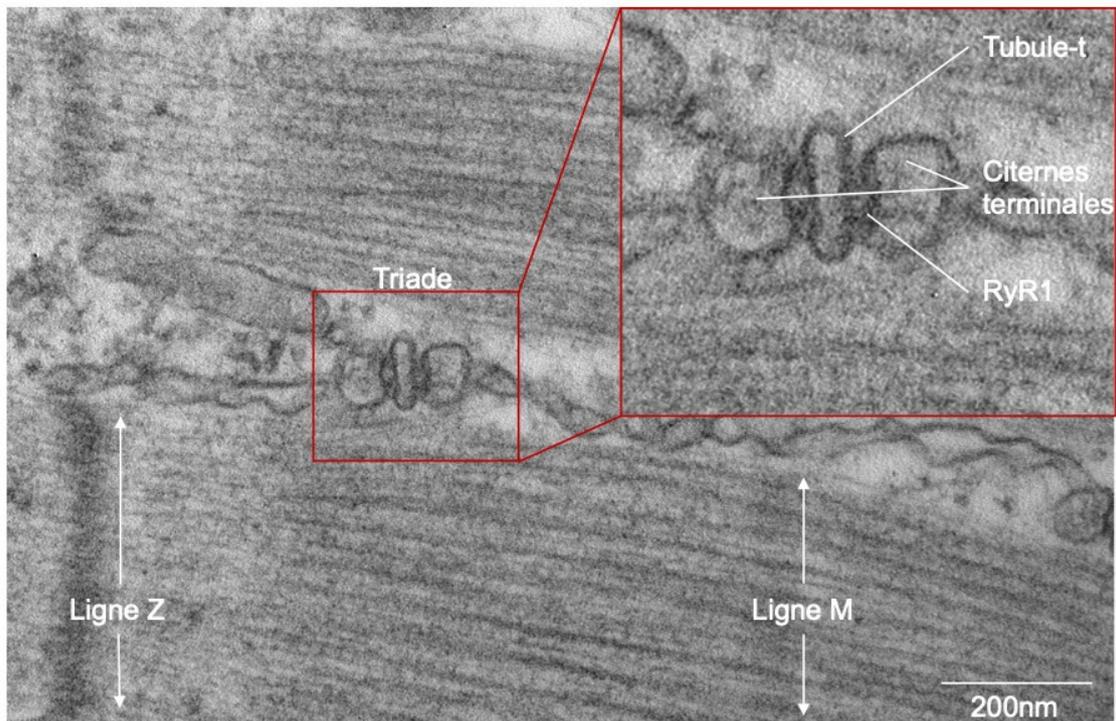
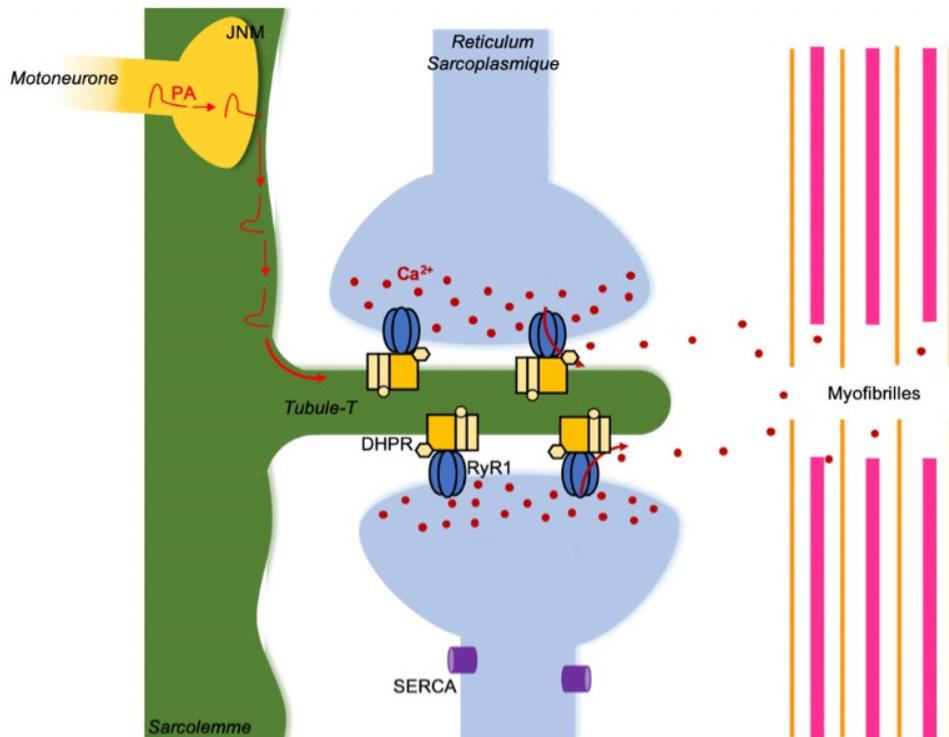
Le RS est enroulé autour des myofibrilles et compartimenté en deux sous domaines : le RS jonctionnel et le RS longitudinal. Le RS jonctionnel ou citernes terminales (Villa et al. 1993) contient les protéines du complexe de relâchement du calcium (CRC) telles que le récepteur à la ryanodine de type 1 (RyR1), la triadine et la junctine. Il fait partie de la triade, le site de couplage formé par la jonction entre un tubule-T et deux citernes

du réticulum sarcoplasmique de part et d'autre du tubule-T (Flucher et al. 1991). Le RS longitudinal s'organise parallèlement aux myofibrilles et contient les pompes SERCA (*sarco/endoplasmique reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) responsables de la récupération du Ca<sup>2+</sup> après la vague de contraction de la fibre musculaire (Figure 9).

Au cours du développement le RS proviendrait du réticulum endoplasmique rugueux (Flucher et al. 1994). La biogenèse du RS débute par la tubulation du RE qui se ramifie autour des myofibrilles (AlQusairi and Laporte 2011), pour finalement permettre le contact entre la citerne terminale et le tubule-T au niveau de l'interface A-I du sarcomère et ainsi former la triade.

La maturation de la triade se fait en plusieurs étapes distinctes au cours du développement en commençant par une augmentation de la quantité de RS et de tubules-T. Puis une augmentation du nombre de contacts entre le RS et les tubules-T et enfin une transversalisation de l'orientation des triades (Franzini-Armstrong 1991).

Cette organisation est nécessaire à la bonne propagation du PA et donc à la contraction musculaire.



**Figure 9. La triade et le complexe de relâchement du  $\text{Ca}^{2+}$ .**

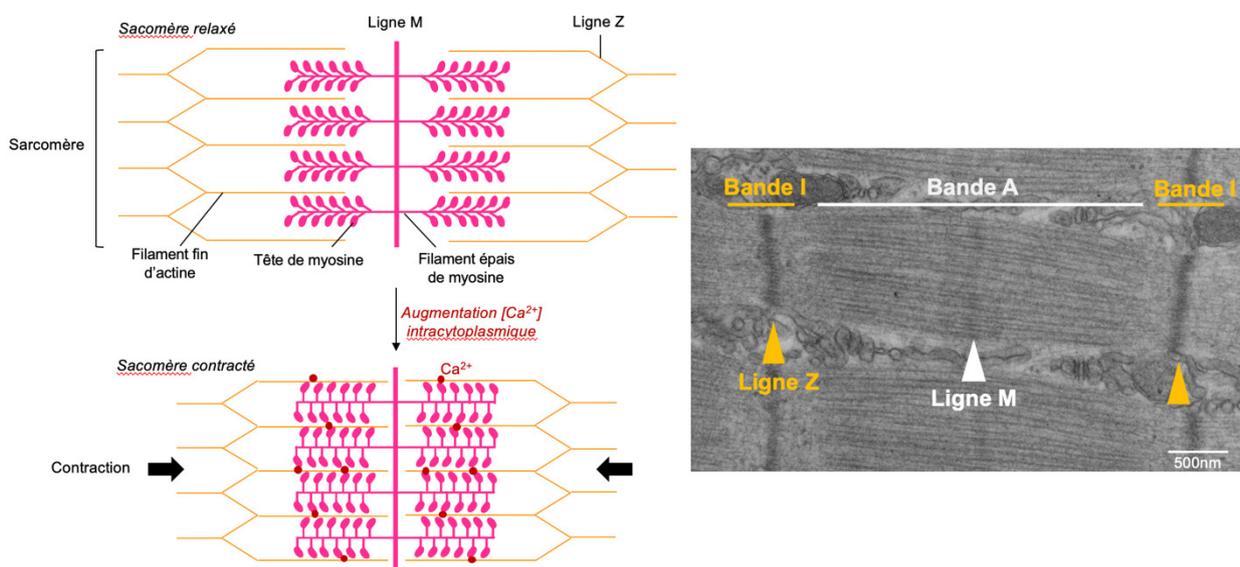
La dépolarisation du sarcolemme se propage jusqu'à la triade et entraîne un changement conformationnel du DHPR qui va induire un changement conformationnel du RyR1 et l'ouverture du canal et une sortie massive de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis les citernes terminales du RS. Le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré va se fixer sur la troponine C et entraîner un changement de conformation de la troponine, ce qui déplace légèrement la tropomyosine qui lui est liée, démasquant ainsi les sites de liaison actine-myosine avant d'être de nouveau internalisé dans le RS par les pompes SERCA. Les images de microscopie électronique à transmission représentent une triade entre deux citernes terminales (RS jonctionnel) et le tubule-T. Les zones denses aux électrons entre le RS et le tubule-T sont les "pieds" de RyR1. (Image issue de la collection de J. Lainé).

## I.5. CONTRACTION MUSCULAIRE : LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

Pour permettre la contraction du muscle et donc le maintien, le mouvement et la respiration, un transfert d'information entre les systèmes nerveux et musculaire est nécessaire (Jones et al. 2017). La commande motrice est envoyée aux muscles depuis le cerveau par des motoneurones provenant de la corne antérieure de la moelle épinière (Slater 2017). L'axone de chaque motoneurone se ramifie pour innervier plusieurs fibres musculaires et former ce que l'on appelle l'unité motrice (Hudson et al. 2019).

### I.5.1. Modifications du sarcomère

L'activation du complexe de relâchement du  $\text{Ca}^{2+}$  (CRC) entraîne une sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) ce qui fait passer la concentration en calcium de  $100\text{nm}$  à  $1\mu\text{m}$  et conduit à la contraction de la fibre musculaire (Hanson et Huxley 1953). Le calcium relâché dans le cytoplasme se lie à la troponine C sur les filaments fins d'actine. La tropomyosine I change alors de conformation ce qui permet le contact entre la tête de myosine et l'actine (McComas 1978) (Figure 10).



**Figure 10. Structure du sarcomère et contraction musculaire.**

Représentation schématique d'un sarcomère au repos et du sarcomère contracté. La fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la troponine C au niveau de la tête de myosine entraîne un glissement de la myosine sur l'actine, la rétraction du sarcomère et ainsi la contraction musculaire. L'image en microscopie électronique à transmission montre le sarcomère d'une fibre musculaire à l'état de repos. (Image issue de la collection de J. Lainé).

La tête de myosine est une ATPase, l'hydrolyse de l'ATP permet la fixation à l'actine, une rotation de la myosine par rapport à l'actine et un glissement des filaments fins et épais l'un par rapport à l'autre (Bowman 1990). Une fois l'ADP relâchée, le calcium se détache de la troponine C et retourne dans le RS après récupération par la pompe SERCA (Stammers et al. 2015).

#### I.5.2. Le couplage excitation-contraction et le complexe de relâchement du calcium

La contraction musculaire est induite par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui entraîne un glissement des filaments épais de myosine sur les filaments fins d'actine et donc un raccourcissement des sarcomères.

C'est la stimulation nerveuse par le motoneurone qui entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique et la libération de calcium depuis sa réserve intracellulaire ; le réticulum sarcoplasmique (Fauré et al. 2007).

Le complexe de relâchement du calcium est l'entité qui permet de coordonner la dépolarisation de la membrane, le relâchement de calcium et donc la contraction musculaire (Figure 11). Ce processus est appelé le couplage excitation-contraction. Il nécessite deux canaux calciques majeurs : le récepteur des dihydropyridines (DHPR), situé sur le tubule-T, qui active le récepteur à la ryanodine (RyR1), situé sur le RS au niveau de la citerne terminale. Comme décrit précédemment, le contact entre ces deux canaux forme la triade.

Le récepteur des dihydropyridines (DHPR) est un canal calcique de type-L voltage-dépendant régulant les flux de calcium à travers la membrane plasmique. Il est très enrichi au niveau des tubules-T des muscles striés cardiaques et squelettiques (Fosset et al. 1983).

Le DHPR est un hétéropentamère de 450kDa composé de cinq sous-unités encodées par 4 gènes différents (Hu et al. 2015). La sous-unité  $\alpha 1s$  aussi appelée Cav-1.1 est le senseur du voltage et forme le pore ionique, les sous-unités  $\alpha 2$  et  $\delta$  sont modulatrices des propriétés du canal et liées par un pont disulfure (Araya et al. 2003), la sous unité  $\beta 1$  interagit avec  $\alpha 1s$  au niveau de sa partie cytoplasmique (Wang et al.

2002) et la sous-unité  $\gamma$  est transmembranaire et ne semble pas impliquée dans le couplage excitation-contraction (Ursu et al. 2001).

Le récepteur à la ryanodine (RyR) est un canal calcique géant (Takeshima et al. 1994). Il possède un large domaine cytoplasmique possédant une haute affinité pour la ryanodine (Franzini-Armstrong et Protasi 1997) et lui donnant la forme d'un pied lors de son observation par microscopie électronique. Il présente une large conductance et permet de rapides sorties de calcium (Smith et al. 1985; Franzini-Armstrong et Protasi 1997).

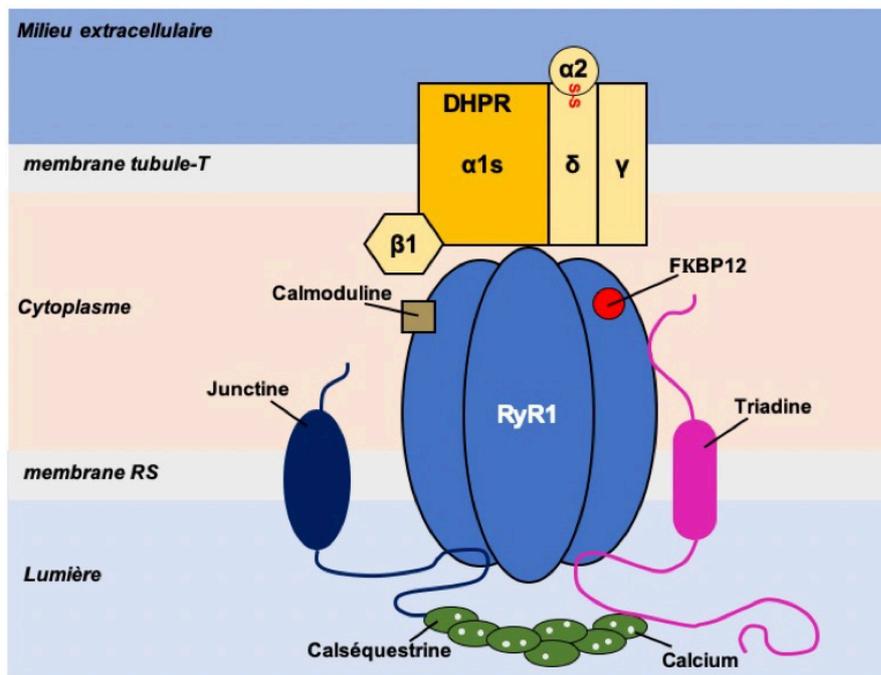
Le récepteur à la ryanodine existe sous trois isoformes ; RyR1, RyR2 et RyR3, issues de trois gènes et possédant entre 67 et 70% d'homologie (Lanner et al. 2010). Ces trois canaux sont exprimés dans des tissus différents.

RyR1, la première isoforme décrite, est exprimée dans le muscle squelettique et est impliquée dans le couplage excitation contraction grâce à son association avec le DHPR (Franzini-Armstrong et Protasi 1997). Elle est localisée, à très haute densité, au niveau du RS jonctionnel (Franzini-Armstrong et Nunzi 1983). L'isoforme RyR2 est prédominante dans le muscle cardiaque et également retrouvée en grande quantité dans le cerveau (Lanner et al. 2010). La dernière isoforme RyR3 est ubiquitaire et est retrouvée en petite quantité dans tous les tissus (Giannini et Sorrentino 1995). Il a été montré dans le muscle squelettique que l'expression de RyR3 augmente en début de différenciation (Giannini et al. 1995), ce qui permettrait d'augmenter les relâchements de calcium du RyR1 dans le cytoplasme des fibres musculaires (Yang et al. 2001).

Le récepteur à la ryanodine 1 est un homotétramère composé de 4 sous-unités d'environ 565 kDa chacune (Zalk et al. 2015). Il est composé de deux domaines ; un domaine C-terminal transmembranaire qui forme le pore du canal et interagit avec la junctine, la triadine, Homer et la calséquestrine (Bers 2004), et un domaine N-terminal représentant 80% de la protéine et interagissant avec le DHPR (Paolini et al. 2004) ainsi qu'avec les protéines régulatrices FkBP12 et calmoduline.

Chaque monomère est constitué de six segments transmembranaires formant le pore du canal. Le filtre de sélectivité ionique est formé par une boucle entre les domaines 5 et 6 (Gao et al. 2000; Meissner 2017).

L'interaction entre les deux canaux du CRC est mécanique et physique et dépend de l'alignement des protéines (Protasi et al. 1998) (Figure 11). Une tétrade de DHPR interagit avec un homotétramère de RyR1 sur deux au niveau de son domaine cytoplasmique (Paolini et al. 2004). Au niveau de la triade on a donc chaque DHPR en contact avec un RyR1 et des RyR1 non couplés. Ces canaux supplémentaires pourraient avoir comme rôle d'amplifier le relâchement de calcium (Gao et al. 2000; Zalk et al. 2015), ou de constituer une réserve de canaux en cas de besoin de couplages E-C supplémentaires (Ríos et al. 2019).



**Figure 11. Le complexe de relâchement du calcium.** Représentation schématique du complexe macromoléculaire au niveau de la triade. Les canaux calciques DHPR (sur la membrane du tubule T) et RyR1 (sur la membrane du RS) permettent le relargage de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol et la contraction musculaire. D'autres protéines sont impliquées dans la stabilisation et la régulation du CRC.

Le bon fonctionnement de la triade nécessite aussi la présence de protéines régulatrices. La calséquestrine permet la fixation du calcium dans le RS afin de permettre une mobilisation rapide du calcium (Beard, Laver, et Dulhunty 2004). La triadine et la junctine sont des protéines transmembranaires du RS dont les parties luminales sont capables de se fixer au RyR1. La triadine existe sous quatre isoformes dans le muscle squelettique, elles ont été nommées selon leur poids moléculaire apparent : Trisk (de l'anglais *TRIadine Skeletal*) 95 pour l'isoforme de 95kDa, Trisk 51 pour l'isoforme de 51kDa, Trisk 49 et Trisk 32 pour les isoformes de 49 et 32kDa (Vassilopoulos et al. 2005). La triadine et la junctine permettent l'ancrage de la calséquestrine à proximité du RyR1 ainsi que le maintien du RyR face au DHPR (Marty 2004; Zhang et al. 1997). FKBP12 aussi connue sous le nom de calstabilité est capable

de se lier à la partie cytoplasmique de RyR1 et coordonne l'association des quatre monomères afin de former un canal fonctionnel (Mei et al. 2013). Finalement la calmoduline est une petite protéine pouvant lier le calcium. Il a été montré qu'elle pouvait moduler la sous-unité  $\alpha 1s$  du DHPR (Peterson et al. 1999), ainsi que se lier aux monomères de RyR1 afin d'activer le canal (Yamaguchi et al. 2003).

## I.6. LA BIOGENESE DES TUBULES-T

La biogenèse des tubules-T paraît donc morphologiquement définie mais ses mécanismes moléculaires restent évasifs car différentes protéines semblent être impliquées dans le processus.

En premier lieu, la cavéoline 3 (Cav-3), composant principal des cavéoles musculaires et protéine qui nous intéresse particulièrement dans cette thèse, semble être à l'origine de la formation des tubules-T (Figure 12). En effet aux prémices de leur formation, les tubules-T sont perlés (Franzini-Armstrong 1991), ont un diamètre et une morphologie similaires aux cavéoles, et ont une composition lipidique identique aux cavéoles (riches en sphingolipides et en cholestérol) (Parton et al. 1997). L'implication de la Cav-3 dans la biogenèse des tubules-T sera détaillée dans la partie III de cette introduction ainsi que dans les parties résultats et discussion.

La seconde protéine semblant être engagée dans la formation des tubules-T est appelée Amphiphysine-2, ou Bin1 (Figure 12). C'est une protéine ubiquitaire, codée par le gène *BIN1*, permettant de courber et de tubuler les lipides membranaires via son domaine BAR (Bin/Amphiphysine/Rys) (Lee et al. 2002) et qui peut interagir avec la dynamine 2 (DNM2) (Takei et al. 1999). Dans le muscle squelettique, l'isoforme spécifique contient un exon 11 qui est inclus au cours de la différenciation musculaire et qui entraîne sa liaison aux phosphoinositides 4,5 bisphosphate (PI(4,5)P2) et 4 monophosphate (PI4P). Dans les myofibres adultes, Bin1 a été localisée au niveau des triades transversales (Butler et al. 1997; Lee et al. 2002). C'est ce domaine de liaison aux PI qui lui permet d'être recrutée au niveau des tubules-T (Lee et al. 2002). *In vitro*, le marquage Bin1 présente une organisation longitudinale colocalisant avec RyR1 (Zalk et al. 2007) et Cav-3 (Parton et al. 1997). Les drosophiles ne synthétisant pas la protéine Bin1 présentent des défauts musculaires tels que des altérations de couplage excitation-contraction et de morphologie des tubules-T (Razzaq et al. 2001).

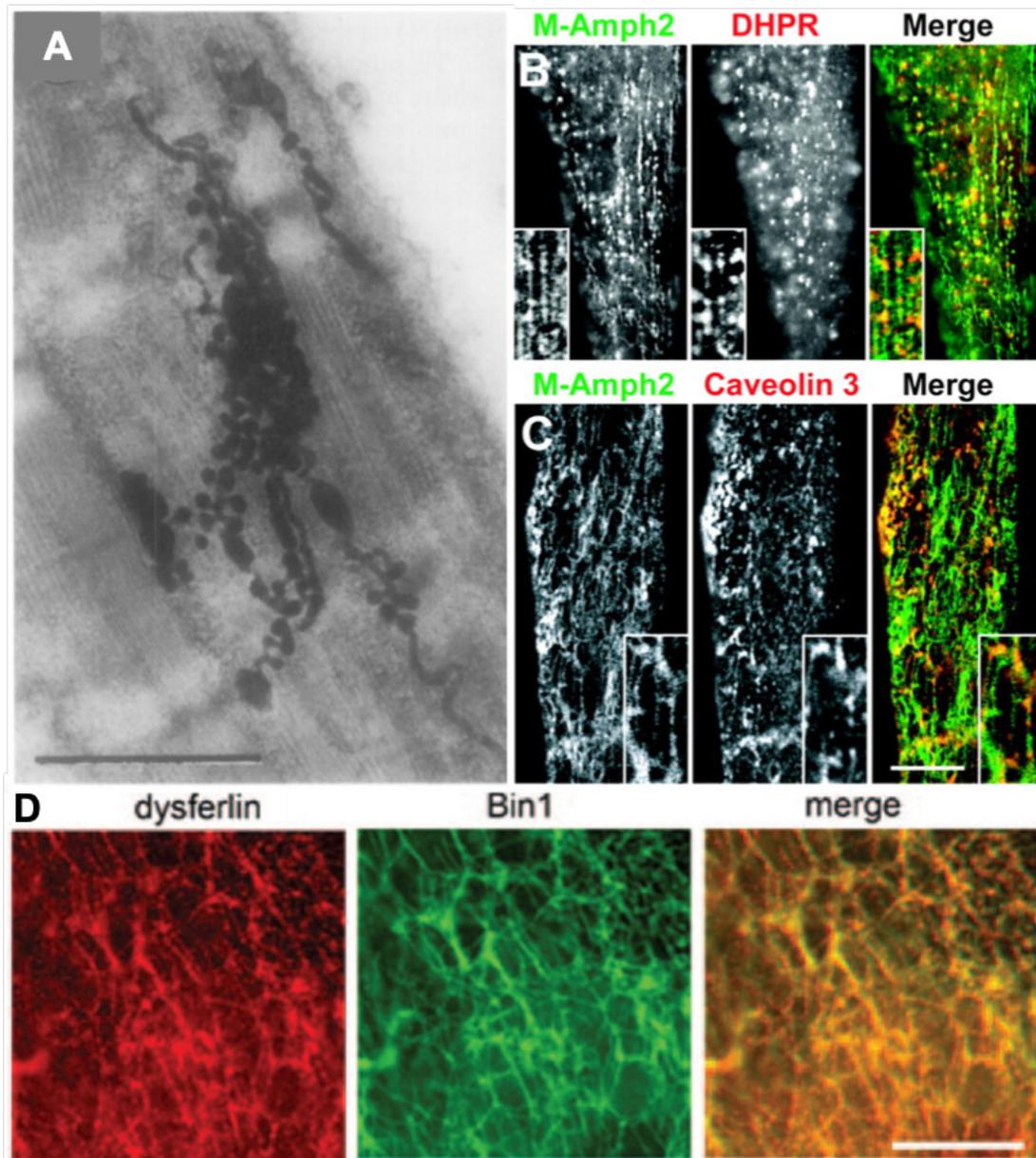
De même dans le cas de la myopathie centronucléaire (CNM) et de la dystrophie myotonique (DM), deux maladies musculaires pouvant être dues à des mutations ou à un défaut d'épissage de l'exon 11 dans le gène BIN1, une centralisation des noyaux ainsi que des défauts de tubules-T et de triades sont retrouvés (Fugier et al. 2011). Ces résultats semblent confirmer l'implication de Bin1 dans la formation des tubules-T au cours du développement.

Il a été montré au cours de la première semaine de régénération des muscles de rat que la dysferline se situait au niveau des tubules-T avant de migrer au sarcolemme (Klinge et al. 2010). La dysferline est une protéine de liaison au calcium impliquée dans les mécanismes d'exocytose, de réparation et de fusion membranaire dépendants du calcium (Al-Qusairi et Laporte 2011). Comme pour Cav-3, les souris n'exprimant pas de dysferline présentent des altérations de tubules-T avec des défauts de transversalisation (Klinge et al. 2010). Bien que son rôle dans la biogenèse des tubules-T ne soit pas totalement établi, on peut supposer que la dysferline y participerait par la fusion des cavéoles musculaires (Al-Qusairi et Laporte 2011) (Figure 12).

En plus de ces protéines impliquées dans la formation des tubules-T, plusieurs autres protéines sont impliquées dans la maturation des citernes terminales de RS.

C'est le cas par exemple des mitsugumines 29 et 53 (MG29, MG53) respectivement impliquées dans la formation précoce du RS jonctionnel (Komazaki et al. 1999) et la formation de la triade par une liaison avec Cav-3 et la dysferline (Cai et al. 2009). Des protéines de la famille des junctophilines sont impliquées dans la liaison des citernes terminales du RS avec le tubule-T (Takeshima et al. 2000). Les membres de la famille de junctophilines sont exprimés dans les cellules excitables qui nécessitent des couplages entre la membrane plasmique et le réticulum endo/sarcoplasmique. Dans le muscle squelettique, la junctophiline 1 est située à la membrane du réticulum endo/sarcoplasmique et facilite l'interaction protéine-protéine entre les canaux calciques voltage-dépendant de la membrane plasmique et les canaux calciques intracellulaires tels que RyR1. La junctophiline 1 permet donc d'assurer une transmission optimale de l'influx calcique transmembranaire entre le sarcolemme et le réticulum sarcoplasmique (Garbino et al. 2009). Les myotubularines font partie d'une super famille de *tyrosine-dual specificity* phosphatases exprimées ubiquitairement

(Laporte et al. 2003). Elles sont connues pour participer à de nombreux processus cellulaires tels que le trafic endosomal (Dowling et al. 2012), le couplage excitation-contraction (AlQusairi et al. 2009), l'organisation du cytosquelette (Hnia et al. 2011), la structure de la jonction neuromusculaire (Tsujita et al. 2004), l'autophagie et la prolifération des cellules satellites (Al-Qusairi et al. 2009). En l'absence de myotubularine les souris présentent un phénotype de myopathie centronucléaire, avec des défaut de tubules-T, ainsi la myotubularine semble avoir un rôle dans la maturation tardive de la triade (Al-Qusairi et al. 2009).



**Figure 12. Tubule-T et les protéines impliquées dans sa biogenèse.**

(A) Observation de microscopie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d'un muscle EDL de souris à 18 jours de développement in utero. Les tubules-T rendus denses aux électrons par un traceur ont une orientation longitudinale. Des protrusions de structures ressemblant à des cavéoles (flèche) sont retrouvées au niveau de la membrane du tubule. Barre d'échelle = 1 $\mu$ m (Adapté de Franzini-Armstrong 1991). (B) et (C) Images en microscopie confocale d'immunofluorescence sur des C2C12 différenciés. On observe un marquage Bin1 (M-Amph2) sur des éléments tubulaires colocalisant partiellement avec Cav-3 et DHPR. Les inserts de (B) et (C) montrent que les ponctuations du marquage du DHPR et de Cav-3 sont souvent alignées avec les tubules positifs à Bin1. Barre d'échelle = 10 $\mu$ m. (Adapté de Lee et al. 2002). (D) Localisation subcellulaire de la dysferline par microscopie confocale dans les myotubes C2C12 après 6 jours de différenciation. Un double marquage Dysferline / Bin1 démontre que la dysferline endogène colocalise avec Bin1. Barre d'échelle = 5  $\mu$ m (Adapté de Klinge et al. 2007).

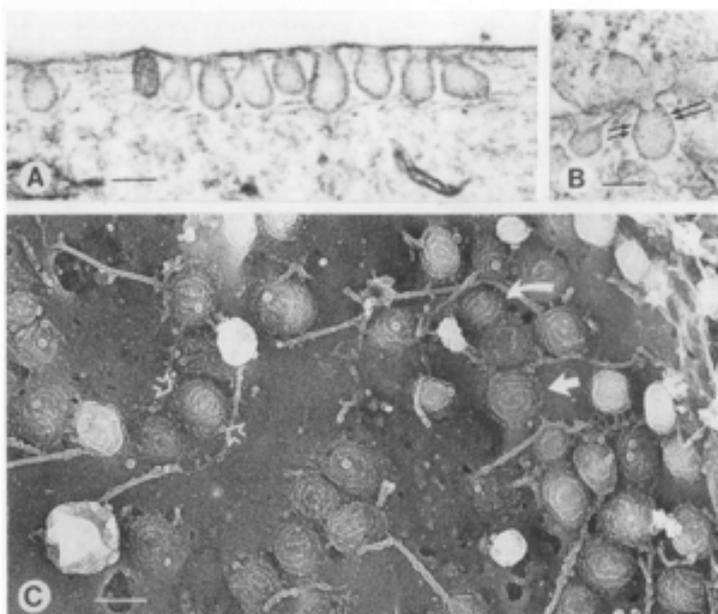
Dans le muscle squelettique les tubules-T sont essentiels à la contraction musculaire et donc au bon fonctionnement du tissu. Cette thèse s'intéresse au lien entre le développement du tubule-T et une structure membranaire abondante au sarcolemme, la cavéole, qui sera décrite dans la partie suivante.

## II. CAVEOLES

### II.1. HISTORIQUE

#### II.1.1. Premières observations

Les cavéoles ont été observées pour la première fois par microscopie électronique dans des cellules de capillaires et de vésicule biliaire dans les années 1950 par Palade (1953) et Yamada (1955). Elles ont été respectivement nommées vésicules plasmalemmales et caveolae intracellularis. Yamada les a définies comme “*a small pocket, vesicle, cave, recess communicating with the outside of a cell, and extending inward, indenting the cytoplasm and the cell membrane*”, c’est-à-dire une petite poche, vésicule, grotte, ou renforcement communiquant avec le milieu extérieur et bourgeonnant en intracellulaire, dentelant le cytoplasme et la membrane plasmique (Figure 13). Elles sont caractérisées par leur diamètre de 50-100nm, ainsi que leur typique aspect lisse dû à l’absence d’un manteau visible en coupes fines (Yamada 1955; Norkin et al. 2002), contrairement aux vésicules à clathrine (Palade et Bruns 1968; Rothberg et al. 1992).



**Figure 13. Les cavéoles à la membrane plasmique.**

Fibroblastes humains *in vitro* préparés pour la microscopie électronique en coupe mince (**A et B**) ou pour la microscopie à congélation rapide et à gravure profonde (**C**). (**B**) Les flèches indiquent des stries légères sur la membrane des cavéoles. (**C**) flèches ouvertes : cavéole invaginée ; flèche pleine : manteau avec une morphologie arquée ou en spirale ; flèche courbe : manteau cavéolaire avec des crêtes parallèles. (Adapté de Rothberg et al. 1992)

### II.1.2. Organisation des cavéoles

Chez les mammifères les cavéoles sont présentes dans tous les types cellulaires exceptés les neurones et les lymphocytes, bien que ces 2 types cellulaires expriment la cavéoline 1, constituant principal des cavéoles. Elles sont très abondantes dans les adipocytes, fibroblastes ainsi que dans les cellules endothéliales et musculaires (Parton et Simons 2007) et peuvent occuper 18-40% de la surface de la membrane plasmique (Chang et al. 2014).

Les cavéoles peuvent s'organiser de plusieurs façons dans les cellules ; cavéoles uniques, en agrégats (Pelkmans et Zerial 2005) ou associées à des structures spécialisées (Schiaffino et al. 1977; Franzini-Armstrong 1991).

Bien que les cavéoles aient été décrites comme n'ayant pas de manteau, il a été observé, au niveau du cytoplasme, des striations denses aux électrons sur ces structures (Rothberg et al. 1992), une courbure variable (Anderson 1991), ainsi qu'un désassemblage des cavéoles en cas de déplétion du cholestérol. L'hypothèse de la présence d'une protéine membranaire interagissant avec le cholestérol et formant les cavéoles a donc été émise. Il aura fallu presque 40 ans pour caractériser la protéine principale des cavéoles, la cavéoline (Rothberg et al. 1992), qui sera renommée cavéoline 1 suite à la découverte de 2 autres protéines des cavéoles, la cavéoline 2 et la cavéoline 3. La membrane des cavéoles est définie par une résistance à la solubilisation par triton X-100 à 4°C, une densité flottante faible, ainsi qu'un enrichissement en glycosphingolipides, cholestérol et protéines membranaires (Anderson 1998). Ces observations et caractérisations ont été le point de départ de l'étude de la biogenèse et fonction des cavéoles dans les cellules.

## II.2. **BIOGENESE DES CAVEOLES**

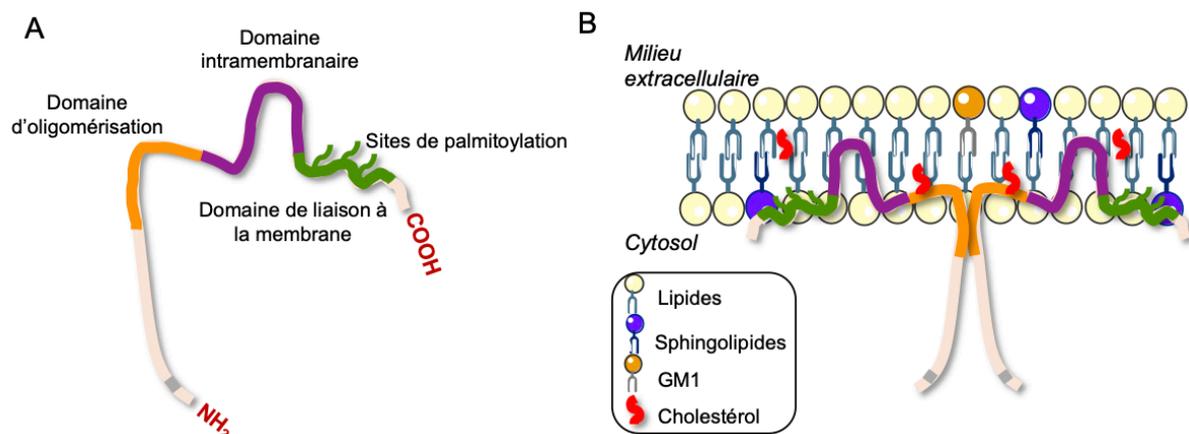
### II.2.1. Une composition hétérogène

#### II.2.1.1. *Les cavéolines comme squelette de la cavéole*

En plus d'une membrane riche en cholestérol et en sphingolipides, les cavéoles sont formées de divers protéines. La protéine principale, la cavéoline, existe sous 3

isoformes : Cav-1, Cav-2 et Cav-3. Dans les cavéoles, 144 protéines de cavéoline s'oligomérisent et s'associent avec les cavines, le cholestérol et des protéines accessoires (Parton et Simons 2007). Seules Cav-1 et Cav-3 sont capables de former des cavéoles à la membrane plasmique (Fra et al. 1995; Capozza et al. 2005) et la perte d'une de ces deux protéines entraîne une perte de cavéoles à la membrane.

La cavéoline est une petite protéine de 18-24kDa. Son analyse a montré la présence d'une région hydrophobe en épingle à cheveux de 33 acides aminés qui permet son ancrage dans la bicouche lipidique (Glenney et Soppet 1992). Les régions NH<sub>2</sub>- et COOH- terminales de la cavéoline sont donc entièrement cytoplasmiques (Sargiacomo et al. 1993) (Figure 14).



**Figure 14. La cavéoline et son insertion dans la membrane plasmique.**

Représentation schématique de Cav-1 et de son insertion dans la membrane plasmique. Cav-1 s'insère dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides par un domaine intramembranaire en épingle à cheveux. Ses extrémités N et C terminales sont cytosoliques. Trois sites de palmitoylation dans le domaine de liaison à la membrane permettent son ancrage et sa stabilisation à la membrane plasmique. (Adapté de Parton et del Pozo 2013)

La cavéoline 1 fut la première isoforme décrite (Rothberg et al. 1992) et est devenue le premier marqueur des cavéoles. Cav-1 est exprimée ubiquitairement bien qu'à différents niveaux dans différents tissus ; sa concentration étant la plus élevée dans les adipocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, le muscle lisse et les cellules épithéliales (Williams et Lisanti 2004). La localisation principale de Cav-1 au sein des cellules est à la membrane plasmique où elle se lie étroitement et spécifiquement au cholestérol (Murata et al. 1995).

La cavéoline 1 est une protéine de 21-24kDa, encodée par un seul gène (Figure 15). Elle existe sous deux isoformes appelées  $\alpha$  et  $\beta$ , différant d'environ 3kDa. La cavéoline

$\alpha$  contient les résidus 1 à 178, la méthionine 32 jouant le rôle de site d'initiation pour former la cavéoline  $\beta$  (Scherer et al. 1996). Les deux isoformes peuvent être envoyées aux cavéoles à la membrane plasmique, former des homo-oligomères (Monier et al. 1996) et interagir avec les protéines G (Sargiacomo et al. 1993). Leur oligomérisation a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique grâce à leur séquence d'oligomérisation (entre les résidus 61 et 101) (Sargiacomo et al. 1995) ainsi qu'à une palmitoylation de trois cystéines en C-term (Dietzen et al. 1995).

En 1996, Scherer et ses collègues ont montré dans des adipocytes la co-expression d'une autre protéine apparentée à Cav-1 au niveau des cavéoles qui lui est identique à environ 38% et similaire à 58% (Scherer et al. 1996) (Figure 15). Ils ont nommé cette protéine cavéoline 2. Cette protéine de 20kDa forme des hétéro-oligomères de 14 à 16 sous-unités très stables avec Cav-1 (Scherer et al. 1997). Il faut noter que Cav-2 reste en mono ou dimères en l'absence de Cav-1. Elle est co-exprimée dans la plupart des cellules et tissus et requière la cavéoline 1 pour former des cavéoles à la membrane plasmique. En effet lorsqu'elle est surexprimée seule, la cavéoline 2 ne quitte pas le Golgi et y est dégradée (Mora et al. 1999).

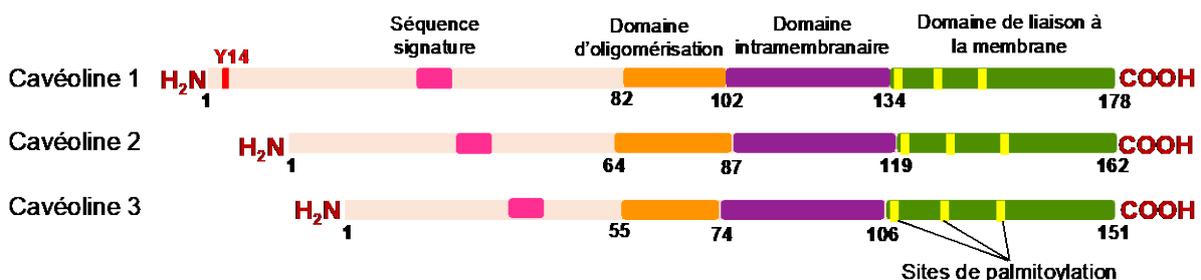
Deux traductions possibles de l'ARNm CAV-2 donnent deux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de la Cav-2 (Scherer et al. 1996), cependant très peu de choses sont connues concernant leur expression et leur fonction respectives. Telle que Cav-1, Cav-2 peut être palmitoylée sur ses résidus cystéine en C-term (Kwon et al. 2015).

La troisième isoforme de la cavéoline a été identifiée par bio-informatique suite à une recherche d'homologues de Cav-1. Elle est nommée cavéoline 3 ou M-cavéoline car elle est exprimée principalement dans le muscle différencié ; lisse, squelettique, et cardiaque (Way et Parton 1995; Tang et al. 1996). Elle est identique à Cav-1 à 65% et similaire à 85% (Tang et al. 1996) (Figure 15). Cav-3 peut elle aussi être palmitoylée en C-term ce qui permet son oligomérisation. De plus il a été montré dans les cardiomyocytes que Cav-1 et Cav-3 pouvaient s'hétéro-oligomériser et former des cavéoles mixtes (Volonte et al. 2008). Étant l'isoforme musculaire de la cavéoline, cette thèse sera concentrée sur cette protéine qui sera détaillée en détails dans la partie III.

Les trois cavéolines sont localisées sur deux chromosomes différents. CAV-1 et CAV-2 à environ 19 kilobases (kb) l'un de l'autre sur le chromosome 7 en position 7q31.1 et CAV-3 sur le chromosome 3 en position 3p25 (Engelman et al. 1999). Elles possèdent toutes les trois une séquence spécifique 'FEDVIAEP' dans leur domaine hydrophile qui est appelée '*caveolin signature motif*' soit la séquence signature de la cavéoline (Scherer et al. 1996; Tang et al. 1996) (Figure 15).

Walser et ses collègues ont montré en 2012 que des vésicules membranaires, appelées cavéoles hétérologues (h-cavéoles), issues de la scission de domaines cavéolaires de la membrane plasmique, peuvent être induites en exprimant de la cavéoline recombinante dans un hôte hétérologue comme *Escherichia coli*. Ils ont montré que les h-cavéoles induites par Cav-1 avaient une morphologie similaire aux cavéoles des mammifères, le nombre de cavéolines dans une h-cavéole est similaire à la densité de cavéolines dans une cavéole *in vivo* ( $163,9 \pm 19,5$  contre  $144 \pm 39$ ), et les cavéolines mutées et isoformes incapables de générer des cavéoles dans les systèmes mammifères ne produisent pas non plus de h-cavéoles dans ce système hétérologue.

Cependant afin d'avoir des cavéoles fonctionnelles les cavéolines doivent s'associer à des protéines accessoires et en particulier aux cavines.



**Figure 15. La famille des cavéolines et la conservation de ses domaines.**

La famille des cavéolines présente de nombreux domaines conservés. Le domaine N-terminal contient en particulier la séquence signature (FEDVIAEP) et le domaine d'oligomérisation qui permet l'homo ou l'hétéro-oligomérisation des cavéolines. La différence de taille entre les membres de cette famille dépend de la longueur du domaine N-terminal. (Adapté de Parton et del Pozo 2013)

### II.2.1.2. Les cavines comme manteau de la cavéole

Les protéines de la famille des cavines sont localisées au niveau des cavéoles et dépendent de Cav-1 (ou Cav-3 dans le muscle) pour s'associer à la membrane

(Bastiani et al. 2009; McMahon et al. 2009). Elles sont nécessaires à la formation et/ou à la stabilisation des cavéoles dans tous les tissus (Liu et al. 2014).

Cette famille est constituée de quatre protéines de 31-47kDa possédant une homologie de séquence et une structure en hélice  $\alpha$  chargée positivement dans deux régions clairement délimitées appelées régions hélicales 1 et 2 (HR1 et HR2) (Gustincich et al. 1999; Kovtun et al. 2014) (Figure 16). HR1 permet une liaison au phosphatidyl-inositol tandis que HR2 permet celle à la phosphatidyl-sérine (Tillu et al. 2018). De plus les cavines peuvent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles. De nombreux motifs PEST (riches en proline, acide glutamique, serine et thréonine) caractéristiques d'une sensibilité à la protéolyse suggèrent que l'homéostasie et la fonction des cavines sont régulées par la dégradation protéique (Kovtun et al. 2015).

Cavine n'est pas leur nom d'usage et ainsi la cavine 1 est aussi appelée *polymerase I and transcript release factor* (PTRF), la cavine 2, *serum deprivation protein response* (SDPR), la cavine 3 est nommée *sdr-related gene product that binds to C-kinase* (SRBC) et la cavine 4, *muscle restricted coiled-coil protein* (MURC) (Hayer et al. 2010). Des complexes hétéro-oligomériques de cavines peuvent être retrouvés dans le cytosol et sont recrutés par Cav-1 (ou Cav-3) pour être adressés aux cavéoles. L'abondance des différentes isoformes de cavines varie selon les tissus (Bastiani et al. 2009), les cavines 1 et 3 sont exprimées largement, et la cavine 4 est spécifique du muscle (Hansen et al. 2013). On aurait donc des cavéoles différentes en fonction des tissus et des types cellulaires (Hansen et al. 2013).

La cavine 1 (PTRF) a été en premier lieu identifiée en tant que facteur de stimulation du relargage des pré-ARN et de la polymérase I (Pol I) lors de la transcription médiée par Pol I (Jansa 1998). Elle est essentielle à la formation de cavéoles dans les cellules mammifères (Hill et al. 2008; Liu et al. 2008) et sa distribution tissulaire est très proche de celle de Cav-1 (Hill et al. 2008; Liu et al. 2008). La cavine 1 est cytosolique et s'associe avec les cavéoles matures à la membrane plasmique mais pas avec la cavéoline non cavéolaire, c'est-à-dire avec la cavéoline retrouvée au niveau de l'appareil de Golgi ou avec les formes mutantes de la cavéoline. Cette interaction est conservée au cours de l'évolution ainsi la cavine 1 de mammifère est capable de générer des cavéoles à partir de cavéolines d'invertébrés.

En 2008, Hill et al. se sont demandés comment la cavine 1 reconnaissait et stabilisait les cavéoles. En effet malgré l'évidente association de Cav-1 et cavine 1, il leur a été impossible de montrer leur liaison par immunoprécipitation, ce qui laisse penser que le rôle de Cav-1 serait indirect et que des lipides membranaires pourraient être impliqués. Ils ont finalement montré une liaison de cavine 1 recombinante avec de la phosphatidyl-sérine (PS) *in vitro* ainsi qu'une présence nécessaire de cholestérol pour permettre une interaction cavine 1/Cav-1. On sait que le domaine de repliement de Cav-1 s'oligomérisent *in vitro* afin de former des domaines membranaires riches en PS et cholestérol (Wanaski, Ng, et Glaser 2003), il serait donc possible que la cavine 1 se fixe à ces domaines afin de stabiliser la courbure de la membrane des cavéoles. Cavine 1 sert donc de manteau à la cavéole.

Les autres membres de la famille des cavines, cavines 2, 3 et 4 (dans le muscle) sont aussi impliqués dans l'assemblage des cavéoles. Ces protéines peuvent se trimériser avec la cavine 1 au niveau du domaine HR. Il faut noter que cavine 2 et cavine 3 ne peuvent pas s'hétéro-oligomériser (Gambin et al. 2013). En 2009, Bastiani et ses collègues ont étudié la distribution tissulaire des cavines et ont montré que la distribution des cavines 2 et 3 corrélait celle de Cav-1. Différentes striations à la surface des cavéoles sont donc observées en fonction des différents oligomères cavine 1/2, cavine 1/3 et cavine 1/4 (Gambin et al. 2013).

SDPR ou cavine 2 a été décrit et isolé dans les plaquettes en tant que protéine de liaison à la phosphatidyl-serine (Burgener et al. 1990). De plus la traduction de la cavine 2 a été montrée comme augmentée dans des cellules privées de sérum (McMahon et al. 2009).

D'après Hansen et ses collègues la cavine 2 est nécessaire à la formation des cavéoles dans les cellules endothéliales pulmonaires de souris ainsi que dans les adipocytes. Ils ont montré que la taille des complexes protéiques des cavines dans les poumons et tissus adipeux est réduite comparée aux autres tissus. Et sachant qu'une délétion de cavine 2 entraîne une augmentation de la taille des complexes de cavines dans le poumon, cavine 2 serait impliquée dans la détermination de la taille et la stabilisation de ces complexes. De plus, en l'absence de cavine 2 à la fois *in vivo* et *in vitro* dans des cellules endothéliales pulmonaires, cavine 1 et Cav-1 se retrouvent dans des régions plates de la membrane plasmique ainsi que dans des cavéoles peu

profondes. Ils en ont conclu que les cavéoles endothéliales des différents tissus étaient hétérogènes, que cavine 2 avait un rôle important dans la génération de cette hétérogénéité et que le rôle de cavine 2 était directement lié à l'établissement de la forme des membranes cavéolaires (Hansen et al. 2013). En 2009, ils avaient montré qu'une surexpression de SDPR dans des cellules de mammifère induisait la formation de tubes de membrane plasmique, supposant que son rôle dans les cavéoles pouvait être en lien avec la courbure membranaire (Hansen et al. 2009).

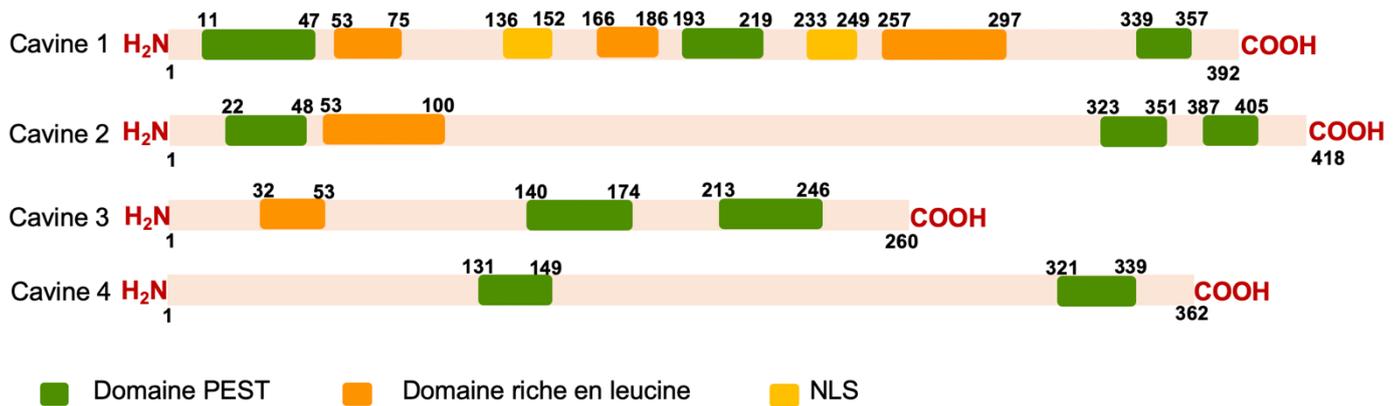
Cependant il faut noter que cavine 2 n'est pas nécessaire dans tous les types d'endothéliums.

La cavine-3 ou SRBC a été découverte en 1997 comme un partenaire phosphorylé par la PKCδ activée *in vitro* et *in vivo* (Izumi et al. 1997). Elle a donc tout d'abord été nommée PRKCDBP soit *protein kinase C delta-binding protein*. Elle a une grande homologie de séquence avec cavine-2 et beaucoup de fonctions similaires. Elles se lient toutes les deux à la phosphatidylsérine (PS), et sont surexprimées dans des conditions sans sérum. La cavine-3 est aussi appelée SRBC pour *SDR-related gene product that binds to C-kinase* (Nassar et Parat 2015).

La cavine 3 est exprimée dans le foie et le cerveau où les autres protéines cavéolaires sont très faiblement exprimées. De plus elle est fortement exprimée dans le cœur (Bastiani et al. 2009). McMahon et ses collègues ont été les premiers à rapporter que SRBC était localisé au niveau des cavéoles. Son domaine leucine-zipper ainsi que l'expression de Cav-1 permettent un adressage correct. La cavine 3 étant sous-réglée en cas de déplétion de Cav-1, ils ont avancé l'hypothèse que Cav-1 la stabiliserait. Finalement leur étude leur a permis de conclure que la cavine 3 régulait le bourgeonnement et le transport des cavéoles le long des microtubules (McMahon et al. 2009).

En 2008, suite à un séquençage SAGE (de l'anglais *serial analysis gene expression*) d'ARNm isolés de cœurs de souris adultes, une nouvelle protéine de 362 acides aminés a été identifiée. La cavine 4 a ainsi été la dernière cavine décrite (Ogata et al. 2008). Elle est retrouvée abondamment dans les muscles cardiaque et squelettique, ainsi qu'à un niveau moindre dans le muscle lisse au niveau de l'aorte et des poumons. Cette protéine étant retrouvée principalement dans le tissu musculaire et possédant

un domaine globulaire supposée elle a été nommée *muscle-restricted putative coiled-coil* (MURC). A la base décrite comme une protéine purement cytosolique (Ogata et al. 2008; Tagawa et al. 2008), il a été montré par Bastiani et ses collègues qu'elle s'associait avec les cavéoles à la membrane plasmique et qu'elle pouvait être impliquée dans des pathologies musculaires liées aux cavéoles (cf. IV. Pathologies) (Bastiani et al. 2009).



**Figure 16. Structure des cavines.**

Les cavines ont des tailles différentes mais elles possèdent toutes des domaines PEST et riches en leucine permettant des interactions protéiques. La cavine 1 est la seule possédant des séquences NLS favorisant sa translocation au noyau. (Adapté de Bastiani et al. 2009).

### II.2.1.3. Les protéines accessoires stabilisatrices de la cavéole

Bien que non essentielles à la formation des cavéoles, des protéines accessoires y sont présentes afin de les stabiliser et de réguler leurs fonctions.

Les protéines EHD (Eps 15 homology domain containing) s'associent avec le col des cavéoles. EHD2 est la principale protéine de cette famille retrouvée au niveau cavéolaire. C'est une ATPase formant des anneaux de 14 monomères au niveau du col des cavéoles (Shah et al. 2014). Yeow et ses collègues ont récemment montré que EHD1 et EHD4 pouvaient aussi être recrutés aux cavéoles lorsque le niveau d'EHD2 était réduit (Yeow et al. 2017). La perte de ces trois protéines n'affecte pas la cavéole en elle-même mais la morphologie de son col. De plus il a été montré qu'un déficit en protéines EHD entraînait une diminution de regroupements multi-cavéolaires. Cela suggère que ces protéines ont un rôle dans la stabilisation de ces complexes (Yeow et al. 2017).

Les pacsines (ou syndapines) se lient aux protéines EHD grâce à leur motif NPF (Asn-Pro-Phe). Il existe trois pacsins : pacsin 1 retrouvée essentiellement dans les neurones (Plomann et al. 1998), pacsine 2 qui est ubiquitaire et pacsine 3 exprimée principalement dans le tissu musculaire (Ritter et al. 1999). Une inhibition de l'expression de la pacsine 2 dans des cultures cellulaires entraîne une modification de la morphologie des cavéoles (Hansen et al. 2011), et une extinction du gène codant pacsine 3 dans des souris entraîne une perte de cavéoles musculaires (Seemann et al. 2017). Ces découvertes suggèrent que les pacsines sont importantes dans le processus de formation des cavéoles par déformation des membranes. Une autre fonction de ces protéines est le recrutement de la dynamine II au niveau des cavéoles (Senju et al. 2011). La dynamine II est une GTPase ayant un rôle dans le bourgeonnement des cavéoles depuis la membrane plasmique afin de permettre leur endocytose (Henley et al. 1998; Pelkmans et al. 2002; Yao et al. 2005).

#### II.2.1.4. *La cavéole comme compartiment lipidique*

Une des caractéristiques importantes des cavéoles est leur insolubilité dans le Triton X-100 à 4°C. Cela suggère qu'elles présentent une grande concentration de sphingolipides saturés et de cholestérol (Capozza et al. 2003). Des analyses quantitatives ont certifié un enrichissement en cholestérol et en glycosphingolipides (Ortegren et al. 2004).

De plus, les différents constituants cavéolaires ont la capacité de se fixer aux lipides. Ainsi Cav-1 se lie au cholestérol (Murata et al. 1995) au niveau d'une séquence de reconnaissance du cholestérol spécifique d'acides aminés (Epanand et al. 2005) et on a estimé jusqu'à 22,000 molécules de cholestérol par cavéole (Ortegren et al. 2004). Cav-1 possède aussi des sites palmitoylation sur ses trois résidus cystéines qui permettent la fixation de palmitate (Dietzen et al. 1995). Les cavines possèdent elles aussi une activité de fixation aux lipides sur leur site HR1 de liaison au phosphatidylinositol (4,5) et sur leur site de fixation à la phosphatidyl-serine (Wanaski et al. 2003). La concentration élevée de ces protéines de liaison aux lipides dans les cavéoles (140 cavéolines et 50 cavines) confirme la présence d'un enrichissement en ces différents lipides.

On sait aussi qu'une déplétion en cholestérol cause un aplatissement des cavéoles (Rothberg 1992) ainsi que la dissociation des cavines de la membrane plasmique (Breen et al. 2012; Hill et al. 2008). Le rôle essentiel de la phosphatidyl-sérine dans la formation et la stabilité des cavéoles a aussi été montré (Hirama et al. 2017).

Les cavéoles représenteraient donc des domaines lipidiques spécialisés.

### II.2.2. Synthèse et formation des cavéoles : Du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique

Les cavéoles sont formées par l'assemblage de différentes protéines et lipides qui rejoignent la membrane plasmique par différents mécanismes (Figure 17).

La protéine intégrale cavéoline est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle s'associe en complexes 7S (Monier et al. 1995; Fernandez et al. 2002). Chaque complexe contient 7 à 14 molécules de Cav-1 (ou Cav-3 dans le muscle) oligomérisées par leur séquence spécifique (Sargiacomo et al. 1995). Si Cav-2 est synthétisée dans le type cellulaire en question elle peut alors s'oligomériser avec Cav-1 (Scherer et al. 1996; Scheiffele et al. 1998). Grâce à la présence d'une séquence DXE en N-term les complexes protéiques rejoignent les sites de sortie du RE et sont envoyés à l'appareil de Golgi dans des vésicules COPII (Scheiffele et al. 1998).

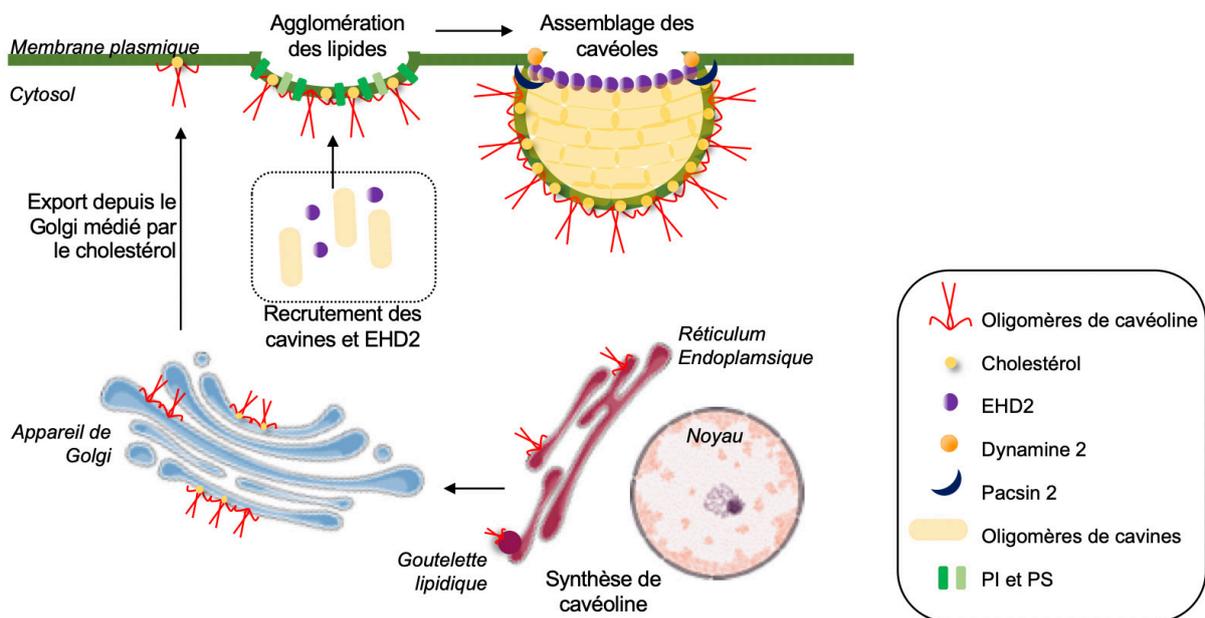
Les cavéolines s'accumulent alors dans le Golgi médian où elles perdent leur capacité de diffusion dans la membrane, changent de conformation, s'associent avec le cholestérol et forment des complexes protéiques 70S (Hayer et al. 2010).

Le transport de la cavéoline à la membrane plasmique a lieu dans des vésicules *caveolae-like*. Ces vésicules ont été décrites comme des cavéoles finalisées (Tagawa et al. 2005) mais il a été montré par la suite que le manteau n'était pas mature (Parton et Simons 2007; Liu et al. 2008; Bastiani et al. 2009). En effet les protéines accessoires ne se lient aux cavéoles qu'à la membrane plasmique. Cependant en rejoignant la MP, les complexes de Cav-1 sont stables. Leur assemblage a donc lieu au niveau du Golgi tardif ou dans les vésicules de transit (Hayer et al. 2010). Une fois à la membrane plasmique les molécules de Cav-1 sont relativement immobiles et ne migrent pas d'un domaine cavéolaire à l'autre (Tagawa et al. 2005). Il faut noter que leur mobilité augmente en cas de déplétion du cholestérol (Pelkmans et al. 2004).

Les cavines sont synthétisées dans le cytosol puis recrutées dans les domaines riches en cavéolines en interagissant non pas avec Cav-1 directement mais avec les lipides spécifiques des cavéoles comme la PS. Comme décrit précédemment la cavine 1 forment des hétéro-trimères avec les cavines 2 et 3 et est nécessaire pour l'invagination des cavéoles.

Cet assemblage tardif des cavéoles démontre qu'elles ne sont pas formées uniquement par des interactions protéines-protéines mais aussi grâce à l'environnement unique de la membrane plasmique et en particulier sa composition lipidique.

Un désassemblage des cavéoles peut survenir en cas de besoin par exemple en cas de stress mécanique afin de protéger l'intégrité de la cellule en permettant de changer sa forme (cf. II.3 Fonctions). On a alors un relargage des protéines accessoires dans le cytosol et un aplatissement des cavéoles. Le terme aplatissement correspond donc à une perte de l'identité cavéolaire.



**Figure 17. Assemblage des cavéoles à la membrane plasmique.**

La protéine Cav-1 formant la cavéole est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Son domaine hydrophobe permet son accumulation sur des gouttelettes lipidiques bourgeonnant du RE. La Cav-1 synthétisée est transportée vers l'appareil de Golgi, où elle s'assemble en un complexe riche en cholestérol qui est ensuite transféré à la membrane plasmique. L'insertion de Cav-1 dans la MP entraîne un regroupement des lipides et le recrutement d'autres composants cavéolaires telles que les cavines et EHD2 (Adapté de Parton et al. 2020).

Une cavéole mature à la membrane plasmique présente donc trois couches. Tout d'abord une bicouche lipidique formée de cholestérol, sphingolipides, phosphatidylsérine. Ce domaine permet l'attraction des protéines d'intérêt au niveau de la membrane plasmique. On a ensuite un échafaudage de protéines intégrales de Cav-1 (et Cav-2) ou Cav-3 dans les cellules musculaires, oligomérisées en complexes 70S, liées très fortement au cholestérol, et stable dans la MP. Finalement une couche périphérique au niveau cytosolique de la cavéole et formée par des cavines permet sa stabilisation, l'induction de la courbure et la régulation du bourgeonnement.

### II.3. FONCTIONS

Comme décrit précédemment les cavéoles sont donc des structures stables à la membrane plasmique. Leurs fonctions dans les cellules ont été très étudiées et il semblerait qu'elles soient multiples.

#### II.3.1. L'endocytose des cavéoles

En 2001, Pelkmans, Kartenbeck et Helenius ont montré que le papovavirus SV40 utilisait les cavéoles pour entrer dans les cellules et ainsi contourner la voie lysosomale. Le SV40 est un virus à ADN non enveloppé qui se fixe à la membrane plasmique. Il se meut ensuite latéralement pour atteindre les cavéoles. Il y active une cascade de signaux dépendante d'une tyrosine kinase qui permet de perturber le cytosquelette d'actine environnant, et de recruter la dynamine II au niveau du site d'internalisation (Pelkmans et al. 2002). Les cavéoles se détachent alors et se déplacent dans le cytosol sous la forme de vésicules d'endocytose cavéolaires. Les virions sont délivrés par fusion membranaire indépendante de RAB5 à un compartiment membranaire intracellulaire stationnaire appelé cavéosome (Pelkmans et al. 2001). Ces structures ne présentent pas de marqueur de la voie d'endocytose dépendant de la clathrine, leur membrane est riche en cholestérol, elles ne sont pas connectées à l'espace extracellulaire, présentent un pH neutre (contrairement aux endosomes qui ont un pH acide) (Pelkmans et al. 2001). Les cavéosomes permettent le tri des molécules qu'ils contiennent. Par exemple la toxine cholérique est dirigée vers l'appareil de Golgi, Cav-1 est renvoyée à la membrane plasmique et SV40 est

transporté au RE par des protéines migrant sur les microtubules (Pelkmans et al. 2004).

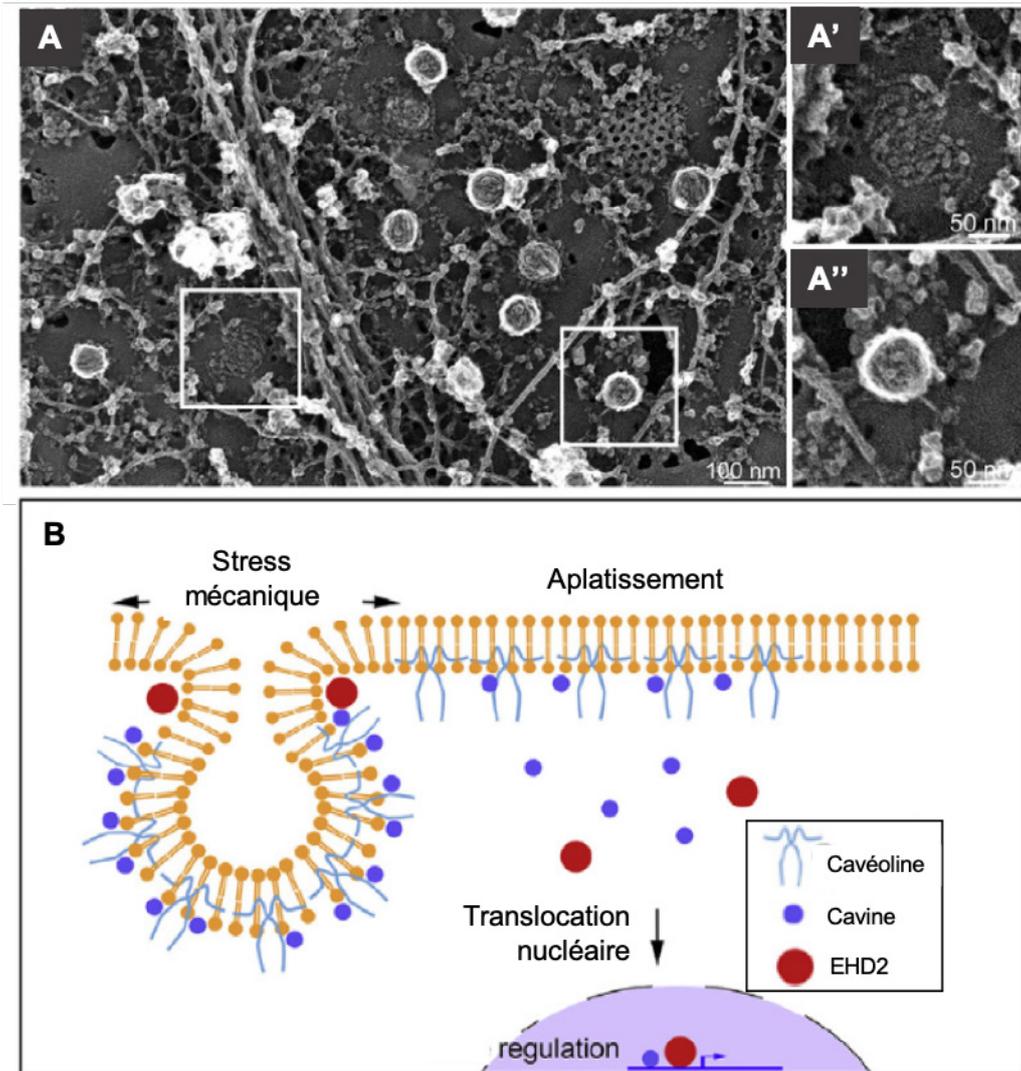
Les cavéoles gardent une structure stable au cours de l'endocytose. En plus de leur fusion avec le cavéosome, elles peuvent être recrutées par des GTPases spécifiques et fusionner aux endosomes précoces d'une manière dépendante de RAB5 (Pelkmans et al. 2001).

Le rôle de la dynamine II dans ce processus d'endocytose par les cavéoles n'est pas entièrement défini mais semble crucial et est en premier lieu démontré par une interaction directe de la dynamine II avec Cav-1 dans des cellules endothéliales en culture (Yao et al. 2005). De plus, en 1998 Henley et ses collègues ont montré dans des cellules épithéliales qu'une inhibition de la dynamine 2 entraînait l'accumulation attendue de puits de clathrines mais aussi de cavéoles. Ils ont de même observé une diminution de l'entrée de la toxine cholérique (Henley et al. 1998).

Cependant il faut noter que cette toxine peut toujours entrer dans les cellules en se fixant sur le ganglioside GM1 et en diffusant à travers la membrane plasmique (Kirkham et Parton 2005). Il en est de même pour d'autres lipides qui entrent habituellement dans les cellules par la voie cavéolaire.

### II.3.2. La mécano-protection par les cavéoles

Des variations de tension de membrane peuvent mettre l'intégrité des cellules en péril. Ainsi il est intéressant de noter que les cellules présentant le plus de cavéoles à la membrane plasmique sont celles subissant le plus de stress mécanique *in vivo* (Lo et al. 2015). Sinha et ses collègues ont montré que la réponse des cellules endothéliales et musculaires à un stress était l'*aplatissement* des cavéoles (Sinha et al. 2011) (Figure 18). Ce désassemblage passif, c'est-à-dire indépendant de l'ATP et de l'actine (Sens et Turner 2006), permet de contrer les variations de quantité de membrane (Sinha et al. 2011). La présence d'un pool stable de cavéoles à la membrane plasmique permet une réponse rapide des cellules. De plus, ils ont montré que des mutations dans les cavéolines, par exemple des mutations dans Cav-3, fragilisent la membrane plasmique. Bien entendu, ce désassemblage des cavéoles génère des signaux mécano-sensoriels.



### II.3.2.1. Les cavéoles comme mécano-senseurs

Le désassemblage des cavéoles entraîne un relargage des cavines et autres protéines accessoires dans le cytosol (McMahon et al. 2019). Elles peuvent alors interagir et réguler des protéines intracellulaires. Cette régulation a lieu en particulier en cas de modifications dans la tension de membrane.

Ainsi lorsque la tension de membrane augmente la protéine accessoire EHD2 est relâchée dans le cytosol, transportée dans le noyau où elle y régule négativement des

gènes du cycle cellulaire, du développement cellulaire et des points de contrôle du cycle cellulaire (Torrino et al. 2018).

De même Hetmanski et ses collègues ont montré que lorsque la tension de membrane diminue le nombre de cavéoles augmente. En effet la migration des cellules sur un substrat rigide nécessite une rétractation rapide de la membrane. Ces cavéoles supplémentaires recrutent la protéine Ect2, un facteur d'échange Rho-GTP, qui suractive RhoA et la machinerie d'acto-myosine afin de permettre la rétractation de la membrane et la migration des cellules (Hetmanski et al. 2019).

### II.3.2.2. *Les cavéoles comme signalisation du stress*

Les cavéoles n'ont pas vraiment un rôle dans les signaux cellulaires sous forme de cavéoles. En effet lorsque le nombre de cavéoles est diminué l'organisation des protéines et récepteurs impliqués dans les signaux n'est pas modifiée (Gonzalez et al. 2004). Ces protéines interagissent avec la cavéoline au niveau de son domaine d'échafaudage qui n'est pas accessible dans les cavéoles. Elles sont donc en interaction avec le pool de protéines cytosoliques (Dewulf et al. 2019), par exemple après le désassemblage des cavéoles.

La libération de Cav-1 dans le cytosol peut entraîner sa phosphorylation sur la tyrosine 14 ce qui lui permet de recruter des protéines spécifiques. Cela entraîne par exemple l'augmentation de la traduction des protéines cavéolaires dans le cas d'un stress mécanique (Joshi et al. 2012), ou un recrutement de TRAF2, un récepteur essentiel dans l'induction de la mort cellulaire suite à un stress oxydatif (Jung et al. 2018).

De nombreuses voies de signalisation ont aussi été liées aux cavines. Après désassemblage des cavéoles elles sont retrouvées libres soit en complexes cavine1/cavine2 ou cavine1/cavine3, soit en monomères de cavine3 dans le cytosol (McMahon et al. 2019). McMahon et ses collègues ont montré qu'un traitement aux UV dans différents types cellulaires entraînait l'augmentation de la concentration en cavine3 cytosolique. La cavine 3 interagit alors avec la phosphatase PP1 $\alpha$  en inhibant son activité catalytique ce qui provoque l'augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX entraînant l'apoptose (McMahon et al. 2019).

Il a été montré dans les adipocytes que la cavine 1 était relâchée suite au traitement par insuline afin d'interagir avec des cibles nucléaires (Briand et al. 2014). Afin de réguler ce processus, la cavine 1 possède un site accessible d'ubiquitination sur ses lysines lorsqu'elle est libre, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome et donc la régulation de la concentration cytosolique en cavine 1 (Tillu et al. 2015).

Les cavéoles pourraient donc servir de réservoir de protéines de signalisation pouvant être relâchées dans la cellule en cas de réponse des cavéoles à des conditions de stress. Cependant on ne sait pas encore comment le stress cellulaire induirait le désassemblage des cavéoles. Plusieurs hypothèses existent comme par exemple la phosphorylation de Cav-1 ou la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à la peroxydation des lipides cavéolaires.

### II.3.3. Les autres fonctions des cavéoles

Tout d'abord elles auraient un rôle dans l'homéostasie des lipides (Frank et Unger 2006). Cav-1 interagit avec le cholestérol, se fixe aux acides gras et s'associe aux gouttelettes lipidiques. Les cavéoles ont été montrées comme impliquées dans le stockage des lipides en fonction des besoins cellulaires (Razani et al. 2002). Et il a été montré qu'une délétion de Cav-1 altérerait la formation de gouttelettes lipidiques au cours de la régénération du foie (Fernández et al. 2006).

En 2006, Cheng et ses collègues ont démontré qu'en l'absence de Cav-1 les relâchements de calcium ainsi que les courants potassiques découlant de ses relâchements sont augmentés (Cheng et Jaggar 2006). En 2017, Tonogawa et ses collègues ont montré, dans le muscle cardiaque, une activation cavéole-spécifique de CaMKII, une kinase activée de façon calcium et calmoduline dépendante (Tanaka et al. 2018; Tonogawa et al. 2017). Les cavéoles pourraient donc avoir un rôle dans la signalisation calcique.

Enfin, les cavéoles seraient aussi impliquées dans la réparation tissulaire. En effet, en 2004 il a été montré que la sécrétion du facteur de croissance HGF par les cellules musculaires lésées provoque la diminution de la concentration en Cav-1 dans les cellules satellites musculaires. Cette réduction entraîne l'activation de ERK et de la voie p42/44 des MAP kinases impliquant la prolifération et la migration des

progéniteurs musculaires vers la zone lésée (Volonte et al. 2005). En 2003, Bansal et ses collègues avaient aussi émis l'hypothèse que la réparation de la membrane par la dysferline dans le cas de dystrophies musculaires pouvait être en lien avec Cav-3 sachant que Cav-3 et dysferline interagissent (Bansal et al. 2003). On pourrait donc penser que la dysferline interagirait avec Cav-3 afin d'activer certaines fonctions spécifiques des cavéoles.

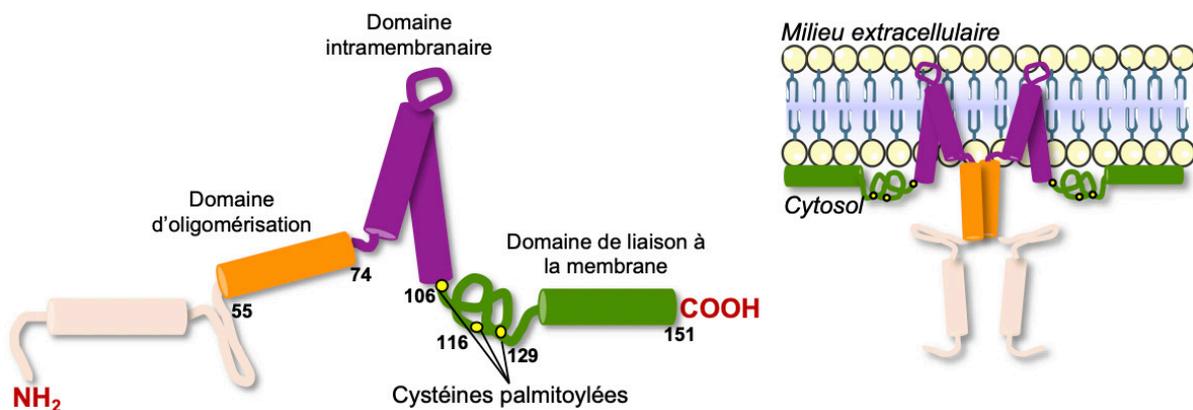
Les cavéoles sont des structures présentes dans de nombreux types cellulaires et aux fonctions variées. Elles sont particulièrement abondantes et spécialisées dans le muscle squelettique car formées par une cavéoline spécifique du muscle. C'est cette cavéoline que j'ai étudié au cours de ma thèse et qui sera introduite dans la partie qui suit.

### III. CAVEOLINE 3 ET CAVEOLES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

#### III.1. LES CAVEOLES SPECIFIQUES DU MUSCLE STRIE

Le muscle strié présente un type de cavéoles particulier. En effet la cavéoline 3 et la cavine 4 sont deux protéines exprimées spécifiquement dans le tissu musculaire.

La cavéoline 3 est donc une cavéoline spécifique du muscle. Elle a été décrite par Way et Parton en 1995 et fut initialement nommée M-caveolin. Le gène codant pour Cav-3 est situé sur le chromosome 3p25, est constitué de 2 exons codants et possède 65% d'homologie avec Cav-1. Cav-3 est une petite protéine de 151 acides aminés et 17kDa (Way et Parton 1995). En 2012, Whiteley et ses collègues l'ont purifiée et déterminée sa structure 3D. Ils ont ainsi décrit que sa partie N-terminale (acides aminés 1 à 74), était cytosolique, et contenait la séquence signature de la cavéoline (acides aminés 41 à 48) ainsi que le domaine d'oligomérisation (acides aminés 55 à 74).



**Figure 19. La protéine cavéoline 3.**

Représentation schématique de Cav-3 et de son insertion dans la membrane plasmique. Cav-3 s'insère dans des domaines spécifiques du sarcolemme riches en cholestérol et en sphingolipides grâce à son domaine intramembranaire en épingle à cheveux. Ses extrémités N et C terminales sont cytosoliques. Trois sites de palmitoylation dans le domaine de liaison à la membrane permettent son ancrage et sa stabilisation à la membrane plasmique.

Cav-3 est une protéine intégrale et sa région transmembranaire (acides aminés 75 à 106) forme un domaine en épingle à cheveux dans la membrane plasmique en association avec les phospholipides membranaires. Son extrémité C-terminale (acides aminés 106 à 151) est donc elle aussi cytosolique (Whiteley et al. 2012) (Figure 19).

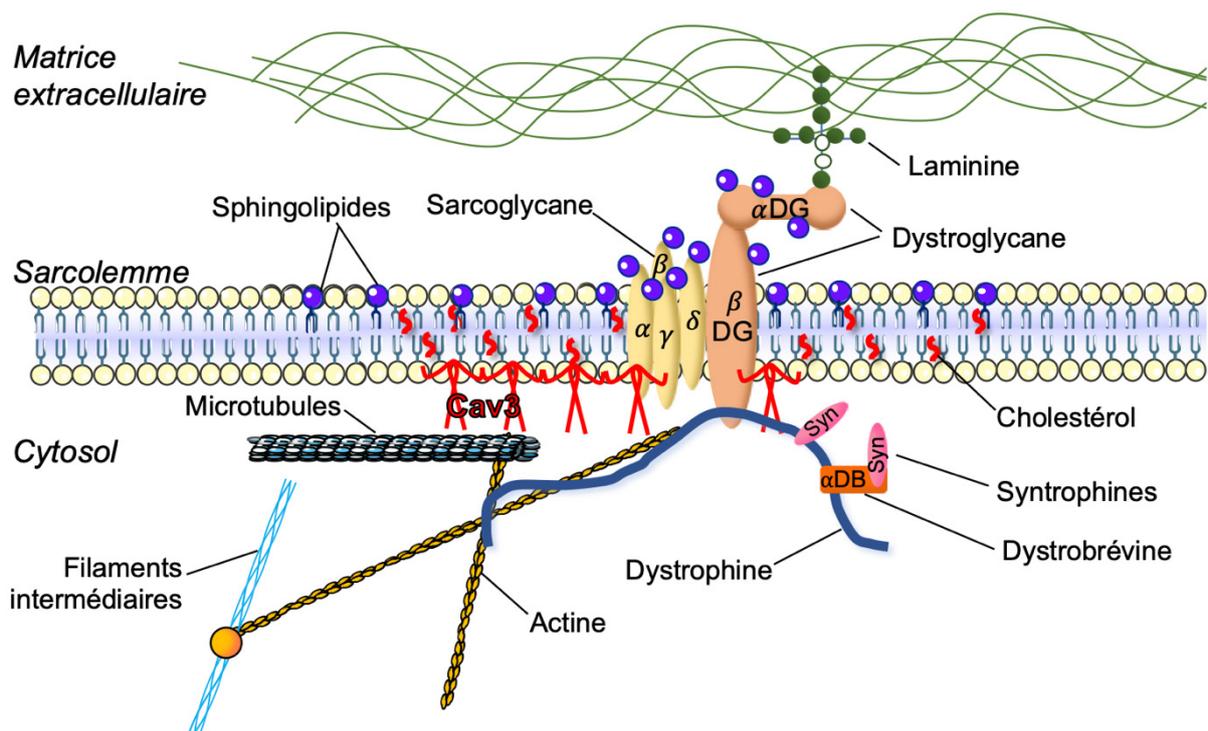
Les cellules satellites, les précurseurs myogéniques ainsi que les myoblastes en culture expriment seulement Cav-1 et Cav-2 (Volonte et al. 2005; Schubert et al. 2007). En 1996 Tang et ses collègues ont étudié l'expression de Cav-3 dans des C2C12 au cours de la différenciation. Ils ont montré une induction considérable des ARNm de Cav-3 et de ceux de la troponine I au cours des deux premiers jours de différenciation, suggérant que Cav-3 aurait un rôle dans le développement précoce du tissu musculaire (Tang et al. 1996). Bastiani et ses collègues ont montré que cette augmentation apparaissait environ 12h après l'induction de la différenciation (Bastiani et al. 2009). De plus, Galbiati et ses collègues ont émis l'hypothèse que Cav-3 était un régulateur de la fusion car sa déplétion dans des myoblastes C2C12 empêche la formation de myotubes (Galbiati et al. 1999).

Cav-3 est localisée dans les cavéoles au niveau du sarcolemme (Way et Parton 1995). Il a été proposé que Cav-3 soit associée avec le complexe de la dystrophine et des Glycoprotéines associées (DGC de l'anglais *dystrophin-associated glycoprotein complex*) (Figure 20) qui permet la connexion entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Sotgia et al. 2000). Cependant, de nombreuses études ont montré par la suite que Cav-3 n'est pas un composant du complexe DGC au sens strict du terme (Crosbie et al. 1998). Cav-3 interagit avec de nombreux autres complexes ou protéines, en particulier la dysferline (Matsuda et al. 2001), nNOS (García-Cardena et al. 1997), la PI3 kinase (Smythe et Rando 2006), la Src kinase (Smythe et al. 2003) et la phosphofructokinase (Scherer et Lisanti 1997).

Afin de former des cavéoles, la cavéoline musculaire s'associe aux cavines 1, 3 et 4 ainsi qu'aux protéines accessoires. L'association de Cav-1 avec des cavéoles Cav-3 est très débattue. Au cours de la différenciation, le niveau de Cav-1 semble diminuer alors que celui de Cav-3 augmente. Il n'est pas clair à ce jour si Cav-1 est capable de former des cavéoles avec Cav-3.

La cavine 4, aussi appelé MURC pour *muscle-restricted putative coiled-coil*, est spécifique du tissu musculaire. Comme Cav-3 son expression augmente après induction de la différenciation et ceci légèrement plus tôt que Cav-3 (Bastiani et al. 2009). La cavine 4 est majoritairement cytosolique et régule les voies de signalisation ERK, RhoROCK et RhoA influençant ainsi la différenciation du muscle squelettique et modulant la fonction cardiaque (Bastiani et al. 2009). En effet il a été montré que sa

surexpression promouvait la myogenèse, et entraînait des dysfonctionnements cardiaques et des défauts de conductance (Ogata et al. 2008; M. Tagawa et al. 2008). La cavine 4 peut aussi s'associer en complexes avec la cavine 1 afin de former le manteau des cavéoles (Bastiani et al. 2009), mais est incapable d'être transportée à la membrane en son absence. En effet la cavine 4 est localisé dans le noyau dans des fibres musculaires n'exprimant pas la cavine 1 et ne présentant donc pas de cavéoles (Lo et al. 2015).

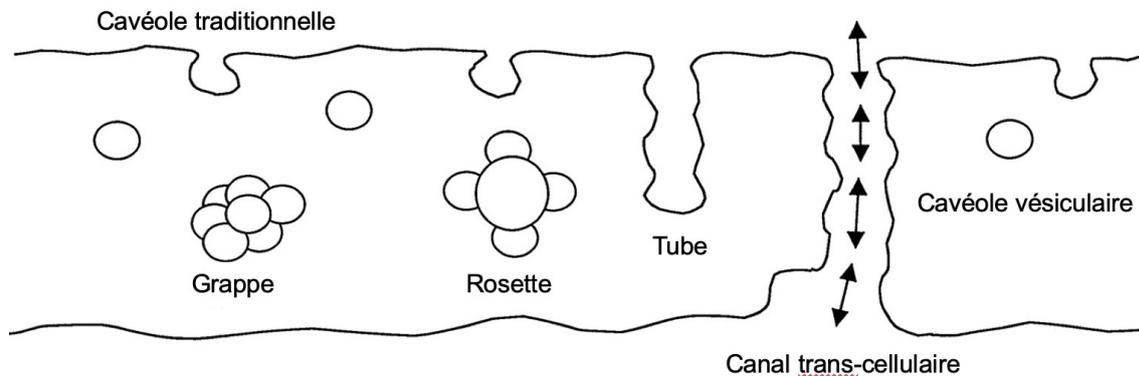


**Figure 20. Cav-3 et le complexe βdystroglycan.**

Représentation schématique des interactions entre le complexe du β-dystroglycan et Cav-3. Il existe plusieurs sites d'interaction : Cav-3 peut interagir directement avec les canaux et le domaine d'échafaudage de Cav-3 peut interagir avec d'autres protéines du cytosquelette comme la dystrophine et l'actine. Il n'a pas été montré si Cav-3 était associée au DGC sous forme libre à la membrane ou sous forme de cavéoles. J'ai donc choisi de schématiser l'interaction du DGC avec la Cav-3 libre à la membrane plasmique (Adapté de Huang et al. 2013).

Dans le muscle les cavéoles peuvent s'organiser en différentes structures formant de simples cavéoles, des rosettes ou des tubes (Figure 21). Comme dans les autres tissus, elles ont de nombreuses fonctions allant de la transduction du signal, l'homéostasie des lipides, la mécano-protection, jusqu'à l'autophagie (Kassan et al. 2016). Dans mon travail de thèse je me suis intéressée principalement à l'implication des cavéoles dans le muscle squelettique et plus particulièrement dans la biogenèse des tubules transverses. Dans la suite de mon introduction je m'attacherai à présenter

les concepts qui sont pertinents pour la compréhension de ce processus même si le rôle des cavéoles n'est pas limité à la formation de tubes.



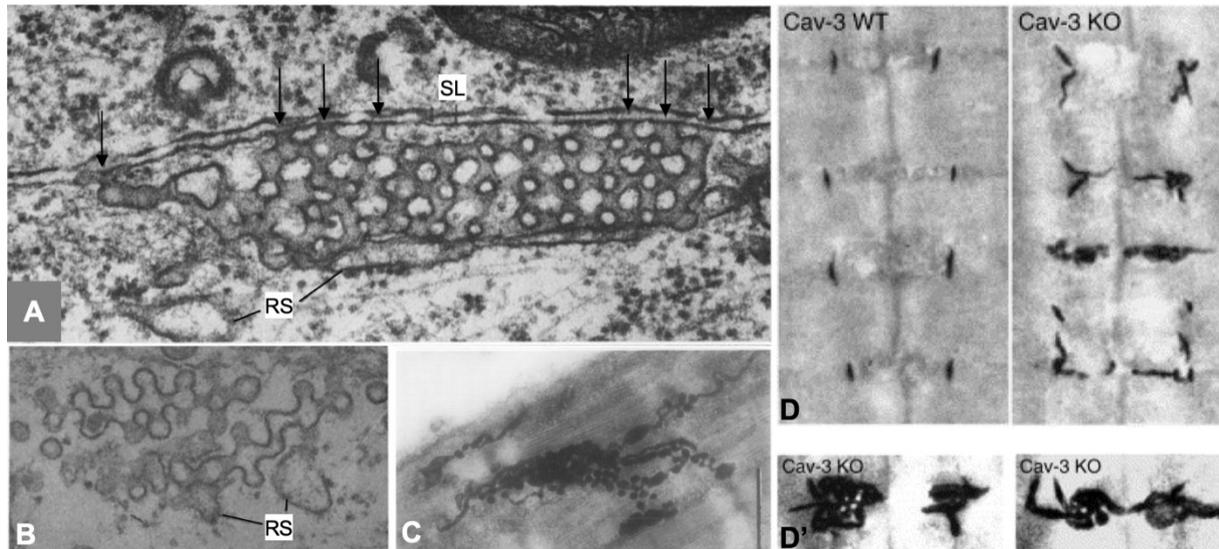
**Figure 21. Les différents types d'organisation des cavéoles à la membrane plasmique.** Représentation schématique des différentes organisations cavéolaires possibles à la membrane plasmique. Les cavéoles peuvent exister sous de nombreuses autres formes que celle traditionnelle invaginée à membrane plasmique. On peut les trouver sous forme de vésicules ou d'agrégats tels que des grappes ou des rosettes et même en tubules allongés. Dans les cellules endothéliales, les tubes allongés peuvent parfois s'accoler au côté luminal, créant ainsi un canal transcellulaire (Adapté de Razani et al. 2002).

## III.2. LES FONCTIONS DIVERSES DES CAVEOLES MUSCULAIRES

### III.2.1. L'histoire des cavéoles et des tubules-T

Le mécanisme le plus important du tissu musculaire, qui permet le mouvement du corps, est la contraction. Elle est rendue possible par la connexion entre les tubules-T et le RS au niveau des triades. La recherche de l'implication des cavéoles dans la formation des tubules-T remonte à 1968 et se précise au fil des années (Figure 22).

L'hypothèse initiale de la formation des tubules-T grâce au bourgeonnement répété des cavéoles a été émise par Ishikawa en 1968. En effet une similarité entre la configuration et la dimension des cavéoles et celle des tubules-T naissants a été démontrée par microscopie électronique dans des myotubes en culture (Ishikawa 1968).



**Figure 22. Tubules T en formation dans des myotubes immatures.**

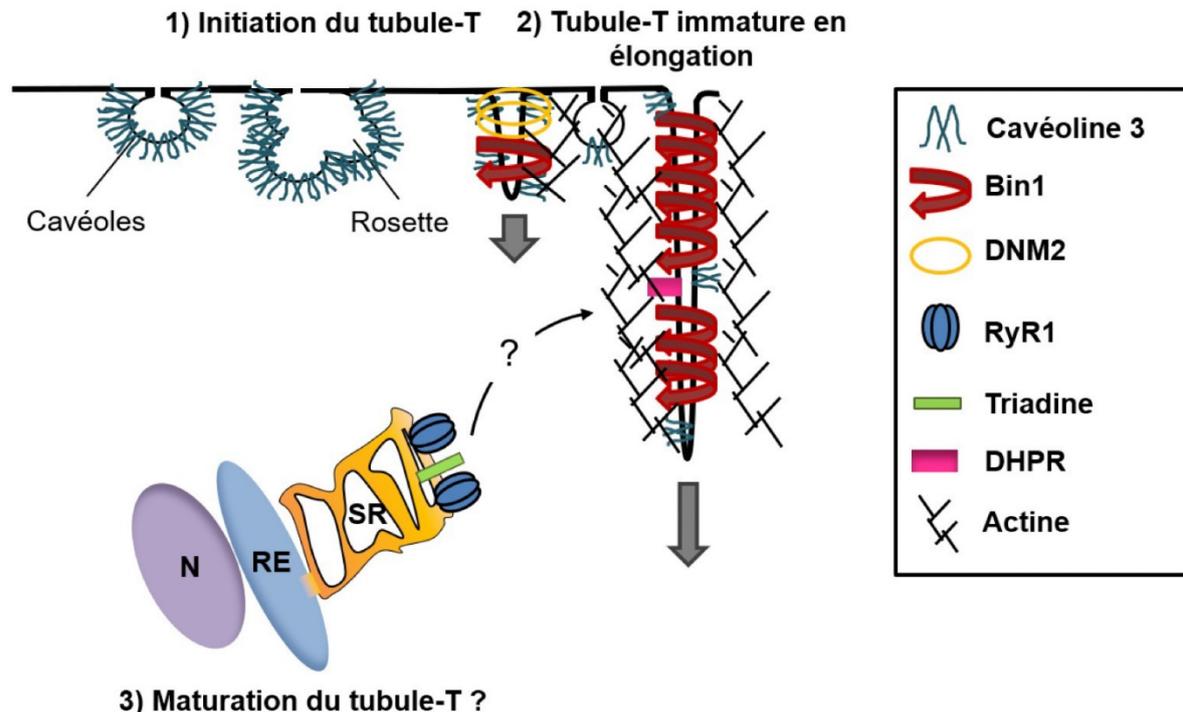
(A) et (B) Images de microscopie électronique à transmission de réseaux tétragonaux observés dans des myotubes en culture à un jour de différenciation. Ces réseaux sont constitués d'unités cavéolaires. Grossissement x 62,000. (A) Réseau tétragonal typique observé sous le sarcolemme (SL). Ce réseau est continu avec le sarcolemme par l'intermédiaire des parois des canaux (flèches) espacés assez régulièrement le long du réseau. (B) Tubules étendus avec des réseaux tétragonaux d'unités cavéolaires et proche de réticulum sarcoplasmique (RS). (Adapté de Ishikawa 1968) (C) Observation de microscopie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d'un muscle EDL de souris à 18 jours de développement in utero. Les tubules-T rendus denses aux électrons par un traceur ont une orientation longitudinale. Des protrusions de structures ressemblant à des cavéoles (flèche) sont retrouvées au niveau de la membrane du tubule. Barre d'échelle : 1µm (Adapté de Franzini-Armstrong 1991). (D) Des sections de tissu musculaire squelettique de souris de type sauvage (WT) (panneau de gauche) et de souris knockout (KO) Cav-3 (panneau de droite) ont été soumises à une coloration du système de tubules-T à l'aide de ferrocyanate de potassium. Les tubules T apparaissent alors denses aux électrons (colorés en noir). Le système des tubules-T est dilaté et orienté longitudinalement chez les souris caveolin-3 KO. En (D'), deux images de microscopie électronique à transmission représentatives de sections de muscles squelettiques de souris Cav-3 KO sont présentées en détail (Adapté de Galbiati et al. 2001).

Cette hypothèse fut confirmée en 1977 par l'équipe de Stefano Schiaffino qui a montré une accumulation de structure ressemblant aux cavéoles suite à une inhibition de la formation des tubules-T (Schiaffino et al. 1977). Par la suite, il a été montré que la membrane des tubules-T était enrichie en cholestérol (Hidalgo et al. 1983). Et en 1991 Yvan et son équipe ont décrit une composition de la membrane des tubules-T similaire à celle des cavéoles (Yuan, Arnold, et Jorgensen 1991). En 1984 il a été montré dans des muscles soléaires de rat en régénération précoce que les tubules-T étaient associés à des éléments cavéolaires (Miike et al. 1984). En 1991, les observations par microscopie électronique de muscles de souris par Clara Franzini-Armstrong ont montré une association des cavéoles à l'entrée des tubules-T au niveau de la membrane plasmique, une agrégation des complexes de 6 à 20 cavéoles ouverts vers l'extérieur et des agrégats de simili-cavéoles connectés aux tubules-T en intracellulaire

(Franzini-Armstrong 1991). La même année Bernard Flucher et ses collègues ont émis l'hypothèse que la formation des tubules-T serait la combinaison de deux modèles. Des tubes connectés au sarcolemme se développeraient longitudinalement et potentiellement grâce aux cavéoles pour se connecter plus tardivement au cours de la différenciation avec un compartiment interne différent du sarcolemme qui permettrait de donner son organisation transversale au tubule-T (Flucher et al. 1991).

En 1997 une observation précise des cavéoles musculaires a été entreprise par l'équipe de Rob Parton qui a montré qu'au cours de la différenciation de la lignée de cellules musculaires C2C12 en culture Cav-3 apparaît associée à des éléments tubulaires insérés dans la membrane plasmique et marqués avec un anticorps dirigé contre le DHPR. Ils ont donc proposé l'hypothèse que Cav-3 était associée aux précurseurs longitudinaux des tubules-T au début de la différenciation (Parton et al. 1997). Et en effet, une interaction directe entre Cav-3 et la sous-unité  $\alpha_1s$  du DHPR a été démontrée plus tard au niveau du tubule-T de myotubes en culture (Couchoux et al. 2011). Dans les cellules matures Cav-3 est retrouvée au niveau du sarcolemme et s'accumule au niveau du cou de l'invagination des tubules-T.

Les souris n'exprimant pas Cav-3 présentent des défauts d'organisation et de localisation des marqueurs des tubules-T. Les tubules sont dilatés, orientés dans des directions irrégulières et majoritairement longitudinaux (Galbiati et al. 2001) (Figure 22). Alors que ces résultats semblent fortement suggérer que les cavéoles et Cav-3 sont impliqués dans la maturation des tubules-T, le mécanisme par lequel des vésicules de la membrane plasmique s'assemblent pour former un tube n'est toujours pas compris.



**Figure 23. Représentation schématique de l'hypothèse de la biogenèse des tubules-T médiée par les cavéoles.**

Des cavéoles (Cav-3) bourgeonneraient au sarcolemme et seraient rejointes par des protéines impliquées dans la tubulation des membranes telles que Bin1 et la dynamine (1). Le tubule-T immature pourrait croître grâce aux interactions entre Bin1, le cytosquelette d'actine et les microtubules (2). Les protéines de la triade (DHPR, RyR1, Triadine) ainsi que les citernes terminales du RS (ER : réticulum endoplasmique, N : noyau) rejoindraient finalement le tubule-T afin de former la triade mature (3). Le RS pourrait cependant aussi être impliqué dans la croissance du tubule-T par son allongement.

### III.2.2. Une variété de fonctions cavéolaires

Les autres fonctions de Cav-3 et des cavéoles dans le muscle sont variées. En premier lieu elles pourraient permettre le maintien de l'intégrité structurale du sarcolemme. En effet, même si Cav-3 n'appartient pas directement au complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) qui unit le cytosquelette et la matrice extracellulaire et qui confère sa stabilité à la membrane plasmique (Crosbie et al. 1998; Song et al. 1996) de nombreux travaux font état d'un lien important avec les protéines du complexe DGC y compris la dystrophine. Des variations dans le niveau de Cav-3 entraînent une perturbation du DGC et une diminution de l'expression de la dystrophine (Herrmann et al. 2000; Sotgia et al. 2000).

Une fragilisation de la membrane a été décrite dans le cas de mutations dans le gène de Cav-3 ainsi que dans la perte de la cavine 1 (Lo et al. 2015) impliquant une importance du complexe cavéoline-cavine dans la mécano-protection. Une étude dans

des fibres isolées a permis de proposer un modèle de réservoir de membrane dans les cavéoles qui permettrait de protéger la membrane des cellules musculaires au cours des cycles de contraction-relaxation (Lo et al. 2015).

Des modifications dans la régulation de certaines voies de signalisation a aussi été décrite dans le cas de mutations de CAV-3. Ainsi la voie IL6/STAT3 est hyperactivée au repos. Lors d'un stress mécanique, on a donc une surexpression de certains gènes comme MYH8, SOCS3 et ACTC1 associés à la régénération musculaire (Dewulf et al. 2019).

Cav-3 est aussi impliquée dans le maintien de l'homéostasie du glucose dans le muscle. En effet une surexpression de Cav-3 entraîne une activation de la réponse à l'insuline, Cav-3 est impliquée dans la translocation du récepteur à l'insuline dans le cytosol et les souris n'exprimant pas Cav-3 présentent un phénotype de résistance à l'insuline (Oshikawa et al. 2004).

Les cavéoles et protéines les constituant (Cav-3, cavine 1, cavine 4) semblent donc jouer un rôle important dans la formation du muscle squelettique en particulier dans la différenciation et la biogenèse des structures contractiles. Il semble donc cohérent que des mutations dans ces protéines entraînent différentes pathologies musculaires que je vais présenter par la suite.

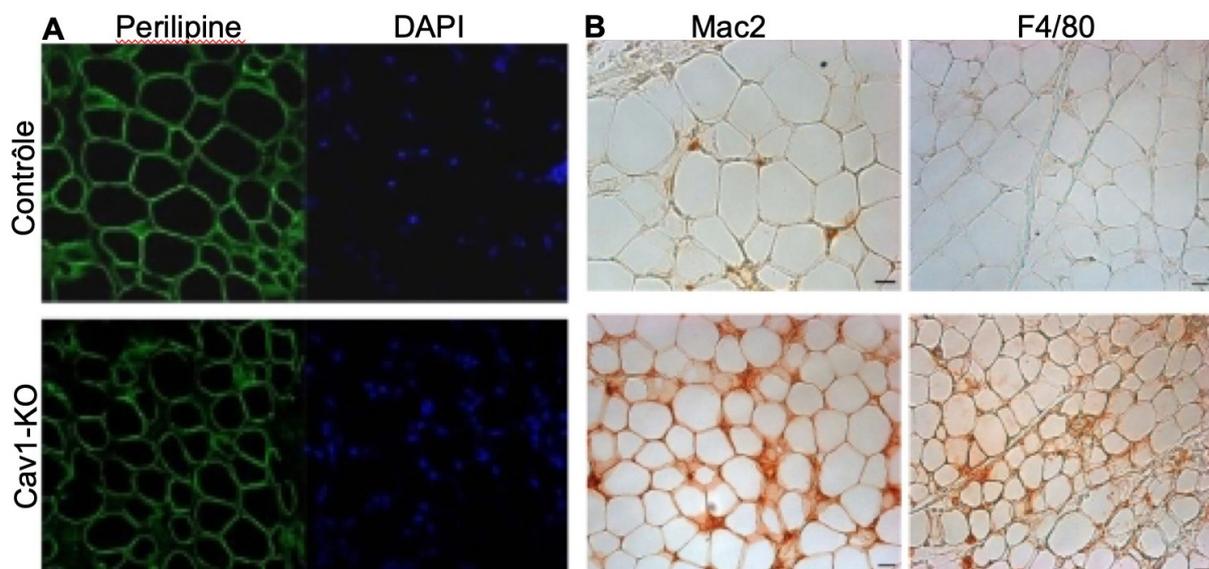
## IV. PATHOLOGIES DES CAVEOLES ET DES TUBULES-T

### IV.1. PATHOLOGIES DES CAVEOLES

#### IV.1.1. En dehors du muscle

##### IV.1.1.1. *Lipodystrophie*

L'importance des cavéoles dans l'homéostasie des lipides ainsi que leur interaction directe avec le cholestérol et de nombreux acides gras expliquent la dérégulation des phénomènes lipidiques en présence de défauts de cavéoles.



**Figure 24. Modification de la composition cellulaire du tissu adipeux chez les souris Cav-1-KO.**

Des coupes de tissu adipeux inguinal de souris WT, Cav-1-KO ont été marquées pour les noyaux avec de la DAPI et pour la périlipine, protéine associée aux gouttelettes de lipides (A) ou avec des marqueurs de surface des macrophages (B). (Adapté de Briand et al. 2011)

Il a été montré, dans les souris n'exprimant pas Cav-1, un tissu adipeux restreint une résistance à l'obésité induite ainsi que des niveaux élevés de triglycérides et d'acides gras libres dans le cytosol (Razani et al. 2002) (Figure 24) ainsi qu'une résistance à l'insuline (Yamamoto et al. 1998) et des défauts de stabilisation du récepteur à l'insuline à la membrane des adipocytes *in vivo* (Cohen et al. 2003).

Les souris n'exprimant pas la cavine 1 présentent un phénotype similaire avec un taux élevé de triglycérides circulants, une réduction drastique du tissu adipeux, une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie (Liu et al. 2008).

Ces défauts sont retrouvés chez les patients dans le cas de mutations dans le gène CAV-1 (Kim et al. 2008; Cao et al. 2008; Schrauwen et al. 2015) et dans le gène de la cavine 1 (Hayashi et al. 2009; Ardissonne et al. 2013).

#### IV.1.1.2. *Défauts vasculaires et pulmonaires*

Les souris n'exprimant pas Cav-1 ou la cavine 1 présentent aussi des dysfonctionnements vasculaires. Par exemple elles développent des troubles dans la vasodilatation et la vasorelaxation artérielle, sûrement dus à une augmentation de l'activité de eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) qui est habituellement inhibée par Cav-1 (Razani et al. 2001). Elles voient aussi leur angiogenèse diminuée. Cela serait dû à une dérégulation de la voie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) habituellement associée à Cav-1 (Woodman et al. 2003).

Des défauts peuvent aussi apparaître en cas de surexpression de ces protéines cavéolaires. Ainsi une surexpression de Cav-1 entraîne de l'athérosclérose probablement due à l'inhibition de l'activité de eNOS et donc à une diminution de la production de NO (Kuhlencordt et al. 2001), et à une augmentation de l'expression de VCAM (*vascular cell adhesion molecule*) induisant une inflammation.

La suppression de Cav-1 dans les tissus de souris induit aussi des défauts pulmonaires dus à une hyper-prolifération des cellules et donc à la présence d'un septum alvéolaire plus épais (Razani et al. 2001). Cela induit aussi une initiation de fibrose pulmonaire (Drab et al. 2001). Les patients présentant des mutations dans le gène CAV-1 démontrent aussi une hypertension pulmonaire (Austin et al. 2012; Schrauwen et al. 2015; Han et al. 2016).

#### IV.1.1.3. *Cancer*

Les cavéoles ont aussi été indirectement liées à de nombreuses autres pathologies en particulier les cancers (Figure 25). Les cavéoles et Cav-1 sont impliquées dans des cancers de par leur association avec des processus tels que la

transformation cellulaire, la tumorigenèse, la migration et l'invasion cellulaire, l'angiogenèse et la résistance à certains traitements.

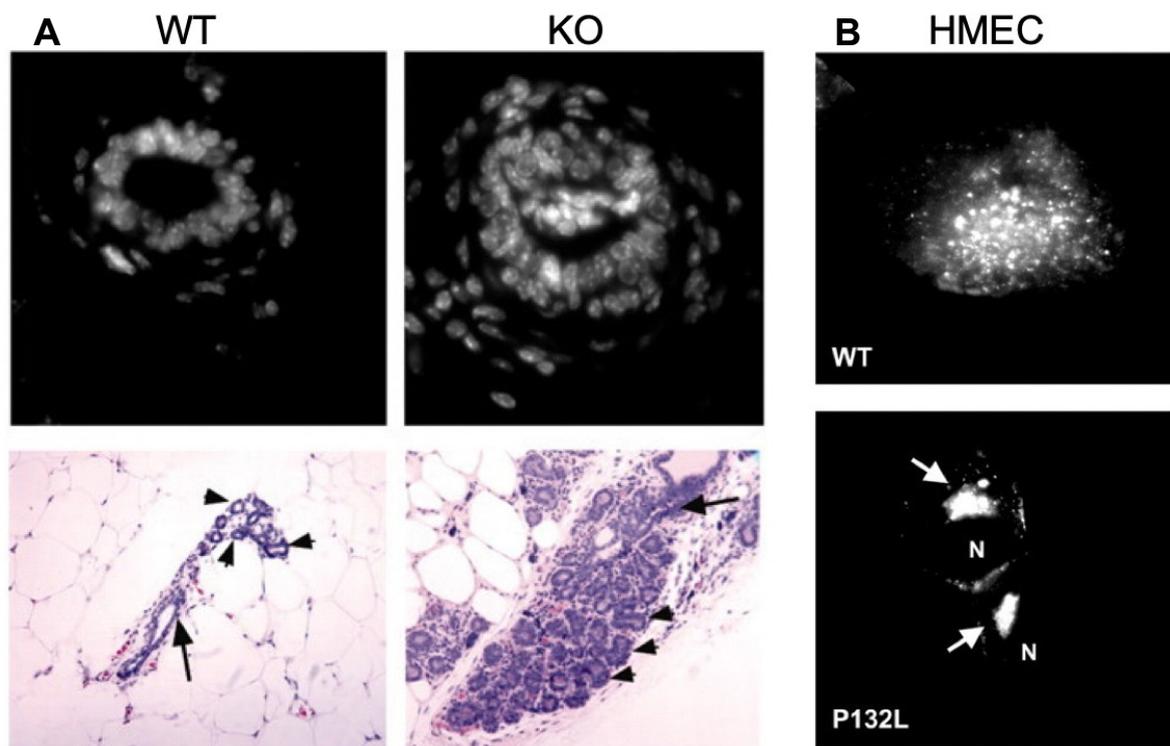
Il semble que l'expression de Cav-1 puisse rester inchangée, être surexprimée ou réduite en fonction des types de cellules tumorales. On ne sait donc pas bien si son rôle est bénéfique ou néfaste. C'est-à-dire si Cav-1 est un suppresseur tumoral ou un oncogène.

Étant très souvent supprimée dans de nombreux cancers humains tels que celui du sein, rein, prostate, cou, ovaires et colon, Cav-1 pourraient être un suppresseur tumoral. En effet certains oncogènes tels que Src, Ras et Bcr-Abl réduisent l'expression de Cav-1. Dans le mutant dominant négatif Cav-1 P132L aucunes cavéoles ne sont observées à la membrane suite à la rétention de la cavéoline à l'appareil de Golgi entraînant une régulation à la hausse des voies de signalisations EGF et MAPK (Hayashi et al. 2001). Cette mutation semble se retrouver dans certains cancers (Hayashi et al. 2001), bien que ce résultat soit controversé (Lacroix-Triki, Geyer, et Reis-Filho 2010). De plus, une réduction de Cav-1 dans des fibroblastes NIH-3T3 entraîne la formation de tumeurs dans des souris immunodéficientes suite à l'hyperactivation de la voie p42/44 MAPK (Galbiati et al. 1998). Et dans des souris n'exprimant pas Cav-1, un traitement carcinogénique chimique entraîne la formation de tumeurs épithéliales suite à une surexpression de la cycline D1, régulatrice du cycle cellulaire, une hyperactivation de la voie ERK1/2, impliquée dans la division, la croissance et la prolifération cellulaire, ainsi qu'une prolifération de l'épiderme (Capozza et al. 2003).

Au contraire, la surexpression de Cav-1 dans d'autres types tumoraux tels que cancers de la vessie, de l'œsophage, de la thyroïde, suppose un rôle oncogène.

L'expression de Cav-1 entraîne une augmentation de la migration et invasion des cellules (Figure 25). En effet, Cav-1 empêche l'inactivation de Rab5 par le recrutement de la PI3 kinase qui habituellement active la Rab5 GTPase qui elle-même active Rac1 qui accélère la migration, l'invasion et l'adhésion tumorale (Díaz et al. 2014). La cavéoline 1 peut aussi promouvoir la migration et l'invasion cellulaire en régulant l'adhésion focale des cellules grâce à la phosphorylation dépendante de Src de sa tyrosine 14 (Joshi et al. 2008). Différentes études ont montré une régulation à la

hausse de l'expression de Cav-1 pendant la métastase. Ainsi les cellules métastatiques de cancer de la prostate chez les souris surexpriment Cav-1 comparé à l'expression dans la tumeur primaire (Yang et al. 1998). L'expression de Cav-1 dans les cellules de cancer du sein est associée à une diminution de la survie (Pinilla et al. 2006). L'expression de Cav-1 est aussi corrélée à des métastases dans les cancers de l'œsophage (Kato et al. 2002), du rein (Joo et al. 2004), et l'adénocarcinome du poumon (Ho et al. 2002).



**Figure 25. Mutations de Cav-1 (KO et P132L) cancer du sein.**

(A) Hyperplasie de l'épithélium mammaire. Les souris femelles vierges Cav-1(-/-) KO présentent une hyperplasie épithéliale mammaire significative même à l'âge de 6 semaines. L'hyperplasie des cellules épithéliales mammaires est considérée comme une lésion mammaire pré-maligne. Cav-1 (P132L), une mutation associée aux cancers du sein humains. Des cellules épithéliales mammaires humaines (HMECs ; immortalisées avec la télomérase) ont été transduites de façon stable avec des formes épitope-tagguées de Cav-1 WT ou Cav-1 (P132L). L'immunomarquage révèle que le mutant Cav-1 (P132L) est retenu de manière intracellulaire, au niveau du complexe de Golgi. Des expériences supplémentaires ont révélé que Cav-1 (P132L) se comporte de manière dominante-négative, provoquant l'accumulation intracellulaire de Cav-1 de type sauvage (Adapté de Lee 2002).

#### IV.1.2. Cavéolinopathies

##### IV.1.2.1. *Un gène pour différentes pathologies*

Les cavéolinopathies sont une famille de maladies neuromusculaires dues à des mutations dans le gène CAV-3. La vaste majorité de ces maladies sont autosomiques dominantes et six sont récessives (Gazzerro et al. 2010). Il a été décrit 24 mutations faux-sens, 1 insertion, 3 délétions de quelques nucléotides, 1 macro délétion et 1 substitution au niveau d'un site d'épissage (Gazzerro et al. 2010) (Figure 26).

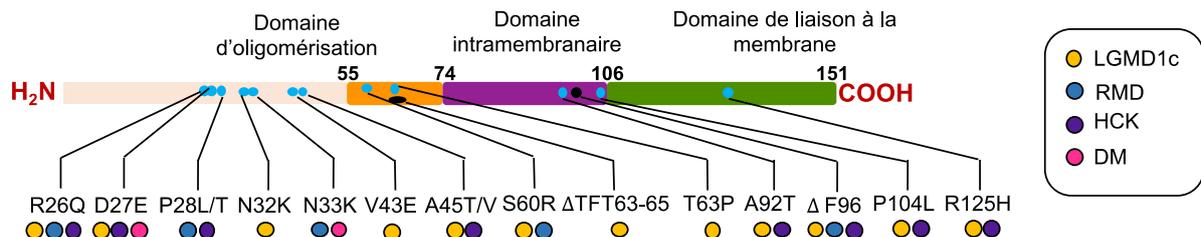
Ces mutations peuvent donner lieu à quatre pathologies neuromusculaires différentes ; la dystrophie musculaire des ceintures de type 1c (de l'anglais *Limb girdle muscular dystrophy* LGMD1c), la maladie des muscles ondulants (de l'anglais *Rippling muscle disease* RMD), une hyperCKémie et une myopathie distale (Woodman et al. 2004). Chez les patients il n'y a pas de lien entre le génotype et le phénotype. Pour un génotype identique au sein d'une même famille les patients peuvent avoir des phénotypes hétérogènes. De plus une accumulation de plusieurs phénotypes est possible pour une seule mutation. Les scientifiques parlent donc de *continuum clinique* (Kubisch et al. 2003). Cependant les fibres musculaires présentent toujours une réduction de l'expression de Cav-3 (Gazzerro et al. 2011) Les phénotypes et les mutations associées sont présentés dans le Tableau 1.

La dystrophie musculaire des ceintures de type 1C (LGMD1c) fait partie du groupe des dystrophies musculaires des ceintures, maladies caractérisées par une faiblesse musculaire progressive principalement des muscles des ceintures scapulaire ou pelvienne (Gazzerro et al. 2010). La première description d'une LGMD1c associée à un défaut de Cav-3 date de 1998 quand Minetti et son équipe ont rapporté des patients affectés provenant de deux familles non-liées (Minetti et al. 1998).

La maladie des muscles ondulants est une maladie neuromusculaire rare caractérisée par une hyperirritabilité du muscle suite à un étirement ou un mouvement. Les patients présentent des contractions musculaires spontanées, une rigidité et une hypertrophie musculaire fréquemment associés à des niveaux de Créatine-Kinase élevés dans le sérum (Gazzerro et al. 2010).

Phenotype	Symptomes	Mutation	References	Domaines
<b>LGMD1c</b>	- Muscles pelviens	R26Q	(Figarella-Branger et al. 2003)	Domaine N-term  Domaine d'oligomérisation  Domaine de liaison à la membrane
		D27E	(Fischer et al. 2003)	
		N32K	(Sugie et al. 2004)	
	- Myalgie	A45T	(Herrmann et al. 2000)	
		K37X	(Müller et al. 2006)	
	- Faiblesse musculaire	V43E	(Sugie et al. 2004)	
		G55S	(McNally et al. 1998)	
	- Hypertrophie des mollets	T63P	(Matsuda et al. 2001)	
		S60R	(Fulizio et al. 2005)	
		ΔTFT63-65	(Carlo Minetti et al. 2002)	
		C71W	(McNally et al. 1998)	
	- Crampes après exercice	A92T	(Traverso et al. 2008)	
		P104L	(Carlo Minetti et al. 2002)	
	- HCK	T77M	(Traverso et al. 2008)	
ΔF96		(Cagliani et al. 2003)		
R125H		(de Paula et al. 2001)		
<b>RMD</b>	- Hyper-irritabilité musculaire	R26Q	(Vorgerd et al. 2001)	Domaine N-term
		D27E	(Fischer et al. 2003)	
		P28T	(Van den Bergh et al. 2004)	
		A45T	(Betz et al. 2001)	
		A45V	(Betz et al. 2001)	
		E46K	(Kubisch et al. 2003)	
		E46A	(Lorenzoni et al. 2007)	
	Hypertrophie	S52G	(Dotti et al. 2006)	Domaine d'oligomérisation  Domaine de liaison à la membrane
		W70X	(Ueyama et al. 2007)	
		L85P	(Kubisch et al. 2003)	
		A92T	(Kubisch et al. 2003)	
		ΔF103_F104	(Bae et al. 2007)	
		P104L	(Betz et al. 2001)	
		ΔF96	(Cagliani et al. 2003)	
R125H	(de Paula et al. 2001)			
<b>HCK</b>	- HCK	R26Q	(Carbone et al. 2000)	Domaine N-term
		P28L	(Merlini et al. 2002)	
		N33K	(Fulizio et al. 2005)	
		V56M	(Reijneveld et al. 2006; Alias et al. 2004)	Domaine d'oligomérisation
		S60R	(Fulizio et al. 2005)	
		T77K	(Traverso et al. 2008)	Domaine de liaison à la membrane
		T77M	(Alias et al. 2004)	
		ΔF96	(Cagliani et al. 2003)	
<b>DM</b>	- Muscles distaux	D27E	(Fischer et al. 2003)	Domaine N-term
	- Faiblesse musculaire			
	- HCK			

**Tableau 1. Mutations de Cav-3 et pathologies musculaires associées.**  
(Adapté de Gazzero et al. 2010)



**Figure 26. Mutations de Cav-3 et maladies musculaires associées.**

Représentation schématique de la localisation des mutations référencées dans la protéine Cav-3. Chaque mutation peut être associée à un ou plusieurs phénotypes : LGMD1c, RMD, HCK et DM (Adapté de Parton et del Pozo 2013).

L'hyperCKémie est par définition la présence d'une concentration trop élevée de créatine kinase (CK) dans le sérum. La CK est essentielle pour la production d'énergie au sein du muscle puisqu'elle catalyse la créatine et l'ATP (adénosine triphosphate) pour former la phosphocréatine et l'ADP (adénosine diphosphate) (Silvestri et Wolfe 2019). Une élévation de sa concentration dans le sérum témoigne d'une détérioration du muscle.

Le terme de myopathies distales (MD) est réservé à des myopathies non identifiables par un autre élément spécifique. Elles recouvrent un groupe hétérogène d'affections musculaires d'origine génétique ayant en commun un début clinique caractérisé par une faiblesse des muscles distaux des membres supérieurs et/ou inférieurs.

Les patients développent les symptômes des cavéolinopathies au cours de leurs 20 premières années. Ils peuvent présenter une faiblesse musculaire progressive, proximale et symétrique, une hypertrophie des mollets, des douleurs ou des raideurs musculaires après exercice, une hyperirritabilité musculaire, une ondulation musculaire ainsi que des niveaux de créatine kinase élevés dans le sérum (Gazzerro et al. 2011). Ils sont aussi régulièrement positifs au signe de Gower qui témoigne de la diminution du recrutement volontaire d'unités motrices au cours de la contraction de la musculature proximale des membres inférieurs (Pearce 2000).

Un diagnostic de ces patients est possible en recherchant une insuffisance de Cav-3 dans des biopsies musculaires, en réalisant une analyse génétique et en montrant des mutations.

IV.1.2.2. *Différents phénotypes associés*

Nombres de phénotypes sont observés dans les fibres musculaires en fonction des différentes mutations (Figure 27). La majorité des génotypes étant autosomiques dominants il faut garder en mémoire que la moitié de la quantité de Cav-3 disponible est normale (WT de l'anglais *wild-type*).

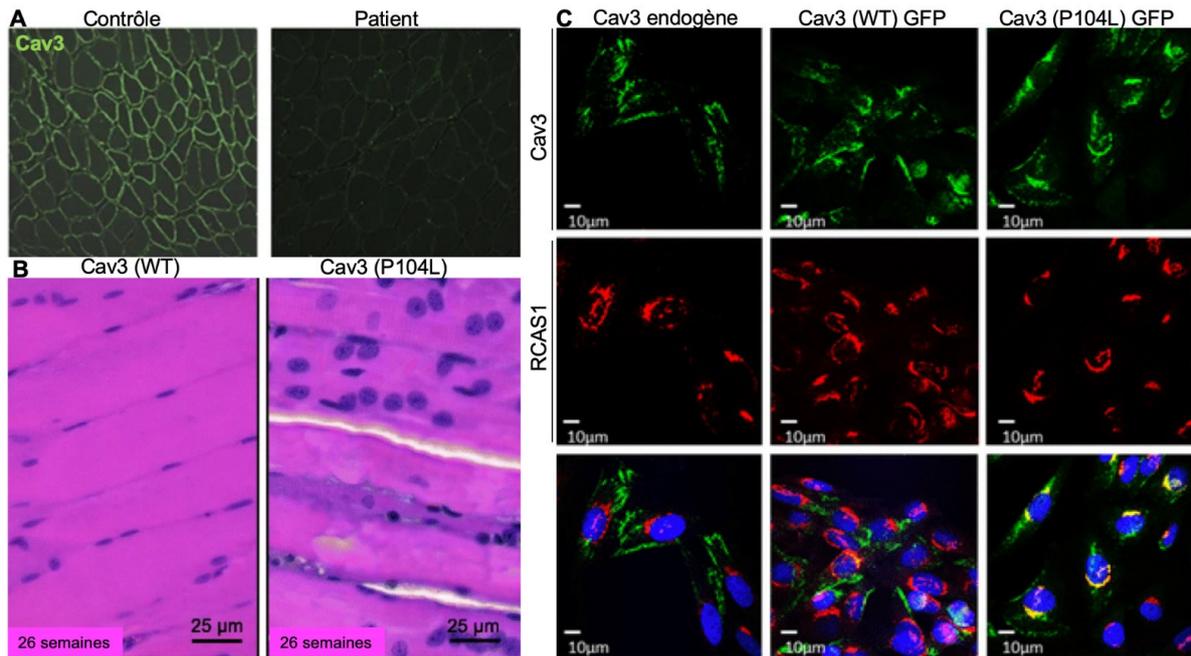
Cependant, toutes les mutations entraînent une diminution du nombre de cavéoles au sarcolemme (Figure 27), la formation de grandes vacuoles et une structure en nids d'abeille visible en microscopie électronique témoignant d'une prolifération anormale des tubules-T (Minetti et al. 2002).

Certaines mutations (P104L,  $\Delta$ TFT63-65, R26Q, T77K) entraînent une agrégation et une rétention de Cav-3 au niveau de l'appareil de Golgi, ainsi qu'un mauvais adressage à la membrane plasmique (Galbiati et al. 1999) (Figure 27). En s'oligomérisant avec la Cav-3 WT, la Cav-3 mutée entraîne aussi sa rétention au Golgi suivi de son ubiquitination et de sa dégradation, expliquant la diminution du nombre de cavéoles au sarcolemme (Galbiati et al. 1999). Le mutant  $\Delta$ TFT63-65 réduit l'adressage membranaire de la protéine kinase Src, entraînant son accumulation en périnucléaire et induisant l'apoptose (Smythe et al. 2003). Chez les patients atteints de LGMD1c et dans les modèles de souris P104L et  $\Delta$ TFT63-65 les mutations de Cav-3 entraîne une délocalisation de la dysferline. Normalement située à la membrane en interaction avec Cav-3 qui inhibe son endocytose, elle s'accumule dans ce cas dans le cytoplasme ou irrégulièrement à la membrane plasmique (Hernández-Deviez et al. 2006). Le modèle de souris P104L présente quant à lui une suractivation de la voie de signalisation des myostatines, régulant la balance atrophie/hypertrophie par une augmentation de la phosphorylation de Smad 2/3 (Sunada et al. 2001). La membrane des myotubes issus de patients cavéolinopathiques se trouve fragilisée par la réduction de l'efficacité de la mécano-protection par les cavéoles (Sinha et al. 2011; Dewulf et al. 2019).

Les souris Cav-3 KO n'ont pratiquement pas de cavéoles à la membrane des fibres musculaires et présentent des légers signes de dystrophie musculaire ainsi que des défauts d'organisation des tubules-T (Galbiati et al. 2001) (Figure 28). Leurs cellules

musculaires présentent aussi une adiposité accrue et elles sont résistantes à l'insuline (Capozza et al. 2005).

Dans le cas d'une surexpression de Cav-3 dans des souris on observe une augmentation du taux de créatine Kinase (CK) dans le sérum liée à la dégénération et à la nécrose du muscle, phénotype qui pourrait être dû à la régulation négative accrue de la dystrophine par Cav-3 (Sotgia et al. 2000; Herrmann et al. 2000).



**Figure 27. Mutations de CAV-3 dans le muscle squelettique.**

**(A)** Les mutations de CAV-3 entraînent une diminution sévère de l'expression et de la localisation membranaire de Cav-3. Des sections congelées de la biopsie de muscle squelettique d'un patient représentatif et d'un contrôle apparié à l'âge ont été préparées et immunomarquées avec des anticorps spécifiques contre Cav-3. Dans le muscle témoin, Cav-3 présente un motif uniforme au niveau du sarcolemme. Chez le patient, Cav-3 est nettement réduite. (Adapté de Traverso et al. 2008)

**(B)** Une coloration H&E révèle un aspect largement normal du muscle quadriceps de type sauvage à l'âge de 26 semaines, comparé au muscle quadriceps d'un animal transgénique présentant une variabilité du calibre des fibres musculaires et des noyaux de fibres musculaires internalisés. (Adapté de González Coraspe et al. 2018).

**(C)** L'expression de la mutation Cav-3 dans la dystrophie musculaire des ceintures-1C (P104L) localise Cav-3 au Golgi. (Adapté de Shah et al. 2020)

#### IV.1.2.3. *Phénotypes cardiaques*

Les patients présentant une mutation P104L souffrent de cardiomyopathie (Ohsawa et al. 2004) et en effet dans les modèles animaux des défauts cardiaques ont été observés. Woodman et ses collègues ont montré dans des souris KO Cav-3 une hypertrophie, une dilatation, et une fibrose cardiaques ainsi qu'une hyperactivation de la voie p42/44 MAPK impliquée dans la réparation tissulaire (Woodman et al. 2002).

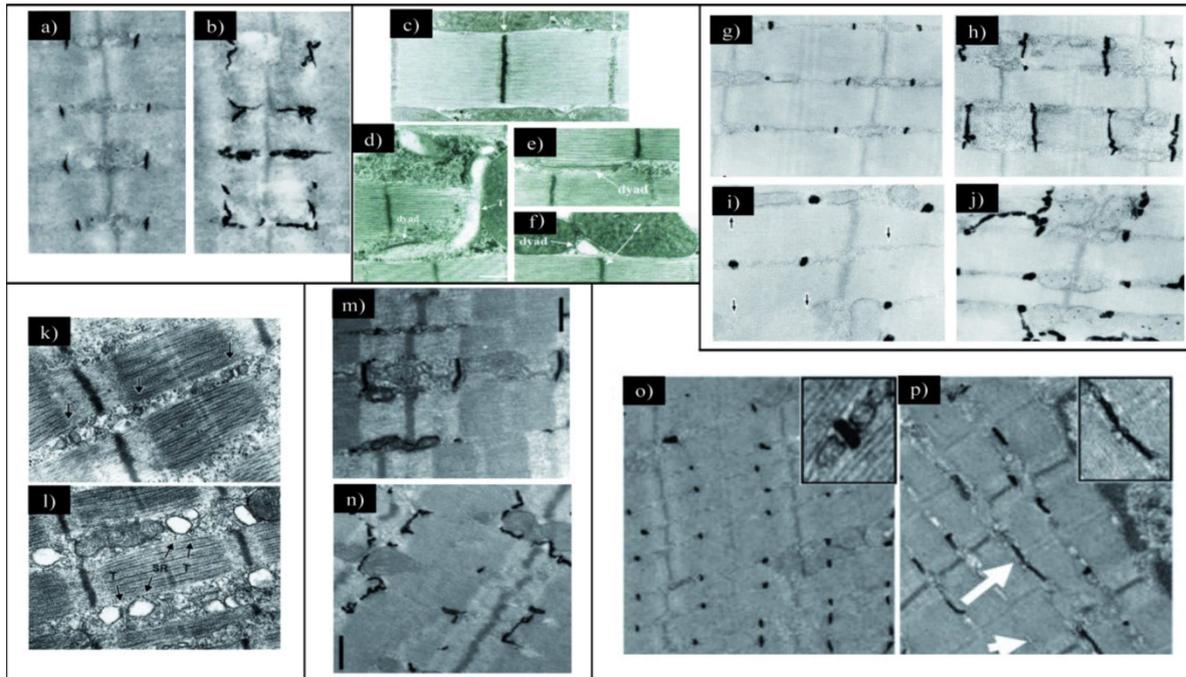
Une surexpression de Cav-3 chez le rat entraîne une inhibition de l'hypertrophie cardiaque alors que la sous-expression de Cav-3 entraîne l'hypertrophie (Koga et al. 2003). Dans le cœur, les cavéoles auraient donc une fonction de centre de contrôle de l'hypertrophie (Kikuchi et al. 2005).

#### IV.1.3. Maladies musculaires des cavéoles sans mutation dans CAV-3

Des mutations dans les protéines accessoires comme les cavines peuvent être à l'origine de phénotypes semblables aux cavéolinopathies car elles entraînent des défauts dans la formation des cavéoles et dans leur stabilisation et donc une diminution de la quantité globale de Cav-3 dans les fibres musculaires.

Hayashi et son équipe ont montré dans des biopsies de patients exprimant de la cavine 1 mutée une réduction drastique de l'expression de Cav-3. En effet, la cavine 1 mutée perd sa capacité d'association à Cav-3 et entraîne donc le démantèlement des cavéoles à la membrane, ce qui comme dans le cas de cavéolinopathies entraîne par exemple des dérégulations de la voie de signalisation des myostatines ou la dégradation de la Cav-3 par le protéasome (Hayashi et al. 2009).

De même, la cavine 4 semble avoir un rôle important dans le muscle strié. Sa surexpression dans la souris entraîne des défauts cardiaques ainsi que la présence de cavéoles plus larges (Ogata et al. 2008; 2014), et des mutations dans la cavine 4 sont impliquées dans des cardiomyopathies (Rodriguez et al. 2011).



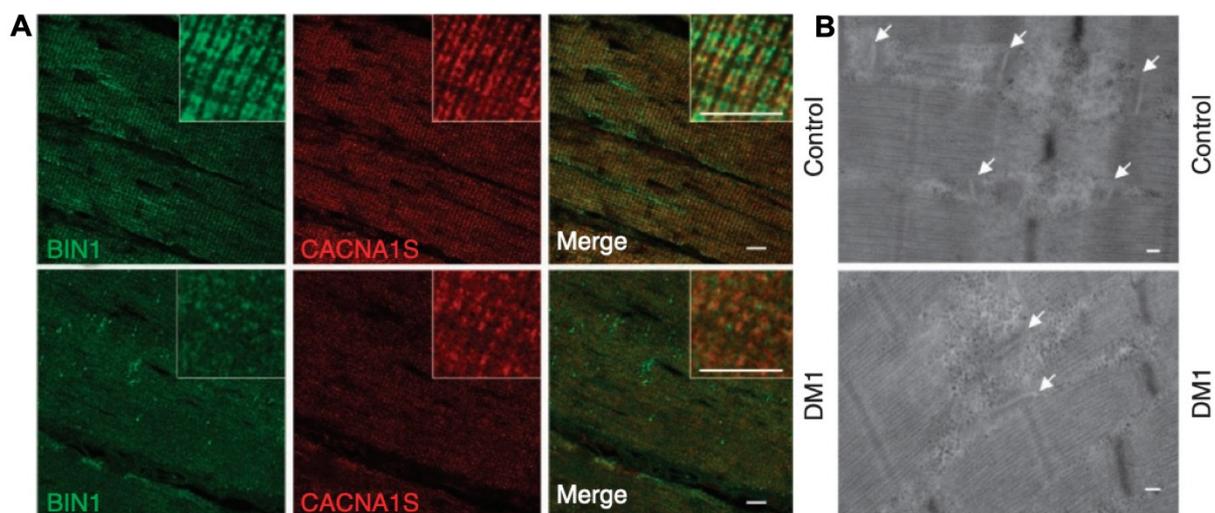
**Figure 28. Défauts d'organisation des tubules-T dus à des défauts d'expression des protéines impliquées dans l'organisation des triades dans le muscle squelettique.**

(a) Image de microscopie électronique montrant un muscle murin WT traité au ferrocyanate (coloration noire des tubules-T). (b) Image de microscopie électronique montrant un muscle traité au ferrocyanate d'une souris déficiente en Cav-3 (cavéoline 3). L'apparence et l'orientation des tubules-T sont modifiées (Galbiati et al. 2001). (c) Image de microscopie électronique d'un muscle normal de drosophile. Les dyades sont localisées à proximité de la ligne Z (comme chez les vertébrés). (d à f) Images au microscope électronique d'une drosophile sans Bin1 montrant une altération des tubules-T résultant en (d) une mauvaise localisation, (e) des tubules longitudinaux et (f) des tubules dilatés (Razzaq et al. 2001). (g à j) Images de microscopie électronique de muscles murins traités au ferrocyanate (g et h) de type sauvage et (i et j) de souris sans MG29 (mitsugumin 29), démontrant les altérations de l'organisation des tubules-T. On remarque l'absence de (i) tubules-T ou (j) d'orientation longitudinale (Nishi et al. 1999). (k et l) Images de microscopie électronique de muscles squelettiques de souris (k) de type sauvage et (l) de souris n'exprimant pas JPH1 (junctophiline) montrant les triades altérées avec des RS gonflés (Komazaki et al. 2002). (m et n) Images de microscopie électronique de muscles murins traités au ferrocyanate provenant (m) de souris de type sauvage et (n) de souris n'exprimant pas Dysf (dysferline), montrant une organisation anormale du système de tubules-T (Klinge et al. 2010). (o et p) Images de microscopie électronique de muscles traités au ferrocyanate de (o) souris de type sauvage et (p) de souris n'exprimant pas Mtm1 (myotubularine) révélant une altération sévère de l'organisation des tubules-T. On remarque l'absence (tête de flèche) ou l'orientation longitudinale (flèche) des tubules-T (Al-Qusairi et al. 2009). (Adapté de Al-Qusairi et Laporte 2011)

## IV.2. AUTRES PATHOLOGIES DES TUBULES-T

### IV.2.1. La dystrophie myotonique

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie neuromusculaire caractérisée par une myotonie, une faiblesse musculaire progressive, une atrophie, des défauts cardiaques ainsi que des troubles cognitifs. Des répétitions CUG et CCUG dans l'ARNm du gène *DMPK* (*DM1 protein kinase*) entraîne la séquestration de MBNL1 (de l'anglais *muscleblind like splicing regulator*) une protéine impliquée dans l'épissage des ARNm (Miller et al. 2000). MBNL1 ne peut donc plus se fixer au pré-ARNs dont celui de Bin1 et son épissage est modifié. Le défaut d'épissage de Bin1 entraîne des défauts dans sa liaison au phosphatidylinositol 3 phosphate et son incapacité à tubuler les membranes (Fugier et al. 2011).



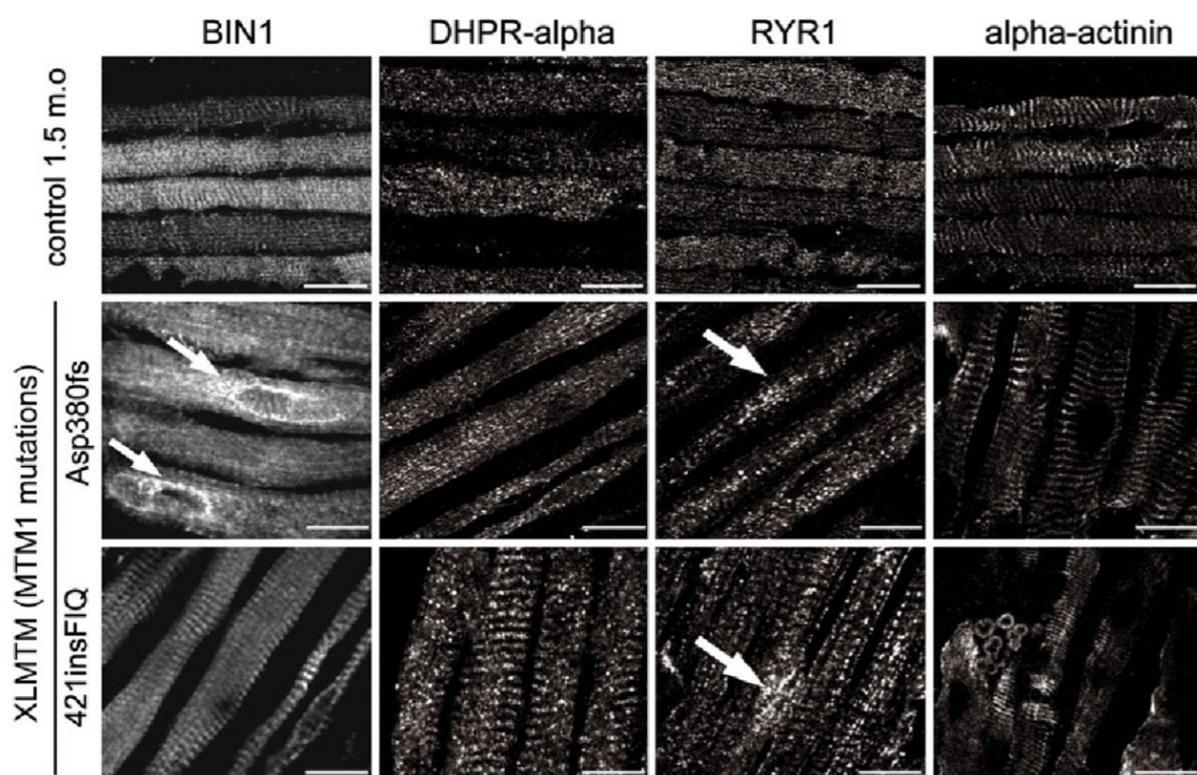
**Figure 29. Défauts dans l'organisation des triades et des tubules-T dans les muscles de patients atteints de DM1.**

(A) Images de microscopie confocale représentant le marquage par immunofluorescence de BIN1 et CACNA1S (DHPR) dans des sections longitudinales de muscles squelettiques d'un individu témoin et d'un adulte atteint de DM1 d'un âge similaire. En inserts, grossissements plus importants des localisations de BIN1 et CACNA1S. Barres d'échelle, 10  $\mu$ m. (B) Images de microscopie électronique de sections longitudinales de muscles squelettiques d'un adulte atteint de DM1 et d'un individu témoin. Les flèches blanches indiquent les structures des tubules-T. Barres d'échelle, 100 nm. (Adapté de Fugier et al. 2011)

On retrouve dans les fibres musculaires de patients des tubules-T altérés (Figure 29). De même dans le modèle murin de la DM1 l'orientation et l'organisation des tubules-T est déficiente. Dans les cellules musculaires humaines en culture une restauration de Bin1 permet de récupérer une bonne organisation des structures contractiles (Fugier et al. 2011).

IV.2.2. La myopathie centronucléaire

La myopathie centronucléaire (CNM) est une maladie musculaire caractérisée par une faiblesse musculaire et une centralisation des noyaux dans les fibres musculaires non liée à la régénération musculaire. Des mutations dans trois gènes différents sont connues pour être à l'origine des différentes formes de CNM. Elle est récessive liée à l'X dans le cas de mutations dans les gènes *MTM1*, autosomique dominante dans le cas de mutations dans le gène *DNM2* et autosomique récessive dans le cas de mutations dans *BIN1*.



**Figure 30. Défauts de BIN1 et de T-tubules/triades dans la myopathie centronucléaire.**

Immunolocalisation de Bin1, DHPR- $\alpha$ , RYR1, et  $\alpha$ -actinine dans des biopsies musculaires des patients avec des mutations dans *MTM1* par rapport au contrôle (1,5 mois). Bin1 est détecté mais mal localisé autour des noyaux centraux (flèches blanches) dans les muscles mutés par *MTM1*. L'organisation de la ligne Z semble normale, tandis que l'organisation des marqueurs de triade est anormale avec quelques accumulations (flèches blanches). Images confocales : barre d'échelle 10  $\mu$ m (Adapté de Toussaint et al. 2011).

*MTM1* (myotubularin 1) est une protéine permettant la déphosphorylation en position 3 des phosphoinositides, phosphoinositide-3-monophosphate (Blondeau et al. 2000) et phosphoinositide-3,5-biphosphate (Schaletzky et al. 2003) cruciaux dans plusieurs étapes clé du trafic membranaire intracellulaire, de la croissance et de la différenciation cellulaire (Laporte et al. 1996; Laporte et al. 2003) (Figure 30). *DNM2* est le gène

codant pour la protéine dynamine 2, une large GTPase avec un rôle bien établi dans l'endocytose, le trafic membranaire, l'assemblage de l'actine et les fonctions du centrosome (Bitoun et al. 2005).

Les mutations dans le gène *BIN1* perturbent la tubulation des membranes et empêchent son interaction avec la dynamine 2 et donc son recrutement à la membrane plasmique. Nicot et ses collègues ont étudié Bin1 dans le cas de la CNM à cause de son implication dans le remodelage de la membrane, sa régulation par les phosphoinositides, et son rôle dans l'organisation des tubules-T. En effet, ceux-ci sont altérés dans la CNM. Ils ont montré que les mutations interféraient avec le remodelage des tubules-T et des membranes endocytiques ainsi qu'une augmentation du marquage Cav-3 et DHPR et des vacuoles anormales de Cav-3 en intracellulaire (Nicot et al. 2007).

Le tubule-T est donc une structure essentielle au bon fonctionnement musculaire et sa mise en place au cours du développement précoce nécessite d'être étudié en détails.

## V. OBJECTIFS DE LA THESE

---

L'objectif général de ma thèse a été de comprendre le lien mécanistique entre les cavéoles et la formation des tubules-T. Pour cela, j'ai utilisé des cellules musculaires saines et des cellules de patients extensivement différenciées afin de pousser la différenciation musculaire le plus loin possible.

Les tubules-T sont des structures musculaires spécialisées dans la propagation des potentiels d'action au cœur de la fibre musculaire, et donc essentiels dans le couplage excitation-contraction du muscle. Bien que leur composition et leur rôle soit précisément décrit dans les fibres musculaires matures, la biogenèse des tubules-T reste à ce jour incomprise. De nombreuses protéines telles que la cavéoline 3, Bin1, la dysferline, les mitsugumines etc ont été décrites comme pouvant participer au processus mais on ne comprend toujours pas comment ces protéines s'articulent et les étapes essentielles à la formation d'un tube capable de transmettre le potentiel d'action en profondeur de la fibre musculaire.

Dans ce travail je me suis focalisée sur deux protéines majeures, Cav-3 comme composante des cavéoles, et Bin1 comme protéine capables de tubuler les lipides membranaires et de former des tubes. En effet l'importance de ces protéines dans la physiologie du muscle squelettique est soulignée par le fait que des mutations dans le gène CAV-3 sont mises en cause dans une famille de maladies neuromusculaires autosomiques dominantes appelées cavéolinopathies (Han et al. 2016) et que des mutations de BIN1 induisent des défauts de tubules-T et de triades dans la myopathie centronucléaire (Nicot et al. 2007) alors que des défauts d'épissage dans l'exon responsable de l'interaction de BIN1 avec les membranes induisent des défauts de tubules-T dans la dystrophie myotonique (Fugier et al. 2011).

Ma thèse est divisée en deux parties. La première partie avait pour but de mettre au point pour la première fois en France une technique de microscopie corrélative afin d'analyser la localisation ultrastructurale de nombreuses protéines connues (ou suspectées) d'appartenir aux cavéoles et aux tubules-T. Cette technique est décrite en détails dans la partie Matériel et Méthodes. Nous avons ensuite étudié la nanotopographie des composants cavéolaires au cours de la différenciation des myotubes en disséquant la composition et la localisation des cavéoles dans des

myotubes différenciés *in vitro*. J'ai ensuite utilisé mes observations et la technique de microscopie corrélative afin d'étudier les cavéoles dans la biogenèse des tubules-T dans les myotubes extensivement différenciés. La technique de microscopie corrélative m'a permis de montrer directement que Cav-3 forme de nouvelles structures que j'ai découvertes et que la protéine Bin1 est directement impliquée dans leur formation. L'utilisation d'ARN interférents et de cellules de patients présentant des mutations dans le gène CAV-3 a permis d'étudier l'impact des défauts cavéolaires dans le processus de différenciation et en particulier dans la formation des tubules-T.



---

# MATERIEL ET METHODES

---



## I. CULTURE CELLULAIRE

---

Historiquement, la mise en culture de cellules musculaires a permis de mieux comprendre la physiologie musculaire ainsi que certaines pathologies. Lors de la différenciation des cellules musculaires squelettiques *in vitro* les myoblastes (prolifératifs) cessent de se diviser et fusionnent pour former des myotubes multinucléés exprimant des gènes spécifiques du muscle. Ce processus dépend de la déplétion des facteurs de croissance et du sérum du milieu de culture et montre que la prolifération et la différenciation semble être mutuellement exclusifs (Mohun 1992). Au cours de la maturation des myofibres un réseau de signalisation et de protéines du cytosquelette se met en place. Il est à l'origine de l'organisation des structures musculaires telles que les myofibrilles et les triades qui permettent le couplage excitation-contraction (Falcone et al. 2014). On peut noter également la migration des noyaux à la périphérie des myotubes (Franzini-Armstrong et al. 1986; Flucher et al. 1991; Starr et Fridolfsson 2010; Metzger et al. 2012). Cependant il est aujourd'hui encore difficile de générer des myotubes *in vitro* qui présentent une organisation transversale des tubules transverses couplés au réticulum sarcoplasmique en formant des triades transversales (Flucher et al. 1991; Cooper et al. 2004; Cusimano et al. 2009).

Afin d'étudier la formation des tubules-T au cours de la différenciation il m'a été nécessaire de mettre au point les conditions de culture optimales dans le but d'obtenir des myotubes extensivement différenciés. Pour ce faire, je me suis appuyée sur le protocole développé par l'équipe d'Edgar Gomes (Falcone et al. 2014). J'ai utilisé des cellules satellites murines primaires présentant de nombreux avantages, notamment leur haut potentiel de différenciation qui est crucial pour notre étude des tubules-T et du rôle des cavéoles dans ce processus. J'ai aussi utilisé des myoblastes immortalisés provenant de sujets contrôles sains et de patients présentant les mutations P28L et R26Q dans le gène CAV-3. Ces cellules ont été immortalisées par K. Mamchaoui et A. Bigot à la plateforme d'immortalisation MyoLine du Centre de Recherche. Les ADNc TERT et Cdk4 ont été clonés dans deux vecteurs lentiviraux contenant respectivement des marqueurs de sélection de la puromycine et de la néomycine. Les myoblastes ont été transduits avec les vecteurs lentiviraux TERT et Cdk4 à une multiplicité d'infection (MOI) de 3 à 5 en présence de 4 µg/ml de polybrène (Sigma-Aldrich). Les cultures

cellulaires transduites ont été ensuite sélectionnées par la résistance à la puromycine (0,2 µg/ml) et/ou à la néomycine (0,3 mg/ml) pendant 10 jours. Les cellules transduites ont été ensemencées à la densité clonale et des clones individuels sélectionnés ont été isolés pour chaque population afin d'obtenir la lignée immortalisée.

## I.1. CELLULES PRIMAIRES MURINES

### I.1.1. Préparation des cellules primaires murines

Les muscles des membres postérieurs de souriceaux de 3 jours sont stérilisés rapidement avec de l'éthanol à 70 % puis disséqués et recueillis dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) froid. Ils sont ensuite hachés à l'aide de scalpels. L'échantillon de tissu résultant est immergé dans un mélange de digestion (0,5 mg/mL de collagénase de type 2 (#LS004202 ; Worthington Biochem, USA) et 3,5 mg/mL de dispase (#1105-041 ; Thermo Fisher, France) dans le milieu modifié de Dulbecco Eagle's medium (DMEM) Glutamax (#61965-026 ; Thermo Fisher, France) à 37°C sous agitation pendant 10 minutes. La digestion est arrêtée avec du milieu de dissection (DMEM Glutamax, 50 U/ml de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine, 10% de sérum fœtal bovin (FBS, #10270-106 ; Life Technologies, France)) et la suspension centrifugée à 600 tours par minute (rpm) pendant 5 minutes. Le surnageant contenant les cellules est centrifugé à 1300 rpm pendant 5 minutes, puis remis en suspension dans 1mL de milieu de dissection et stocké sur glace. Les culots sont de nouveau digérés dans le milieu de digestion pendant 10 minutes à 37°C. Cette procédure est répétée au moins 5 fois, jusqu'à ce que le culot de muscle digéré soit réduit et transparent.

Les suspensions cellulaires sont ensuite filtrées à travers un tamis à pores de 40 µm dans un ordre séquentiel inverse ; c'est-à-dire en commençant par la dernière digestion en premier pour éviter l'obstruction du filtre. Puis les cellules sont mises en suspension dans du milieu de dissection et pré-ensemencées sur des boîtes de Pétri de 100mm pendant 4 heures afin de promouvoir la fixation des fibroblastes tout en gardant les cellules musculaires en suspension. Le surnageant du pré-ensemencement est ensuite collecté et centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes, le culot remis en suspension dans du milieu de prolifération : DMEM Glutamax, 50 U/ml

de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine, sérum foetal bovin 10%, Extrait d'embryon de poulet (#CE-650-J ; Seralab, Royaume-Uni) 1%, et ensemencé sur des boîtes de Pétri de 100 mm recouvertes de Matrigel 1:100 (#354234; Corning, France).

Les cellules sont congelées 2 jours après ensemencement dans 90% de sérum foetal bovin (#10270-106 ; Life Technologies, France) et 10% de DMSO (#D2650, Sigma-Aldrich, France).

### I.1.2. Culture des cellules primaires murines

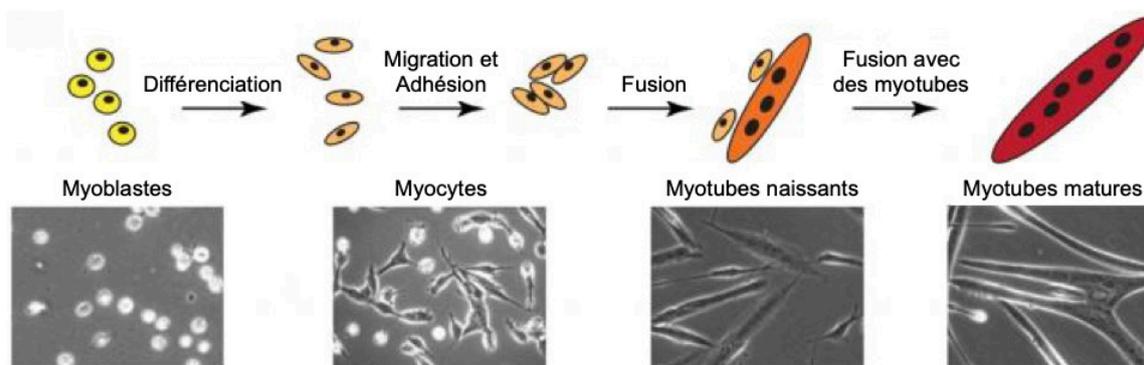
Les cultures de cellules musculaires primaires sont constituées d'un mélange de myoblastes et de fibroblastes en prolifération. Ces cultures ne peuvent se maintenir que quelques passages avant que les myoblastes ne perdent leur capacité de prolifération ou que les fibroblastes ne prennent le relais. Il faut également veiller à maintenir les cultures de cellules musculaires primaires à une densité inférieure à 60 %. Au-delà, les myoblastes commencent à fusionner et à se différencier spontanément en myotubes.

Les myoblastes sont ensemencés à  $25 \cdot 10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$  et sont cultivés à  $37^\circ\text{C}$  et  $5\% \text{CO}_2$  dans du milieu de prolifération sur des boîtes de Pétri de 100mm recouvertes de Matrigel à facteurs de croissance réduits (GFR) à 1:10 (#356231 ; Corning, France). Les boîtes sont préalablement incubées avec le Matrigel pendant une heure à  $37^\circ\text{C}$ , et le surplus est éliminé avant l'ensemencement des cellules.

### I.1.3. Différenciation des cellules primaires

Le but de notre étude est d'étudier la formation de structures apparaissant au cours de la différenciation musculaire. Les myoblastes en culture sont capables de fusionner et de former des myotubes différenciés et plurinucléés (Figure 31). Pour se faire, le milieu de prolifération est remplacé 48h après ensemencement par un milieu de différenciation composé de DMEM Glutamax, de sérum de cheval à 2% (#16050-130 ; Life Technologies, France), de 50 U/mL de pénicilline, de 50 mg/mL de streptomycine. Après 2 jours de différenciation 80ng/mL d'agrine (#550-AG, R&D Systems, USA) sont ajoutés afin d'induire le regroupement des récepteurs de l'acétylcholine et promouvoir ainsi une différenciation plus avancée. De plus, une couche de Matrigel GFR 1:3 est déposée sur les myotubes afin de prévenir leur

détachement dû à leur contraction (Falcone et al. 2014). Les cellules sont extensivement différenciées pendant 9 jours.



**Figure 31. Fusion des myoblastes en culture**  
(Adapté de Abmayr et Pavlath 2012)

## I.2. CELLULES IMMORTALISEES HUMAINES CONTROLES ET MUTEES

Des lignées de myoblastes contrôles et de patients immortalisées (Cav-3 P28L, Cav-3 R26Q) (Tableau 2) sont cultivées dans du milieu de prolifération : 1 volume de M199 (#41150020, Invitrogen, France), 4 volumes de DMEM Glutamax, 20% de sérum bovin fœtal, 50 µg/mL de gentamicine (Life Technologies, France), 25 µg/mL de fœtuine (#10344026 ; Life Technologies, France), 0,5 ng/mL de facteur de croissance des fibroblastes de base (bFGF ; #PHG0026 ; Life Technologies, France), 5 ng/mL de facteur de croissance épidermique humain (hEGF ; #PHG0311 ; Life Technologies, France), 0,2 µg/mL de dexaméthasone (#D4902-100mg ; Sigma, France), 5 µg/mL d'insuline (#91077C-1g ; Sigma, France). Le tableau 2 récapitule les lignées cellulaires utilisées. Les cellules sontensemencées à  $15 \cdot 10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$ .

Lignées	Mutations	Patients	Muscle
AB1079	Contrôle	Homme - 38 ans	Quadriceps
C7304	Contrôle	?	?
Cav69	P28L	Femme	?
Cav62/01	R26Q	Homme	?

**Tableau 2. Lignées de cellules immortalisées utilisées.**

### I.2.1. Différenciation des cellules immortalisées

Les boîtes sont recouvertes de Matrigel GFR 1:100 afin de permettre une longue différenciation (entre 10 et 20 jours). La différenciation est induite 48h après ensemencement en utilisant un milieu de différenciation constitué de DMEM Glutamax, 5% de sérum de cheval, 50µg/mL de gentamicine, complétée par 5µg/mL d'insuline (#91077C-1G ; Sigma, France). Après 2 jours de différenciation 80ng/mL d'agrine (#550-AG, R&D Systems, USA) sont ajoutés.

### I.2.2. Transduction par le vecteur lentiviral Cav-3 GFP

Afin d'étudier au mieux Cav-3 au cours de la différenciation deux lignées de cellules musculaires contrôles AB1079 et C7304 (Tableau 2), ont été utilisées. Elles ont été transduites avec des vecteurs lentiviraux exprimant Cav-3 WT et un gène rapporteur GFP. Les myoblastes ont été transduits avec une MOI de 5, et les cellules ont été congelées 3 jours après transduction dans 90% de SVF (#10270-106 ; Life Technologies, France) et 10% de DMSO (#D2650, Sigma-Aldrich, France).

## I.3. **INACTIVATION DES PROTEINES PAR TRANSFECTION ARN INTERFERENCE**

Afin de diminuer l'expression de gènes cibles nous avons utilisé une stratégie de siARN (petit acide ribonucléique interférent) pour provoquer le *silencing* par ARN interférence des protéines d'intérêt à court terme après le début de la différenciation. Nous avons sélectionné puis séquencé des siARN double brins de 19 nucléotides complémentaires à la séquence de l'ARNm que nous voulons cibler. Ils sont transfectés dans des cellules où le brin guide est transporté dans le RISC (de l'anglais *RNA-induced silencing complex*). Une fois activé, ce complexe de protéines et d'acides nucléiques peut induire le *silencing* du gène en se liant à une séquence cible d'ARNm complémentaire, induisant ainsi son clivage et sa dégradation. Tous les siARN ont été obtenus commercialement (Eurogentec, Belgique). La liste des séquences utilisées se trouve dans l'annexe 2.

La transfection de siRNA est effectuée à l'aide du réactif de transfection Lipofectamine RNAiMax (#13778, Invitrogen, France). Les mélanges sont préparés conformément

au tableau 3. Après 10 secondes d'homogénéisation, les mélanges sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante pour permettre la formation de complexes de transfection (Tableau 3). Les complexes sont ensuite déposés goutte à goutte sur les cellules avant l'ajout du milieu de différenciation. Les myotubes sont cultivés dans leurs conditions normales de croissance, sur une couche de Matrigel 1:10 dans du milieu de différenciation pendant toute la durée de la transfection. Pour une diminution efficace de la quantité des protéines cibles dans les cultures de myotubes, deux traitements successifs de 48 heures par le siRNA sont nécessaires et permettent d'obtenir une diminution de respectivement 95,3% et 87,7% de Cav-3 en fonction du siARN utilisé (Figure 22).

<b>Formats des puits</b>	<b>Volume de milieu sur les cellules (µL)</b>	<b>Volume de réactif RNAiMax</b>	<b>Concentration finale de siARN (nM)</b>
<i>Plaque 6 puits</i>	2000	9	50
<i>Plaque 4 puits</i>	500	6	50

**Tableau 3. Schéma de pipetage pour la transfection de cellules adhérentes avec Lipofectamine RNAiMax**

#### **I.4. TRANSDUCTION PAR LE VECTEUR ADENO-VIRAL BIN1 +/- EXON 11**

Le vecteur adénoviral est l'un des virus les plus utilisés dans l'acheminement des gènes. C'est un virus à ADN double brin non enveloppés, d'une capacité d'emballage d'environ 35kb. Il existe plus de 50 sérotypes adénoviraux différents, regroupés en 6 espèces (Kaspar 2009). En raison de leur production relativement simple et des niveaux élevés d'expression des transgènes, les vecteurs adénoviraux sont couramment utilisés comme outils de recherche, tant *in vitro* que dans les petits modèles animaux. Les vecteurs adénoviraux ont un excellent tropisme pour les cellules musculaires en culture.

Ici nous avons utilisé des adénovirus exprimant la protéine Bin1 comprenant l'exon 11, spécifique du muscle et codant pour le domaine de liaison aux phosphoinositides PI(4,5)P2 et PI4P (E. Lee 2002) et l'isoforme de Bin1 sans l'exon 11, *in vitro* dans des

cultures de cellules musculaires primaires murines ou immortalisées humaines. Cela nous a permis d'étudier le rôle des différentes protéines dans la tubulation des membranes par l'exon 11 de Bin1.

Les myotubes en différenciation sont transduits avec les vecteurs adénoviraux avec une MOI de 75, pendant 36h, avant fixation ou décapage (cf. II.3 Microscopie électronique). Les virus sont déposés et incubés sur les cellules durant 4 heures à 37°C dans du milieu DMEM Glutamax. Le milieu est ensuite changé pour du milieu de différenciation additionné de 80ng/mL d'agrine.

## II. ANALYSES HISTOMORPHOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES

---

### II.1. IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules cultivées sur différents substrats (lamelles en verre, Fluorodish (#FD35, WPI, France), Ibidityreat  $\mu$ dish (#81156, Ibidi, France), ou Glass bottom  $\mu$ dish (#81168, Ibidi, France)) sont fixées (15 min, 4% de paraformaldéhyde dans du PBS) à température ambiante (RT), perméabilisées (10 min, 0,5% de Triton X-100 dans du PBS à RT) et bloquées (30 min, PBS avec 0,1% de Triton X-100, 5% de sérum albumine bovine (BSA)) sous agitation. Les échantillons sont incubés avec un anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage pendant une nuit à 4°C sous agitation. La liste des anticorps utilisés ainsi que les dilutions sont retrouvées dans le tableau 4. Le lendemain, les échantillons sont lavés dans du PBS additionné de 0,1 % de Triton X-100 avant l'incubation avec les anticorps secondaires (60 min, à RT) (Tableau 5). Ils sont finalement lavés une dernière fois dans du PBS 0,1% de Triton X-100, et montés avec la solution anti-décoloration Vectashield contenant du DAPI (#H-1200 ; Vector Laboratories, USA). Pour le double ou triple marquage, les anticorps primaires (de différentes espèces) ont été ajoutés simultanément à l'étape appropriée. Les molécules fluorescentes utilisées, telles que la phalloïdine qui permet de marquer les filaments d'actine (ThermoFischer Scientific, France), sont incubées en même temps que les anticorps secondaires.

Les immunomarquages ont été observés à l'aide d'un microscope confocal à disque rotatif Nikon Ti2, piloté par le logiciel Metamorph (Molecular Devices) et équipé d'une platine motorisée et d'une tête à disque rotatif Yokogawa CSU-W1 couplée à une caméra sCMOS Prime 95 (Photometrics). Des images de super-résolution sont obtenues grâce au module LiveSR (Gataca Systems).

Anticorps	Référence	Dilution (Immunofluo.)	Dilution (Immunogold)	Dilution (WB)
<i>Cav-3 (Souris)</i>	610421	1:200	1:10	1:1000
<i>Cav-3 (Lapin)</i>	ab2912	1:200	1:20	/
<i>Cav-1 (Lapin)</i>	sc894	1:200	1:10	1:1000
<i>Cavine 4 (Lapin)</i>	HPA020973	1:500	1:20	1:1000
<i>DHPR (Souris)</i>	ab2862	1:200	1:20	/
<i>RyR1 (Lapin)</i>	/	1:500	1:20	/
<i>Triadine (Lapin)</i>	/	1:500	1:20	/
<i>Bin1 (Souris)</i>	05-449-C	1:100	1:15	1:750
<i>GFP (Lapin)</i>	A11122	/	1:20	/
$\alpha$ -actinin (Souris)	A7811	1:200	/	/
<i>GAPDH (Lapin)</i>	sc25778	/	/	1:1000
$\alpha$ -tubuline (Souris)	236-10501	/	/	1:1000
<i>Cavine 1 (Lapin)</i>	A301.269A	1:200	1:20	1:1000

Tableau 4. Liste des anticorps primaires utilisés

Anticorps	Référence	Dilution (Immunofluo.)	Dilution (Immunogold)	Dilution (WB)
<i>Goat anti-Mouse A488</i>	A32723	1:250	/	/
<i>Goat anti-Rabbit A488</i>	A11034	1:250	/	/
<i>Goat anti-Mouse 568</i>	A11004	1:250	/	/
<i>Goat anti-Rabbit 568</i>	A11036	1:250	/	/
<i>Donkey anti-Rabbit 647</i>	A31573	1:250	/	/
<i>Donkey anti-Mouse 647</i>	A31571	1:250	/	/
<i>Goat anti-Rabbit HRP</i>	111-035-144	/	/	1:10000
<i>Sheep anti-Mouse HRP</i>	515-035-062	/	/	1:10000
<i>Goat anti-Mouse gold 15nm</i>	815.022	/	1:25	/
<i>Goat anti-Mouse gold 18nm</i>	115.215.146	/	1:25	/
<i>Goat anti-Rabbit gold 15nm</i>	815.011	/	1:25	/
<i>Goat anti-Rabbit gold 25nm</i>	825.011	/	1:25	/
<i>Goat anti-Rabbit gold 18nm</i>	111.215.144	/	1:25	/

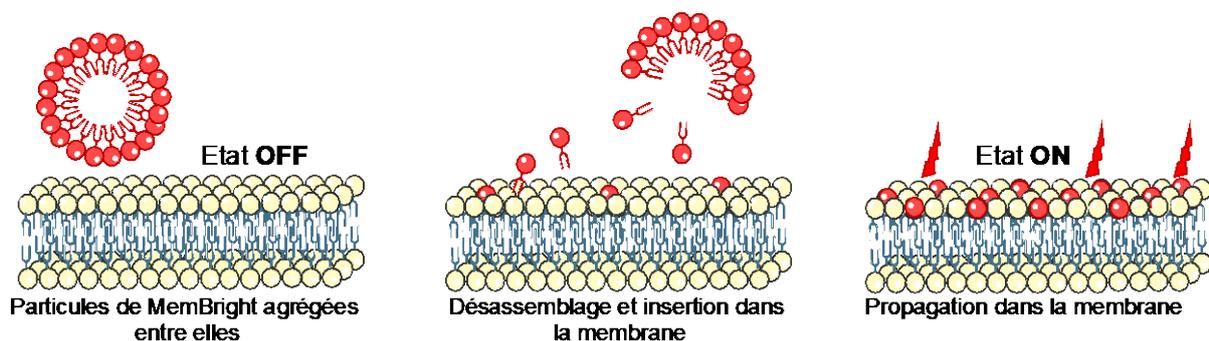
Tableau 5. Liste des anticorps secondaires utilisés

## II.2. MARQUAGE DES MEMBRANES SUR DES MYOTUBES DIFFERENCIÉS POUR L'IMAGERIE DES TUBULES-T

### II.2.1. Étude de la connexion des tubules à la membrane plasmique

Afin de visualiser la formation des tubules-T sur des myotubes en culture, nous avons utilisé une sonde lumineuse, MemBright (Cytoskeleton, Inc, France) à base de cyanines qui permet de visualiser la membrane plasmique (Collot et al. 2019). Profitant

de la structure symétrique des cyanines, ces sondes ont été modifiées à l'aide de deux radicaux zwitterioniques et amphiphiles assurant une coloration sélective et persistante de la membrane plasmique. En milieu aqueux, ces sondes forment des agrégats sombres non fluorescents, alors qu'en présence de membranes lipidiques, les agrégats se dissocient en espèces moléculaires hautement fluorescentes solubilisées dans la bicouche (Figure 32). Cette capacité d'activation des sondes MemBright permet l'imagerie cellulaire sans aucune étape de lavage avec un rapport signal/bruit élevé dans les cellules vivantes ou fixées (Collot et al. 2019).



**Figure 32. Mécanisme d'activation des sondes MemBright**  
(adapté de Collot et al. 2019)

Les myotubes différenciés entre 7 et 9 jours sont placés dans une chambre d'incubation afin d'être maintenus à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> tout au long de l'expérience. Au moment de l'observation le milieu est changé pour du DMEM Glutamax, le sérum interagissant avec la sonde, et 0,1µM de MemBright 640 (#MG-04, Cytoskeleton, Inc, France) est ajouté. De même que pour les immunomarquages les cellules sont observées à l'aide du microscope confocal à disque tournant Nikon Ti2 grâce à l'objectif à immersion x100 sur une épaisseur de 5µm pendant 20min à raison d'une image toutes les 3 minutes. Les images générées sont ensuite analysées par le logiciel ImageJ.

### II.2.2. Étude des tubules induits connectés à la membrane plasmique

Afin d'étudier la connexion des tubules formés suite à la surexpression de la protéine Bin1-GFP exon 11, nous avons transduit des myotubes avec le vecteur adénoviral Bin1-GFP exon 11 et utilisé la sonde lumineuse, MemBright (Cytoskeleton, Inc, France).

Les myotubes sont transduits à sept jours de différenciation avec les vecteurs adénoviraux avec une MOI de 75 36h avant observation. Les virus sont déposés et incubés sur les cellules durant 4 heures à 37°C dans du milieu DMEM Glutamax. Le milieu est ensuite changé pour du milieu de différenciation avec 80ng/mL d'agrine.

A huit jours et demi de différenciation, les myotubes sont placés dans une chambre d'incubation afin d'être maintenus à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> tout au long de l'expérience. Au moment de l'observation le milieu est changé pour du DMEM Glutamax et 0,1µM de MemBright 640 (#MG-04, Cytoskeleton, Inc, France) est ajouté. Les conditions d'imagerie sont les mêmes que dans la partie précédente.

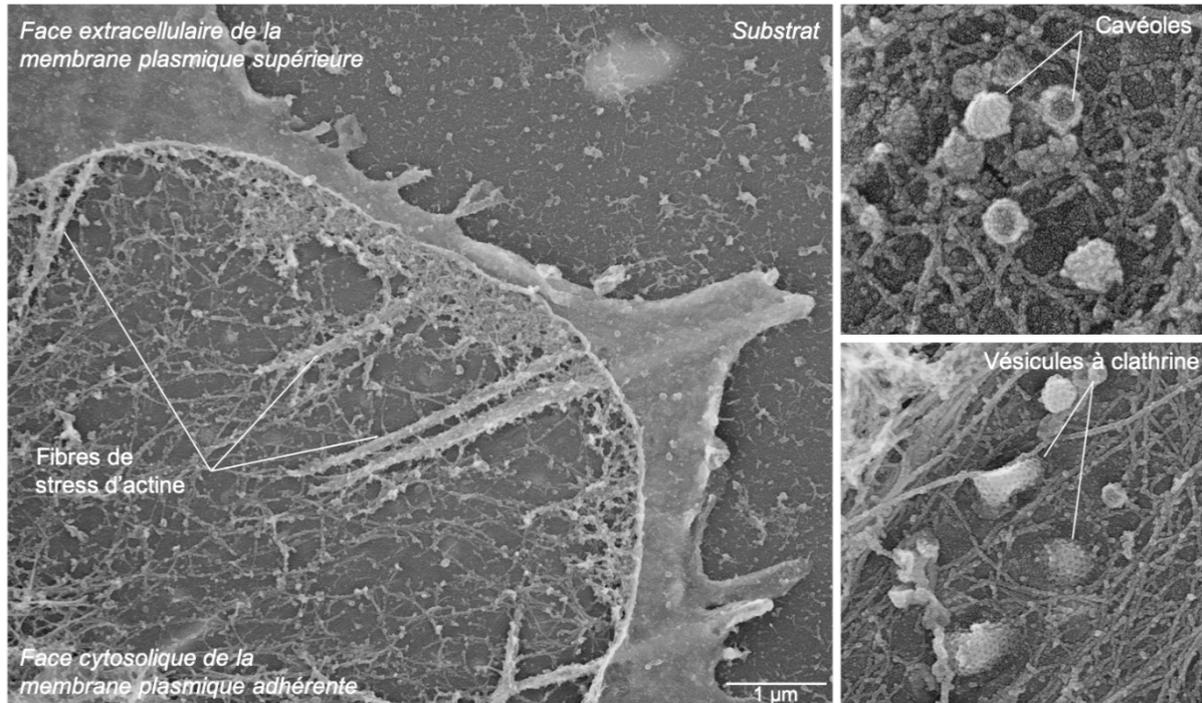
## II.3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

### II.3.1. Préparation des échantillons de microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (MET) consiste en un faisceau d'électrons transmis à travers des sections ultra-minces pour former une image reflétant la densité des électrons. La préparation des échantillons peut être très complexe, et les étapes nécessaires - allant du processus de fixation à l'inclusion dans la résine, en passant par la coloration ou le contraste avec les métaux lourds - peuvent toutes introduire des artefacts ou une dégradation structurelle. Les sections minces sont intrinsèquement limitées puisqu'elles ne fournissent qu'une vue bidimensionnelle des structures sectionnées.

Dans le cas de ce que nous appelons décapage par sonication, c'est-à-dire le décapage du « toit » de la cellule pour avoir accès à la partie ventrale de la membrane plasmique, le fond des cellules étant suffisamment mince pour que les électrons puissent le traverser et offrir un excellent contraste tout en conservant leur structure tridimensionnelle. Dans la version originale de cette expérience décrite par J. Heuser (Heuser et Kirschner 1980), les cellules ou tissus sont fixés par congélation rapide pour éviter la formation de cristaux de glace dans l'échantillon. Les structures biologiques sont ensuite ouvertes par une technique appelée "*freeze-fracture*" ou directement séchées à froid par sublimation de l'eau. L'élimination de l'eau par sublimation permet de retirer l'eau à la surface de l'échantillon sans endommager les structures sous-jacentes. Ensuite, une couche de métal extrêmement fine

(généralement du platine) est déposée à la surface de l'échantillon, suivie d'une couche de carbone pour stabiliser le grain de platine. Heuser introduira par la suite le décapage cellulaire pour adapter sa technique à la visualisation des faces cytoplasmiques des membranes biologiques et des protéines membranaires (Heuser 2000b).



**Figure 33. Réplique de métal révélant la structure de la membrane interne/cytoplasmique des cellules.**

Image à faible grossissement d'une cellule musculaire humaine en culture partiellement décapée par sonication. Le décapage par sonication permet de visualiser la face cytosolique de la membrane adhérente, constellée de réseaux de cytosquelette d'actine formant des fibres de stress, des cavéoles ainsi que des puits de clathrine.

S. Vassilopoulos a mis au point le protocole suivant avec l'aide de J. Lainé, M. Trichet (Plateforme de microscopie électronique, Sorbonne Université) et Agathe Franck (Figure 33). Les membranes plasmiques adhérentes de cellules cultivées sur des lamelles de verre sont obtenues par sonication selon un protocole publié précédemment (Heuser 2000b). Les cellules sont rincées intensément trois fois avec le tampon Ringer avec  $\text{Ca}^{2+}$  (Annexe 1) puis brièvement soumises à une concentration de 0,5 mg/mL de poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, France), permettant de fixer les cellules à la lamelle, et diluée dans le tampon Ringer sans  $\text{Ca}^{2+}$  (Annexe 1). La poly-L-lysine est éliminée par lavage à l'aide d'un tampon Ringer sans  $\text{Ca}^{2+}$ . Les lamelles sont plongées dans un bain de tampon KHMgE (Annexe 1) à 37°C avant *décapage par sonication* à l'aide d'un processeur ultrasonique Vibra-Cell VCX130 (Sonics, États-

Unis) à 20 % d'amplitude. Les membranes décapées par sonication sont immédiatement fixées pendant 30 minutes avec 2 % de glutaraldéhyde / 2 % de paraformaldéhyde. Les cellules sont traitées séquentiellement avec 1 % d'OsO<sub>4</sub>, 1,5 % d'acide tannique et 1 % d'acétate d'uranyle avant d'être déshydratées par des bains successifs d'éthanol. L'alcool est enfin substitué pas du hexaméthylidisilazane (HMDS) (#C16700-250 ; LFG Distribution, France) un solvant avec une tension de surface faible permettant de préserver l'ultrastructure des molécules au moment du séchage sous vide.

Pour le marquage avec des billes d'or des protéines d'intérêt (Immuno-gold), les membranes plasmiques soniquées sont fixées uniquement avec 4 % de paraformaldéhyde. Avant l'incubation avec des anticorps primaires et des anticorps secondaires couplés à des billes d'or (Tableaux 4 et 5), les membranes sont incubées avec une solution de NaBH<sub>4</sub> qui permet d'inactiver les aldéhydes. Les membranes sont enfin fixées avec 2 % de glutaraldéhyde avec d'être soumises au même traitement que pour les études de morphologie.

Les échantillons déshydratés sont ensuite métallisés par métallisation rotative. Les lamelles de verre sont placées dans l'enceinte d'un métalliseur de type ACE600 (Leica Microsystems, Allemagne). Une fois sous vide poussé ( $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  mBar) les membranes cellulaires sont recouvertes de 2 nm de platine par pulvérisation et par 4 à 6 nm de carbone en tresse. Le revêtement par pulvérisation cathodique ou *sputtering* est le processus d'application d'un revêtement ultrafin de métal tel le platine (Pt) sur un échantillon. Ceci empêche l'accumulation de champs électriques statiques sur l'échantillon et est très utilisé pour la microscopie électronique. Il augmente également la quantité d'électrons secondaires qui peuvent être détectés à la surface de l'échantillon et augmente donc le rapport signal/bruit. Le revêtement de carbone par évaporation thermique est utilisé pour stabiliser le dépôt de métal précédent. Une source de carbone, sous forme de tresse ou de tige, est montée dans un système à vide entre deux bornes électriques à courant élevé. Lorsque la source de carbone est chauffée à sa température d'évaporation, un fin jet de carbone est déposé sur les échantillons.

Les répliques de platine obtenues sont séparées du verre par flottaison sur de l'acide fluorhydrique dilué à 5 %, lavées plusieurs fois par des bains d'eau distillée contenant

0.1% de détergent (une goutte dans 10ml, Photo-Flo, Kodak) et récupérées sur des grilles de microscopie électronique (ME) recouvertes d'une pellicule de carbone (200 mesh formvar/carbone, LFG Distribution, France). Les grilles sont montées dans le porte-objet du goniomètre à entrée latérale eucentrique d'un microscope électronique à transmission fonctionnant à 80 kV (modèle CM120 ; Philips) et les images sont enregistrées avec la caméra numérique Morada (Olympus, Tokyo). Les images sont traitées par le logiciel Adobe Photoshop ou ImageJ afin d'ajuster la luminosité et le contraste et sont présentées en contraste inversé.

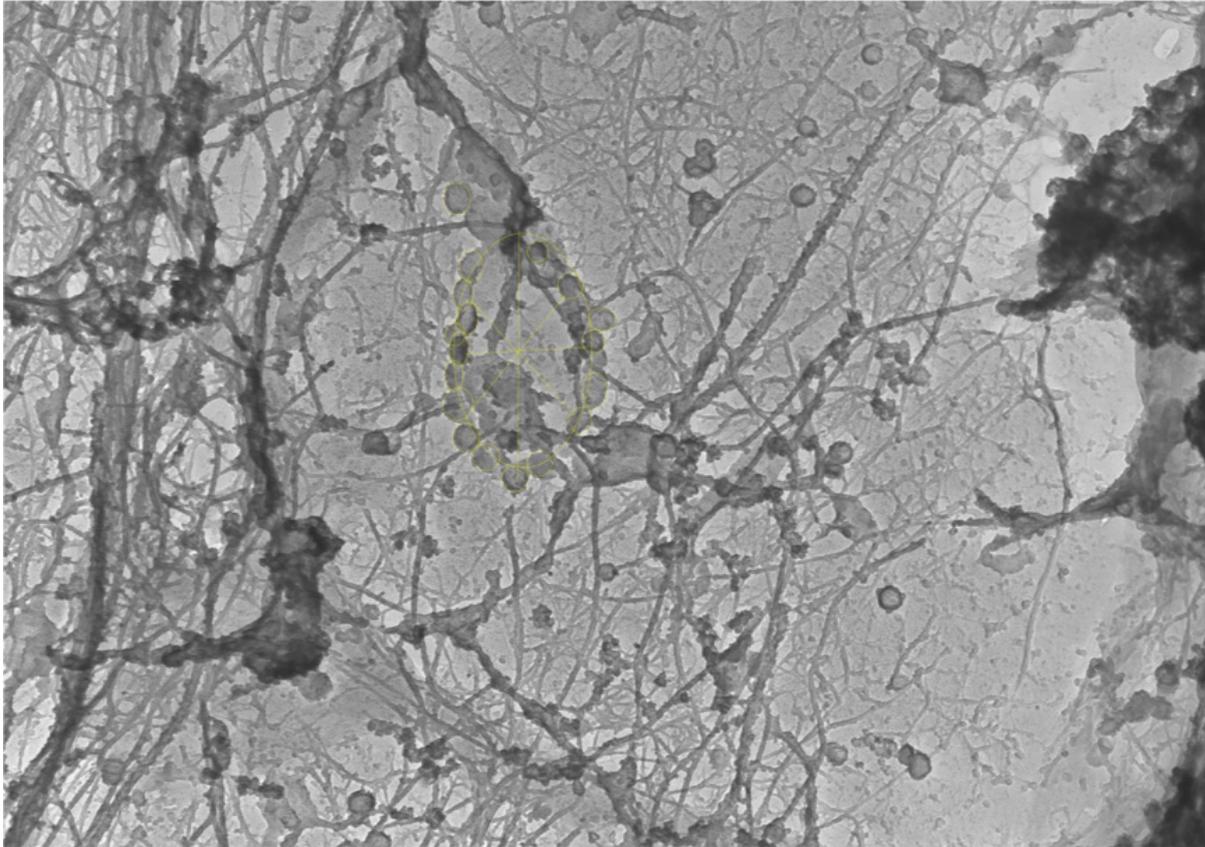
### II.3.2. Anaglyphes et Tomogrammes

Les images en anaglyphe 3D sont obtenues en combinant deux images stéréoscopiques en une seule pour créer un effet 3D. Il nous a été particulièrement utile d'examiner les structures tridimensionnelles fixées à des membranes non recouvertes, surtout dans le cas de structures membranaires complexes. L'échantillon, dans le porte objet du MET, est incliné avec un angle de  $\pm 10^\circ$ , et les deux images sont ensuite modifiées dans le logiciel Photoshop (Adobe) pour ajuster la luminosité et le contraste et présentées en contraste inversé. Les anaglyphes sont réalisés en convertissant l'image inclinée à  $-10^\circ$  en rouge pur et l'image inclinée à  $+10^\circ$  en cyan (bleu/vert), en les superposant, et en les alignant les unes par rapport aux autres (J. Heuser 2000a).

La méthode de prise d'images est similaire pour réaliser des tomogrammes. L'échantillon, dans le porte objet du MET, est incliné avec un angle de  $\pm 20^\circ$  et une image est prise tous les  $5^\circ$ . La luminosité et le contraste des images sont ajustés dans Photoshop et les images présentées en contraste inversé. Les films sont réalisés en montant bout à bout les images des tomogrammes sur ImageJ en format GIF.

### II.3.3. Étude des structures membranaires

Sur les images de microscopie électronique et à l'aide du logiciel ImageJ, les structures d'intérêt ont été détournées et leur aire moyenne a été mesurée dans les ROI correspondants (Figure 34). L'aire moyenne de la zone de membrane plasmique a également été mesurée. L'analyse des données a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism 8.



**Figure 34. Mesure des structures membranaires d'intérêt**

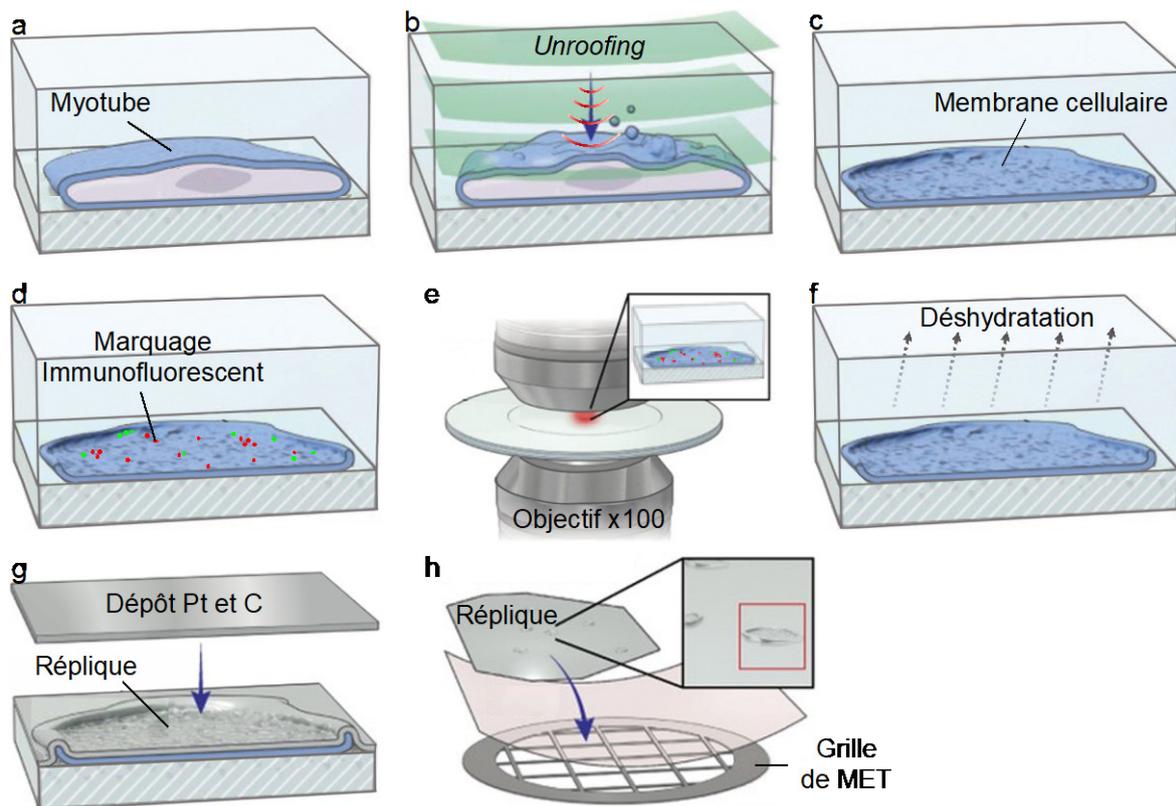
Image à haute résolution de la surface interne d'un myotube humain en culture. Cette image n'est pas encore inversée. Afin de quantifier les anneaux de cavéoles à l'aide du logiciel ImageJ, les structures d'intérêt sont détournées en régions d'intérêt (ROI) et leur aire moyenne mesurée.

#### II.3.4. Microscopie Corrélative

Au cours de ma thèse j'ai adapté cette technique de microscopie électronique sur répliques de métal afin de réaliser de la microscopie corrélative entre la microscopie confocale spinning disk à super-résolution et la microscopie électronique. La technique est schématisée en Figure 35.

Les myotubes sont cultivés sur des boîtes au fond alpha-numériquement quadrillé (Glass bottom  $\mu$ dish (#81168, Ibidi, France)) et recouvertes de Matrigel 1:10. Les expériences sont réalisées après 7 à 8 jours de différenciation. Les cellules sont d'abord rincées avec du tampon Ringer +Ca<sup>2+</sup> froid afin de dépolymériser le Matrigel. Les échantillons sont ensuite incubés 10 secondes dans de la poly-L-lysine à 0,5 mg/mL (Sigma-Alrich, France) et rincés au tampon Ringer -Ca<sup>2+</sup> avant décapage par sonication (Heuser 2000b). Les membranes décapées par sonication sont

immédiatement plongées dans un bain de paraformaldéhyde à 4% pendant 30 minutes. Les protéines d'intérêt sont ensuite marquées par immunofluorescence. Les échantillons sont saturés (30 min, KHMgE avec 0,5% de sérum albumine bovine (BSA)) sous agitation. Ils sont ensuite incubés avec un anticorps primaire dilué dans le tampon de saturation pendant 1h30 à température ambiante sous agitation avant d'être rincés au KHMgE et incubés avec les anticorps secondaires (60 min, température ambiante). La liste des anticorps utilisés ainsi que les dilutions sont retrouvées dans les tableaux 4 et 5. Les immunomarquages sont acquis à l'aide du microscope Nikon Ti2, et les images à très haute résolution sont obtenues grâce au module LiveSR (Gataca Systems). Les observations sont réalisées à différents grossissements afin d'optimiser la localisation des myotubes d'intérêt (Objectifs x4, x20 et x100). Les échantillons sont ensuite incubés dans du glutaraldéhyde 2% à 4°C sur la nuit.



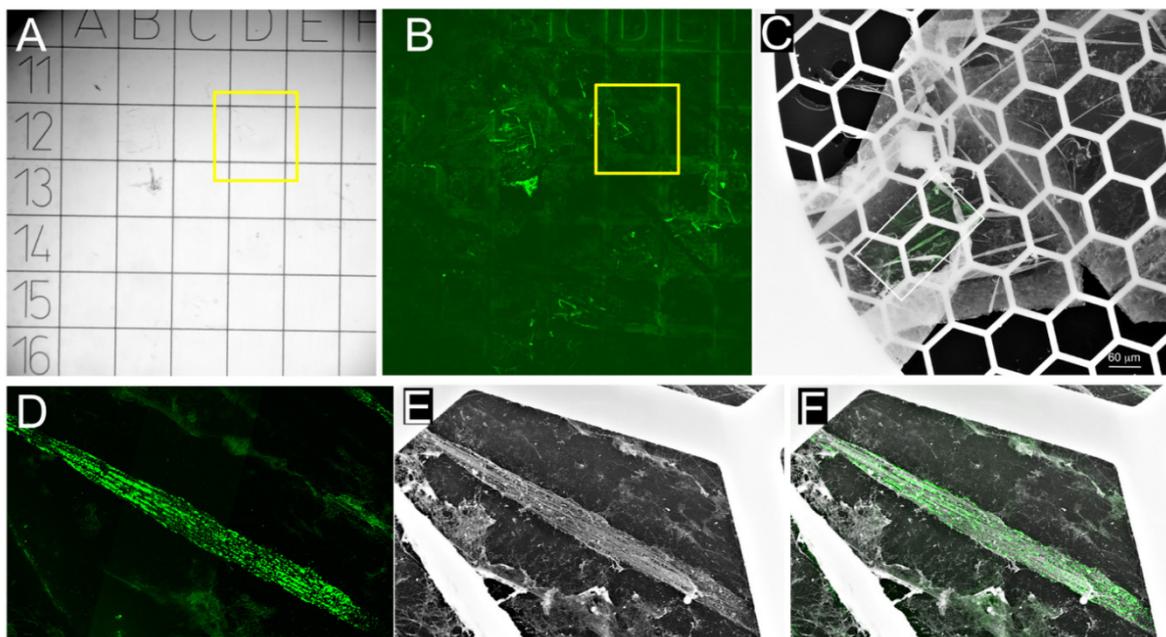
**Figure 35. Protocole de préparation des échantillons pour la microscopie corrélative**

(a) Les cellules sont cultivées sur des boîtes de culture en verre. (b) Les cellules sont soniquées afin de décaper leur partie supérieure et d'exposer la face ventrale de la membrane plasmique. (c) Les cellules sont ensuite fixées chimiquement. (d) Les protéines d'intérêt sont marquées avec des anticorps primaires puis secondaires fluorescents. (e) Les échantillons sont imagés en super-résolution. (f) Les échantillons sont déshydratés et séchés. (g) Les échantillons sont recouverts d'une fine couche de platine et de carbone afin de créer une réplique de la membrane. (h) Les répliques sont séparées de la boîte, rincées et transférées sur des grilles de ME à transmission (Adapté de Sochacki et al. 2014).

Le lendemain, les cellules sont traitées séquentiellement avec 1% de tetroxyde d'osmium OsO<sub>4</sub>, 1,5% d'acide tannique et 1% d'acétate d'uranyle avant d'être déshydratées à l'éthanol et au HMDS (#C16700-250 ; LFG Distribution, France). Les échantillons séchés sont ensuite recouverts par rotation avec 2 nm de platine et 6 nm de carbone à l'aide de l'ACE600 (Leica Microsystems, Allemagne).

Les zones d'intérêt des répliques de platine ainsi obtenues sont retirées du verre après une incubation d'une heure sur de l'acide fluorhydrique à 5%, lavées plusieurs fois à l'eau distillée et déposées sur des grilles de ME recouvertes d'une pellicule de carbone (200 mesh formvar/carbone (#FFTH200-CU-50, LFG Distribution, France)). Les grilles sont ensuite observées comme décrit précédemment dans II.3.1.

Les images de microscopie à super-résolution et celles de microscopie électronique sont superposées grâce au logiciel Adobe Photoshop. Les images de ME sont présentées en contraste inversé (Figure 36).



**Figure 36. Corrélation des images de microscopie à super-résolution et des images de microscopie électronique**

(A) et (B) Les myotubes sont cultivés sur des boîtes de culture dont le fond est en verre quadrillé afin de permettre une localisation exacte des cellules d'intérêt. La fluorescence des cellules est d'abord imagée à faible grossissement x4 afin d'avoir une vue d'ensemble des zones avec des myotubes décapés par sonication. (C) Les images de microscopie électronique sont d'abord prises à un très faible grossissement afin de localiser les myotubes et de superposer l'image de fluorescence facilement. (D), (E) et (F) Corrélation de la microscopie à super-résolution et de la microscopie électronique d'un myotube murin à 8 jours de différenciation. (D) Image en super-résolution. La Cav-3-GFP apparaît en vert. (E) Observation en microscopie électronique à transmission de la réplique de métal du même myotube. (F) Superposition de l'image en SR avec l'image de ME.

### III. BIOCHIMIE

---

#### III.1. WESTERN BLOT

Les échantillons de cellules sont collectés en utilisant directement du bleu Laemmli 4X (Laemmli 1970) ou un tampon NaCl (150 mM)-EDTA (10 mM) avec ajout d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase 1:100 (#P8340 ; Sigma-Aldrich, USA). Les échantillons de protéines sont séparés par électrophorèse dans des gels pré-coulés de bis-acrylamide 4-12% 1,5mm 10 ou 15 puits (#NP0335BOX ; Life Technologies, France) et un tampon de migration NUPAGE MOPS SDS (#NP0001 ; Life Technologies, France), puis transférés par électrophorèse sur des membranes de nitrocellulose 0,45 µm (#LC2001 ; Life Technologies, France) et marqués avec des anticorps primaires qui figurent dans le tableau 4 et des anticorps secondaires couplés à la HRP (Jackson Laboratories, États-Unis) (Tableau 5). La présence de protéines dans les échantillons est détectée à l'aide du substrat chimiluminescent HRP d'Immobilon (#WBKLS ; Sigma-Aldrich, France). L'acquisition est effectuée sur une G-Box (Ozyme, France) ou un Chemidoc (BioRad, France).

#### III.2. EXTRACTION D'ARN ET RT-QPCR

L'extraction de l'ARN et les expériences de RT-PCR quantitatives présentées dans ce manuscrit ont été réalisées par G. Moulay. Les ARN sont isolés des myotubes quatre jours après la transfection des siARN en utilisant le réactif TRIzol (Life Technologies, France) selon le protocole du fabricant. L'ARN total est ensuite soumis à un traitement DNaseI (New England Biolabs, USA) suivi d'une extraction phénol-chloroforme, et stocké à -80°C après quantification au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, USA). 1 µg d'ARN est transcrit de manière inverse en utilisant le système de synthèse de premier brin M-MLV selon les instructions du fabricant (Invitrogen, France) sur un total de 20 µL. Pour quantifier l'expression de l'ARNm, une PCR en temps réel est effectuée à l'aide d'un Lightcycler 480 II (Roche, Suisse) et de réactif 1X SYBR Green (Roche, Suisse) en utilisant 0,2 pmol/µL d'amorces avant et arrière, et 5 µL de chaque ADNc dilué à 1:10 dans de l'eau exempte de nucléase. Les séquences d'amorces PCR pour l'ADNc humain et de souris sont énumérées dans l'annexe 3. Les cycles de PCR sont : une étape de pré-incubation de

10 min 95°C suivie de 45 cycles avec une dénaturation à 95°C pendant 10 s, une hybridation à 60°C pendant 15 s et une extension à 72°C pendant 8 s. Chaque niveau d'expression cible a été normalisé en utilisant la moyenne géométrique RPLP0 et HPRT1.

### **III.3. ANALYSE STATISTIQUE**

Les analyses statistiques ont été réalisées par des t-tests de Student ou des ANOVA sur le logiciel GraphPad Prism 8.



---

# RESULTATS

---



## I. LES CAVEOLES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

---

Les cavéoles sont des structures membranaires particulièrement abondantes dans le muscle squelettique et possédant des fonctions variées allant de l'homéostasie du cholestérol jusqu'à la mécano-protection du sarcolemme. Pourtant, il manque encore des informations précieuses sur leur structure dans les cellules musculaires qui pourraient s'avérer déterminantes pour comprendre comment des défauts dans leur organisation contribuent à la physiopathologie de nombreuses myopathies. Parmi les fonctions variées qui ont été attribuées aux cavéoles, une est particulièrement énigmatique. Il s'agit de leur rôle dans la formation des tubules-T dans les cellules musculaires différenciées. Pour mon projet j'ai choisi de me focaliser précisément sur ce rôle. J'ai étudié la distribution et l'ultrastructure des cavéoles aux cours des différents stades de la différenciation des myoblastes en myotubes dans différents modèles cellulaires, humains et murins, sains et pathologiques, afin de mieux comprendre leur organisation et leur structure au cours de la différenciation des myotubes.

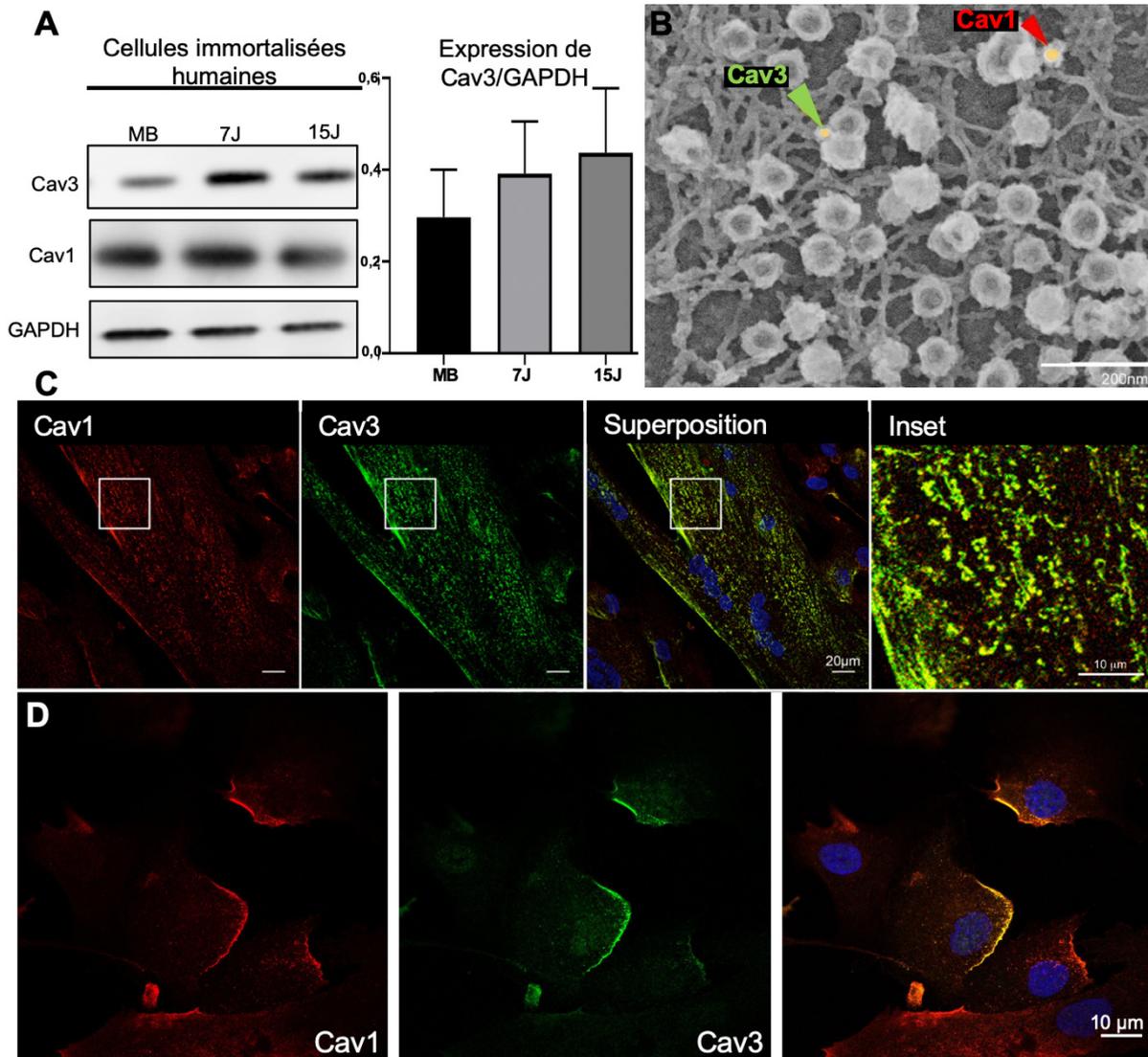
Cette étude a été réalisée majoritairement dans des cultures de myotubes primaires murins. En effet, suite à de nombreuses expériences de microscopie nous avons déterminé que ce système se différenciait beaucoup plus extensivement et permettait la formation d'un appareil contractile plus mature et donc un meilleur modèle d'étude de la formation des tubules-T.

J'ai combiné des techniques de microscopie à fluorescence dites à super-résolution avec l'analyse des myotubes par microscopie électronique (ME). Grâce à un lentivirus généreusement partagé par l'équipe de C. Lamaze (Institut Curie, Paris) et dans le but d'étudier les cavéoles musculaires j'ai généré plusieurs lignées de cellules humaines contrôles exprimant la cavéoline 3 GFP (Cav-3-GFP). Cela a permis de mettre au point la microscopie corrélative pour l'étude des cavéoles et de la cavéoline 3 (Cav-3) au cours de la différenciation musculaire avec comme objectif principal de comprendre leur rôle dans la formation des tubules-T naissants dans les myotubes les plus différenciés.

## I.1. LES PROTEINES DES CAVEOLES

Dans un premier temps nous avons décidé d'étudier l'expression protéique de Cav-3 et Cav-1 dans les cellules humaines et murines afin de caractériser l'évolution de ces protéines dans nos modèles cellulaires. Il a été décrit précédemment une augmentation de Cav-3 après induction de la différenciation (Tang et al. 1996). Une étude par Western Blots et immunofluorescence nous a permis de retrouver une expression similaire (Figure 37 (A, C, D)). Nous avons cependant été surpris d'observer que, dans les cellules humaines immortalisées d'individus contrôle, une quantité non négligeable de Cav-1 était toujours distribuée à la surface des myotubes. Ceci se traduit par une colocalisation des marquages Cav-1 et Cav-3 en immunofluorescence (Figure 37 (C)). Afin d'observer *en face* les cavéoles et leur composants protéiques nous avons réalisé des expériences de doubles marquages avec des anticorps couplés à des billes d'or de tailles différentes sur des répliques de métal de myotubes différenciés pendant 3 à 4 jours et observés par ME à transmission. Cela m'a permis de montrer la présence simultanée au sarcolemme de cavéoles marquées avec Cav-3 et de cavéoles marquées avec Cav-1 (Figure 37 (B)).

Les cavéoles musculaires sont cependant formées principalement de la cavéoline spécifique du muscle, Cav-3, ainsi que de la cavine 1 et de la cavine 4, elle aussi spécifique du tissu musculaire (Bastiani et al. 2009). J'ai montré dans les myotubes en culture une colocalisation des marquages de Cav-3 et de la cavine 4.

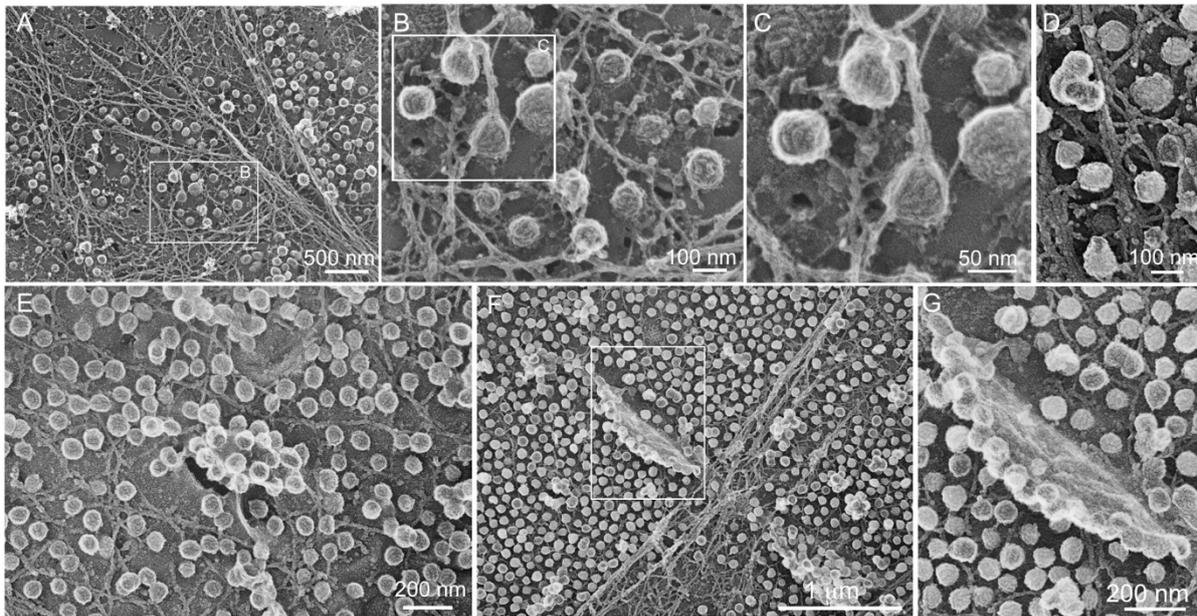


**Figure 37. Expression de la cavéoline au cours de la différenciation musculaire.**

(A) Analyse par Western Blot et quantification densitométrique de la quantité de Cav-3 et de Cav-1 dans des myotubes humains au cours de la différenciation. (B) Image de ME sur réplique de métal de myotubes immortalisés humains à 5 jours de différenciation avec immuno-marquage à l'or des protéines Cav-3 (bille d'or de 15nm), indiqué par une flèche verte et Cav-1 (bille d'or de 25nm), indiqué par une flèche rouge. Les billes d'or sont pseudo-colorées en jaune. (C) Immuno-marquage d'un myotube immortalisé humain à 5 jours de différenciation. Les marquages de Cav-1 (rouge) et Cav-3 (vert) sont observés. On observe la présence et la colocalisation des deux cavéolines dans les cellules différenciées. (D) Immuno-marquage de myoblastes immortalisés humains. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu).

La cavine 4 s'hétéro-oligomérisse avec la cavine 1 afin de former avec Cav-3 le manteau des cavéoles musculaires. Nous avons donc voulu étudier l'aspect de ce manteau par rapport aux cavéoles d'autres tissus. Pour cela nous avons réalisé des répliques de métal de la membrane cytosolique de myotubes et de fibroblastes. En effet, le manteau des cavéoles est facilement observable en ME à transmission à partir des répliques de métal car les objets maintiennent leur tridimensionnalité. Ce manteau

apparaît sous forme de bandelettes transversales à la surface des cavéoles (Figure 38 (A-C)). Son organisation est différente de celle des cavéoles des fibroblastes, sur lesquelles les oligomères de cavines apparaissent moins rugueux et mieux définis (Figure 38 (D)). De plus, les cavéoles des cellules musculaires se caractérisent par leur capacité à former des structures inhabituelles dans des régions de forte densité cavéolaire (Figure 38 E-G)). On retrouve des structures en grappes (Figure 38 (E)), ou des fusions de cavéoles avec le sarcolemme (Figure 38 (F-G)).



**Figure 38. Les cavéoles musculaires ont une structure et une organisation différente des cavéoles de fibroblastes.**

(A) Image à faible grossissement d'un myotube humain décapé par sonication et observé par microscopie électronique à transmission. (B) Image à fort grossissement de la région correspondant à l'encart dans (A) montrant des cavéoles musculaires. (C) Image à fort grossissement de la région correspondant à l'encart dans (B) montrant des cavéoles musculaires. Le manteau des cavéoles composé de cavines présente des bandelettes caractéristiques des cavéoles musculaires. (D) Vue à fort grossissement des cavéoles présentes dans un fibroblaste en culture. Le manteau des cavéoles présente un aspect plus strié formant occasionnellement une spirale. (E) Vue à fort grossissement de structure formée par le regroupement de cavéoles dans des myotubes humains décapés par sonication et observés par microscopie électronique à transmission. (F) Image à faible grossissement de la membrane cytosolique d'un myotube humain décapé par sonication et observé par ME à transmission. (G) Image à fort grossissement de la région correspondant à l'encart dans (F). Les cavéoles s'organisent sur une structure émanant du sarcolemme.

## I.2. LES CAVEOLES MUSCULAIRES AU SARCOLEMME

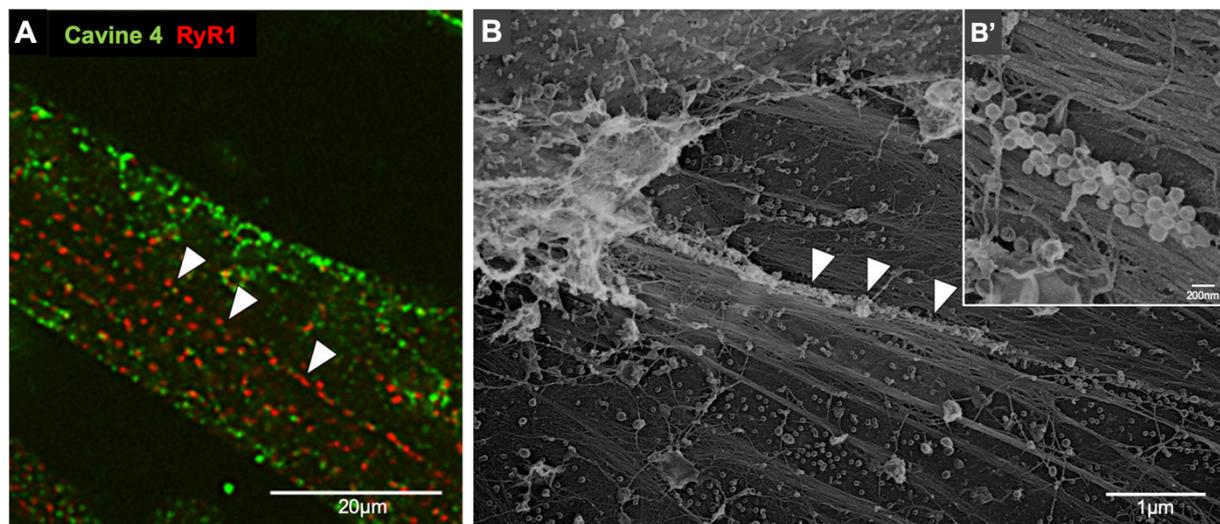
### I.2.1. L'organisation et la structure des cavéoles est différente entre les myotubes humains et les myotubes murins

Au cours de mes travaux, j'ai utilisé deux différents types cellulaires. J'ai cultivé des myotubes humains ainsi que des cultures primaires de myotubes murins. J'ai remarqué une organisation différente des cavéoles entre ces deux types de myotubes. Dans les cellules humaines les cavéoles ont un diamètre moyen de 70nm et peuvent former des regroupements très denses à la membrane plasmique. Dans les myotubes murins issus des cultures primaires et extensivement différenciés 8 à 10 jours, les cavéoles sont plus petites, avec un diamètre moyen de 60nm. Il est décrit dans la littérature que les cavéoles peuvent prendre différentes organisations à la membrane plasmique (Razani et al. 2002) (cf. Introduction Figure 21 et Figure 38). Nous avons très fréquemment observé sur des répliques de métal des myotubes en culture des grappes de cavéoles (fusionnées ou non) (Figure 38 (E-G)), des rosettes formées d'au moins 5 cavéoles, des petits tubes correspondant à la fusion de 3 ou 4 cavéoles et possédant encore à leur surface le manteau caractéristique de cavines. Des structures similaires sont observables dans différents types cellulaires (Parton 2018) mais nous avons remarqué dans les myotubes que ces structures deviennent plus complexes à mesure que la différenciation avance.

### I.2.2. Les cavéoles s'accumulent entre les fibres de stress d'actine mais ne fusionnent pas en tubes

Dans les myotubes, le cytosquelette d'actine est organisé en fibres de stress qui courent le long de la cellule et occupent la majorité de la membrane plasmique. Nous avons observé dans des myotubes humains à quatre jours de différenciation, une organisation longitudinale du marquage cavéolaire, par la cavine 4, sur des images d'immunofluorescence (Figure 39 (A)). Notre hypothèse est donc que les cavéoles s'organisent dans les zones disponibles du sarcolemme. On aurait donc des regroupement cavéolaires dus à l'encombrement de la membrane par les fibres de stress d'actine, et qui pourraient par conséquent être dus au mouvement et à la contraction des cellules musculaires.

Nous avons voulu observer les cavéoles au niveau du sarcolemme par ME afin de savoir sous quelles formes elles étaient organisées. Pour cela nous avons réalisé des répliques de métal de cellules humaines décapées après sonication, nous permettant d'avoir accès à la partie cytosolique de la membrane plasmique adhérente (Figure 39 (B-B')). J'ai ainsi remarqué que les cavéoles étaient systématiquement organisées longitudinalement entre les fibres d'actine elles-mêmes longitudinales au niveau de la membrane (Figure 39 (B)). Nous nous sommes donc demandés si cette organisation longitudinale était due à l'alignement de cavéoles individuelles ou si déjà les cavéoles étaient capables de fusionner entre-elles pour former un tube de membrane. Des observations de myotubes peu différenciés par microscopie électronique m'ont permis de montrer qu'à ce stade de différenciation, les cavéoles sont organisées en grappes situées entre les fibres de stress d'actine (Figure 39 (B')) mais qu'elles ne formaient pas de tubes qui pourraient correspondre à des tubules-T en formation.



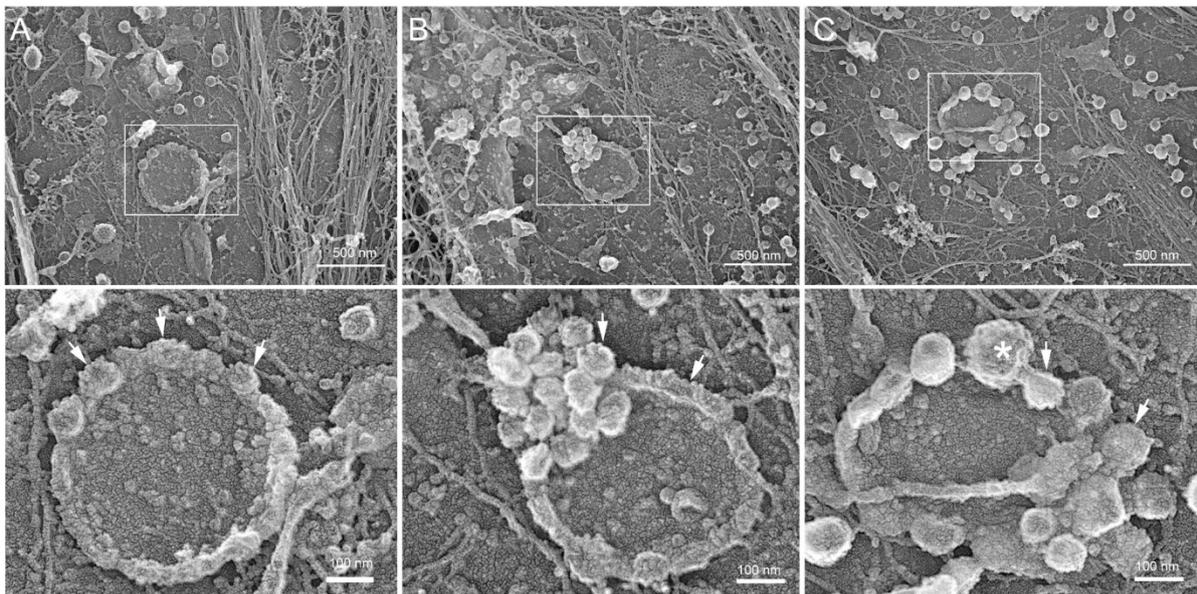
**Figure 39. Les cavéoles musculaires s'organisent longitudinalement dans les myotubes en cours de différenciation.**

**(A)** Marquage immunofluorescent de la cavine 4 (vert) et de RyR1 (rouge) sur des myotubes humains à 6 jours de différenciation. Les têtes de flèches montrent un alignement longitudinal des marquages cavine 4 et RyR1 le long de la cellule. **(B)** Vue à faible grossissement d'un myotube humain décapé par sonication. Un alignement de cavéoles (têtes de flèches blanches) est visible entre les fibres de stress d'actine. **(B')** Grossissement de la région marquée par les flèches dans (B). On remarque qu'à ce stade de différenciation, les cavéoles alignées ne forment pas de tubes et restent individualisées .

### I.3. MISE EN EVIDENCE D'UNE NOUVELLE ORGANISATION CAVEOLAIRE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES : LES ANNEAUX DE CAVEOLES

Ce qui nous a frappé lors de nos observations des cavéoles par microscopie électronique sur répliques de métal, c'est la présence de nouvelles structures de cavéoles particulièrement complexes. En effet, au cours de la différenciation musculaire, les cavéoles semblent s'organiser en anneaux formant des plateformes circulaires de membrane plasmique (Figures 40 et 41). De par leur ressemblance avec des marguerites nous avons nommé ces structures "*caveolae daisies*" (littéralement marguerites de cavéoles).

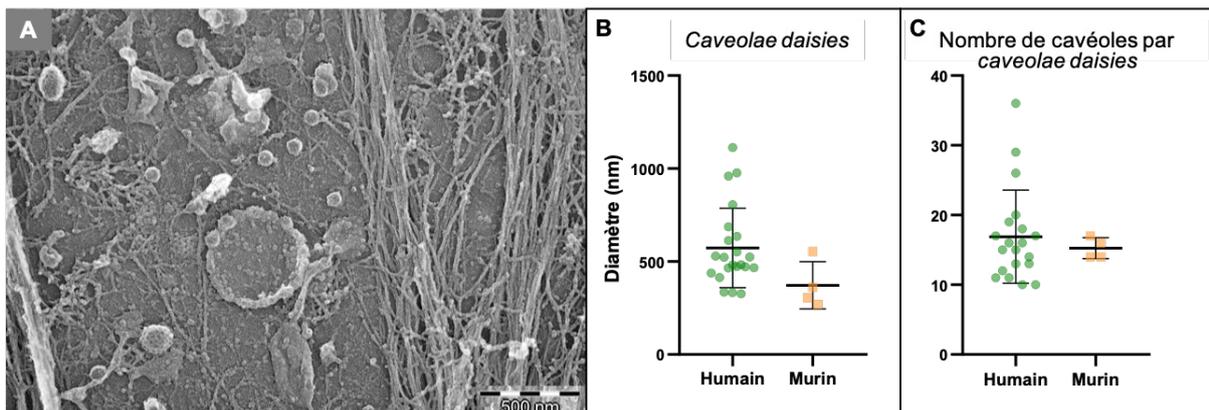
Ces structures, qui sont visibles en microscopie sur réplique de métal de myotubes à partir de 4 jours de différenciation, sont différentes des structures multilobées comme les rosettes que les cavéoles forment dans les nombreux autres types cellulaires dans lesquels elles sont présentes.



**Figure 40. Organisation des cavéoles à la membrane des cellules musculaires en cours de différenciation.**

(A-C) Galerie d'images obtenues par PREM (platinum-replica electron microscopy) d'anneaux formés de cavéoles dans des myotubes humains en culture décapés par sonication. Les images du bas correspondent aux grossissements des encarts dans les images du haut. Les flèches blanches indiquent des cavéoles et du matériel d'origine cavéolaire retrouvé sur les anneaux de cavéoles. L'étoile indique une vésicule à clathrine caractérisée par son manteau polygonal.

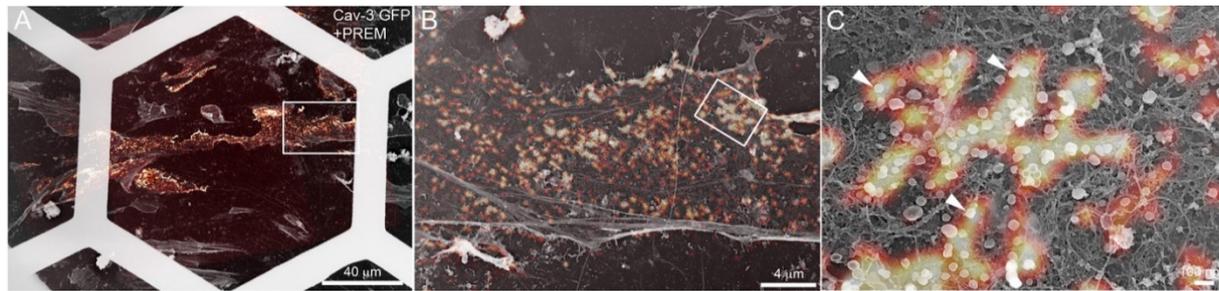
Les anneaux de cavéoles sont formés par l'association circulaire de plusieurs cavéoles (Figure 40). La partie centrale de l'anneau, dépourvue de cytosquelette d'actine, contient systématiquement des protéines membranaires qui semblent s'accumuler dans cette région. Les mesures effectuées sur les micrographies m'ont permis de montrer que le diamètre de ces anneaux est d'environ 570 nm dans des myotubes humains et de 370 nm dans des myotubes murins issus de cultures primaires (Figure 41 (B)). Bien que la taille des anneaux de cavéoles soit assez variable et oscille entre 270 nm et 1 µm entre les cellules humaines et murines, le nombre de cavéoles retrouvées au niveau de ces structures, c'est-à-dire le nombre moyen de cavéoles nécessaires pour leur formation semble constant entre les différents types cellulaires étudiés. En effet, la quantification du nombre de cavéoles par anneau, de 16 en moyenne, n'a pas montré de différence entre le nombre de cavéoles moyen nécessaire à leur formation dans les myotubes humains et murins (Figure 41 (C)).



**Figure 41. Taille des anneaux de cavéoles.**

(A) Image de microscopie électronique PREM d'un exemple d'anneau formé par le rassemblement de cavéoles caractéristique à la surface d'un myotube humain en culture. (B) Quantification du diamètre moyen des anneaux ainsi que (C) du nombre moyen de cavéoles qui les composent.

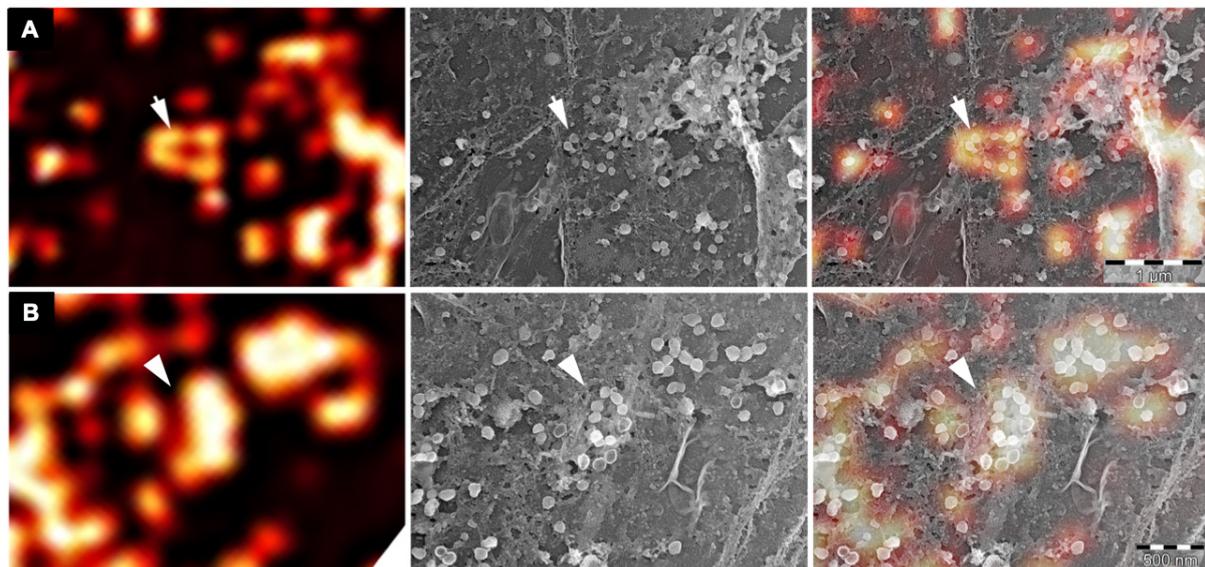
Afin de visualiser simultanément l'ultrastructure des myotubes et la localisation des protéines d'intérêt, j'ai réalisé des expériences de microscopie corrélative en combinant les marquages de Cav-3 observés par microscopie confocale sur un système capable de générer des images de super-résolution (Live SR) avec la technique de PREM (platinum-replica electron microscopy). L'identification des myotubes sur des lamelles quadrillées (µdish, Ibidi, France) lors de l'imagerie photonique permet de retrouver le même myotube sur la réplique de métal et ainsi de superposer le marquage de Cav-3 avec l'ultrastructure sous-jacente (Figure 42).



**Figure 42. Microscopie corrélative de Cav-3 à la surface des myotubes humains.**

(A), (B) et (C) Images de microscopie corrélative d'un myotube humain exprimant Cav-3-GFP. Les images sont obtenues à des grossissements croissants de gauche à droite qui combinent des images de microscopie à super-résolution de Cav-3-GFP avec les images du même myotube obtenues par PREM. Dans cet exemple on peut voir que la surface interne/cytoplasmique d'un myotube décapé est criblée de groupements de cavéoles marquées par la GFP et qui sont indiquées par des pointes de flèches blanches dans (C).

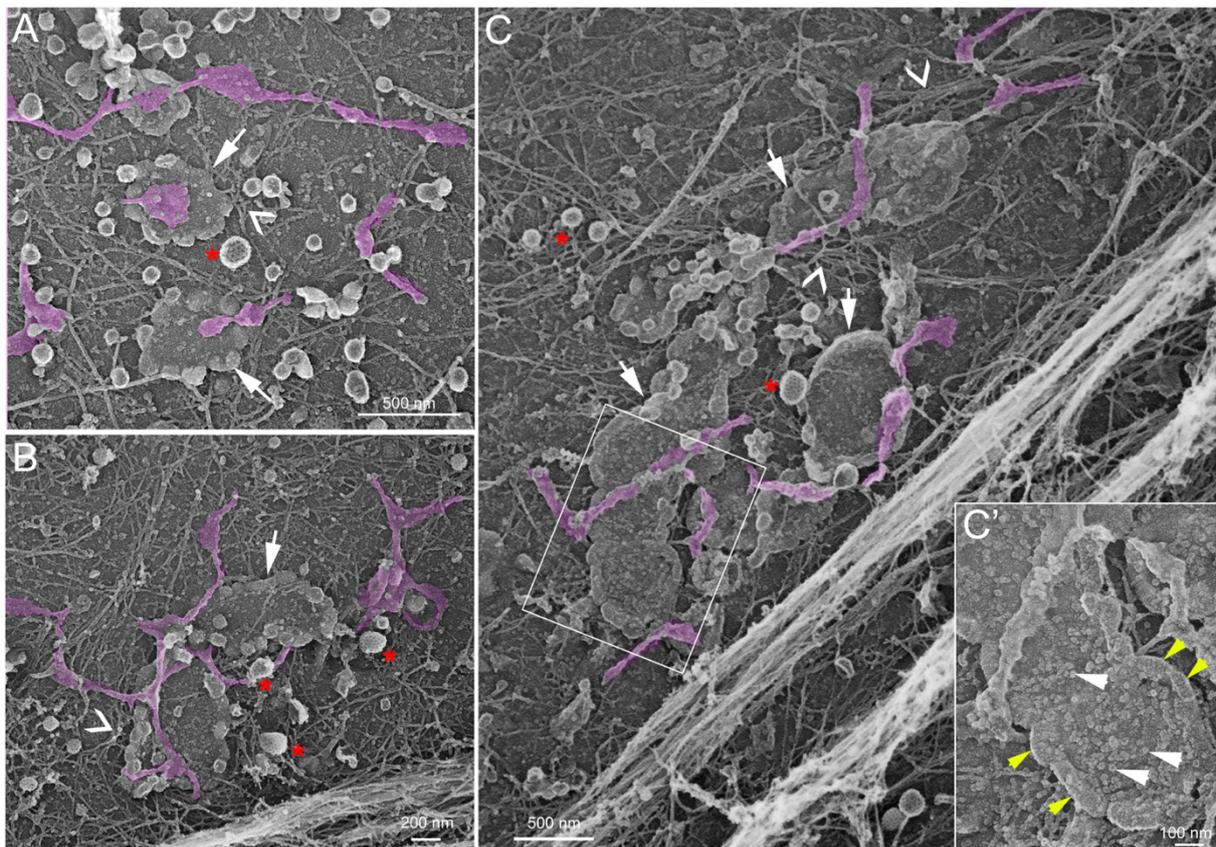
Grâce à la microscopie corrélative, j'ai pu visualiser directement l'ultrastructure des cavéoles musculaires en ciblant des régions d'intérêt présentant une organisation particulière des cavéoles marquées par Cav-3. Ces expériences m'ont permis de démontrer que ces structures circulaires sont marquées précisément par Cav-3 (Figure 43).



**Figure 43. Organisation des cavéoles en anneaux à la surface des myotubes visualisée par microscopie corrélative.**

(A-B) Images de microscopie corrélative combinant des images de microscopie à super-résolution de Cav-3-GFP avec les images du même myotube humain à 5 jours de différenciation obtenues par PREM. La première colonne correspond à l'observation de la fluorescence Cav-3-GFP, la colonne du milieu correspond à la même zone imagée en ME à transmission, la dernière colonne correspond à la superposition des deux images. Les flèches blanches indiquent des groupes de cavéoles présentant une organisation circulaire .

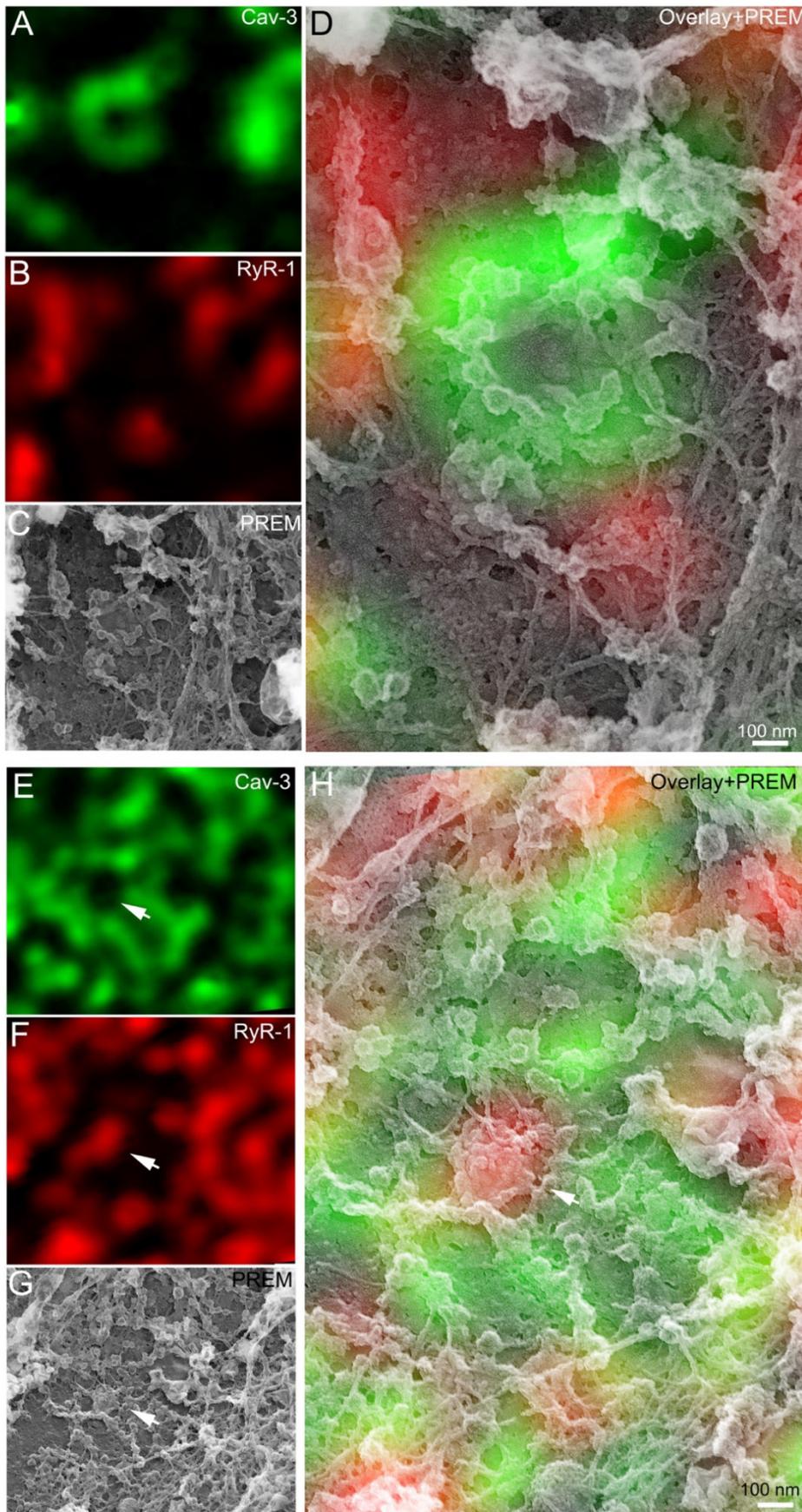
Les anneaux de cavéoles sont donc des structures qui émanent de la membrane plasmique. De plus, elles semblent entrer en interaction avec d'autres compartiments de la membrane et en particulier avec le réticulum endo/sarcoplasmique (RE/RS) cortical (Figure 44). En effet, on observe un réseau de réticulum endo/sarcoplasmique dense enchevêtré dans les anneaux de cavéoles. Les observations de microscopie corrélative de co-marquage de Cav-3 et du récepteur à la ryanodine (RyR1), se situant à la membrane du réticulum sarcoplasmique au niveau de la triade, montrent, elles aussi, une proximité entre les deux protéines (Figure 45). Les deux marquages ne colocalisent pas strictement mais les structures marquées par le RyR1 sont denses au niveau des anneaux de cavéoles. Les anneaux de cavéoles sont aussi régulièrement entourés de cytosquelette d'actine, de quelques filaments intermédiaires ainsi que de microtubules (Figure 44). Le réseau d'actine est très dense autour de ces anneaux.



**Figure 44. Les anneaux de cavéoles entrent en contact avec le réticulum endo/sarcoplasmique cortical.**

**(A-C)** Galerie d'images montrant des anneaux de cavéoles en contact avec des citernes de réticulum endo/sarcoplasmique cortical (pseudo-colorés en violet) au niveau de la partie cytosolique du sarcolemme adhérent. Les flèches blanches indiquent les anneaux de cavéoles. Les têtes de flèches vides indiquent le cytosquelette d'actine situé proche des anneaux de cavéoles. Les étoiles rouges indiquent les puits de clathrine bourgeonnant du sarcolemme. **(C')** Agrandissement de l'encart dans (C). On peut voir des protéines membranaires qui s'accumulent dans le centre de l'anneau (pointes de flèches blanches). L'anneau de cavéoles est formé de cavéoles fusionnées présentant encore leur manteau en bandelettes caractéristique (pointes de flèches jaunes).

La découverte de ces structures dans les cellules musculaires en cours de différenciation nous a permis d'émettre l'hypothèse qu'elles pourraient être impliquées dans la formation de plateformes membranaires à la surface des cellules musculaires qui participeraient à la formation des tubules-T. En effet, il a été montré dans la littérature que des quantités importantes de cavéoles en grappes sont présentes lors de la formation précoce des tubules-T en particulier au niveau de la membrane plasmique (Ishikawa 1968; Franzini-Armstrong 1991). De plus, on sait que la composition lipidique des tubules-T est similaire à la composition lipidique des cavéoles, c'est-à-dire enrichie en cholestérol et en sphingolipides (Parton et al. 1997). Les anneaux de cavéoles pourraient ainsi concentrer des protéines comme le récepteur des dihydropyridines (DHPR) à la membrane et entrer en interaction avec le RS cortical afin de former des sites de couplage excitation-contraction (E-C) précoces, permettant à ces deux compartiments membranaires distincts d'entrer en contact dès les premières étapes de la biogenèse du tubule.



**Figure 45. Images de microscopie corrélative des anneaux de cavéoles entrant en contact avec le réticulum endo/sarcoplasmique cortical.** Galerie d'images de microscopie corrélative montrant des anneaux de cavéoles en contact avec des citernes de réticulum endo/sarcoplasmique cortical. Les protéines sont marquées par des anticorps contre Cav-3 (vert) et RyR1 (rouge). **(A-D)** Images à fort grossissement d'un myotube décapé par sonication en fluorescence **(A-B)** et en ME à transmission **(C)**. **(D)** Superposition des marquages fluorescents et de l'image de ME à transmission. Les flèches blanches indiquent les sites de contact entre les tubes de réticulum observés en ME, le marquage de RyR1 et les anneaux de cavéoles. **(E-H)** Images à fort grossissement d'un myotube décapé par sonication en fluorescence **(E-F)** et en ME à transmission **(G)**. **(H)** Superposition des marquages fluorescents et de l'image de ME à transmission. Les flèches blanches indiquent les sites de contact entre les tubes de réticulum observés en ME, le marquage de RyR1 et les anneaux de cavéoles.

C'est la question à laquelle j'ai décidé de répondre dans la seconde partie de ma thèse. Comment ces anneaux formés de cavéoles sont-ils impliqués dans la formation des tubules-T et les contacts avec le RS ? Et comment ces structures se forment-elles au sarcolemme au cours de la tubulation ?

## II. LA BIOGENESE DES TUBULES-T

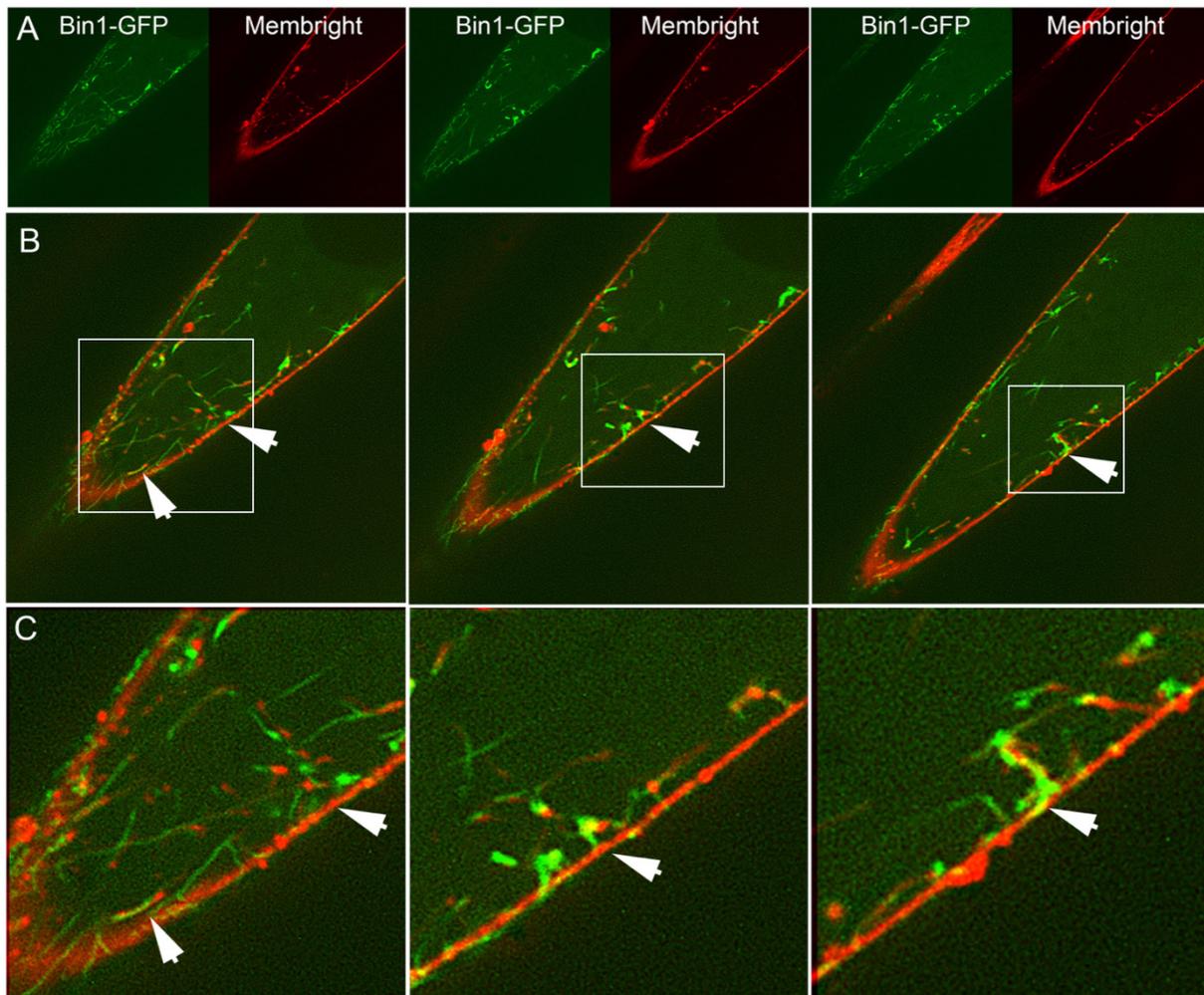
---

On sait peu de choses sur la façon dont le réseau membranaire des tubules-T est formé et maintenu. L'importance de ce réseau est majoritairement reconnue en raison de son lien avec de nombreuses myopathies, telles que les myopathies à cores, la dystrophie myotonique, les différentes formes de myopathie centronucléaire ainsi que les cavéolinopathies. Un lien entre les tubules-T naissants et les cavéoles est cependant depuis longtemps évoqué bien que le mécanisme par lequel la fusion des cavéoles pourrait conduire à la formation d'un tubule demeure à ce jour inconnu (Ishikawa 1968; C. Franzini-Armstrong 1991). J'ai donc, au cours de ma thèse, étudié ce lien en émettant l'hypothèse que les anneaux de cavéoles que j'ai découverts pourraient former des plateformes permettant le départ de plusieurs tubules à partir du sarcolemme.

### II.1. LES TUBULES-T PRESENTENT UNE ORIENTATION LONGITUDINALE DANS LES MYOTUBES *IN VITRO*

Un des problèmes majeurs dans l'analyse des tubules-T découle du manque de marqueurs protéiques pour les visualiser dans des cultures de myotubes. En effet, ils sont majoritairement constitués de lipides comme le cholestérol et certains phosphoinositides (González Rodríguez et al. 2014; Al-Qusairi et al. 2009) qui semblent être requis pour obtenir un couplage excitation-contraction fonctionnel. Afin de marquer et observer les tubules-T, j'ai utilisé la protéine Bin1 qui a été montrée comme étant un marqueur des tubules-T naissants (Butler et al. 1997; Lee 2002). Et afin de marquer spécifiquement les lipides membranaires j'ai utilisé la sonde lipidique fluorescente MemBright (Collot et al. 2019). Cette sonde imperméable permet de rendre fluorescentes les membranes biologiques sur lesquelles elle se fixe (cf. Matériel et Méthodes II.2.1). Dans notre cas, lors d'incubations brèves de 10 minutes sur des myotubes vivants, la première membrane à intégrer la sonde est le sarcolemme. Nous avons émis l'hypothèse que cette sonde pourrait rapidement diffuser dans les tubules et ainsi nous permettre de les visualiser sans passer par l'utilisation de marqueurs protéiques. Dans un second temps, la sonde devrait être endocytée et marquer les membranes intracellulaires. J'ai donc cultivé des myotubes humains et murins et les ai différenciés extensivement afin d'atteindre le meilleur niveau de maturation des

tubules-T possible. Je les ai ensuite incubés avec la sonde MemBright et j'ai immédiatement lancé l'acquisition de coupes optiques tous les 0,3nm à travers le myotube avec le microscope confocal équipé du module de super-résolution. Dans les premières minutes après ajout de la sonde, la membrane plasmique est entièrement marquée par la sonde fluorescente (Figures 46 et 47). De plus, la sonde marque des tubules qui émanent de la surface du myotube. Afin de savoir si les tubules observés avec la sonde MemBright pouvaient être considérés comme des tubules-T, nous avons utilisé le vecteur adénoviral Bin1+exon 11-GFP et ainsi observé simultanément les tubules-T et les tubes émanant du sarcolemme marqués par MemBright. Les invaginations de la membrane marquées par la sonde sont co-localisées avec le marquage de Bin1+exon11-GFP et suggèrent que les tubules-T formés par Bin1 sont en continuité avec le milieu extracellulaire puisque la sonde y diffuse rapidement (Figure 46). Ces tubes sont majoritairement présents à la surface du myotube et peu de tubes pénètrent en profondeur jusque dans le cœur de la cellule musculaire. Lors d'acquisitions à des temps plus longs que 10min, on observe l'apparition d'un marquage important des compartiments intracellulaires comme les endosomes, les lysosomes et l'appareil de Golgi périnucléaire très probablement par endocytose de la sonde puis trafic intracellulaire le long de la voie endocyttaire (résultats non montrés). Malheureusement, cette accumulation de la sonde lipidique dans les compartiments membranaires intracellulaires s'est avérée toxique pour les cellules et ne nous a pas permis d'acquérir des images sur des temps plus longs que 30 minutes. Elle reste cependant très utile pour marquer le réseau de tubules-T en contact avec la surface cellulaire et suivre ainsi ce réseau en parallèle des protéines qui le composent.

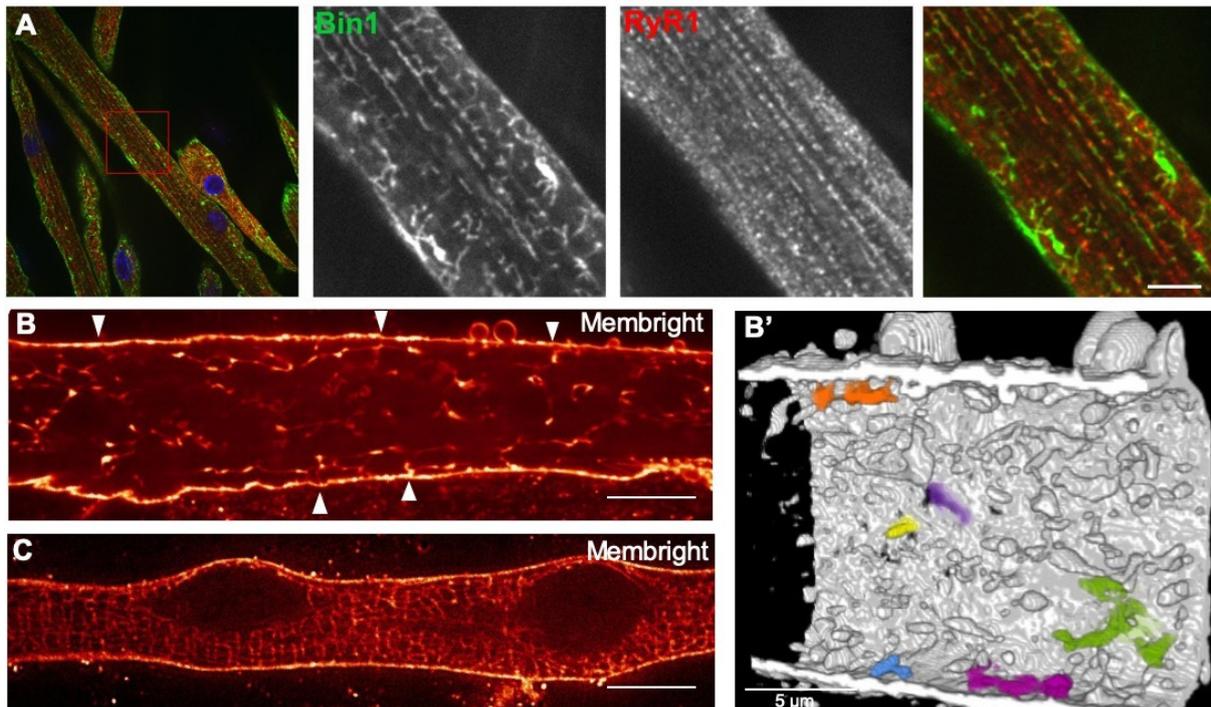


**Figure 46. Les tubules formés par Bin1 sont en contact avec le milieu extracellulaire.**

(A-C) Images de microscopie optique à super-résolution des structures rencontrées à différents plans optiques dans des myotubes murins en culture transduits par un vecteur adénoviral Bin1-GFP (vert) et immédiatement incubés avec une sonde lipidique imperméable (rouge). Les deux canaux vert/rouge sont séparés dans (A). (C) Images à plus fort grossissement correspondant à l'encart dans (B) montrant la colocalisation entre le marquage de Bin1 et celui de la sonde lipidique. Les pointes de flèches blanches indiquent les tubules marqués par Bin1, émanant de la surface et marqués par la sonde. Barre d'échelle : 10µm.

Pour étudier la formation des tubules-T au cours de la différenciation nous avons donc utilisé un anticorps fluorescent dirigé contre la protéine spécifique des tubules-T naissants, Bin1. Comme décrit dans la littérature (Veratti 1902; Kelly 1980), nous avons observé grâce au marquage Bin1 un réseau de tubules-T majoritairement longitudinaux présentant des petites bifurcations transversales qui émanent de la membrane plasmique (Figures 46 et 47 (C-D)). Nous avons alors voulu comparer la localisation de Bin1 avec la localisation d'autres marqueurs des tubules-T, y compris les protéines des triades comme le récepteur à la ryanodine de type 1 (RyR1). Par des doubles marquages immunofluorescents, j'ai montré une colocalisation partielle de ces tubes avec RyR1 (Figure 47 (A-B)) ou les différentes isoformes de la triadine qui

marquent le RS jonctionnel en formation. La colocalisation du marquage Bin1-GFP avec la fluorescence de la sonde MemBright a permis de déterminer que ce sont bien les tubules-T que nous observons (Figure 46) mais que les protéines des triades telles que RyR1 ne suivent pas le marquage exact du tubule-T. Elles sont plutôt localisées sous forme de "cluster" formant des points distincts situés tout le long du tubule longitudinal.



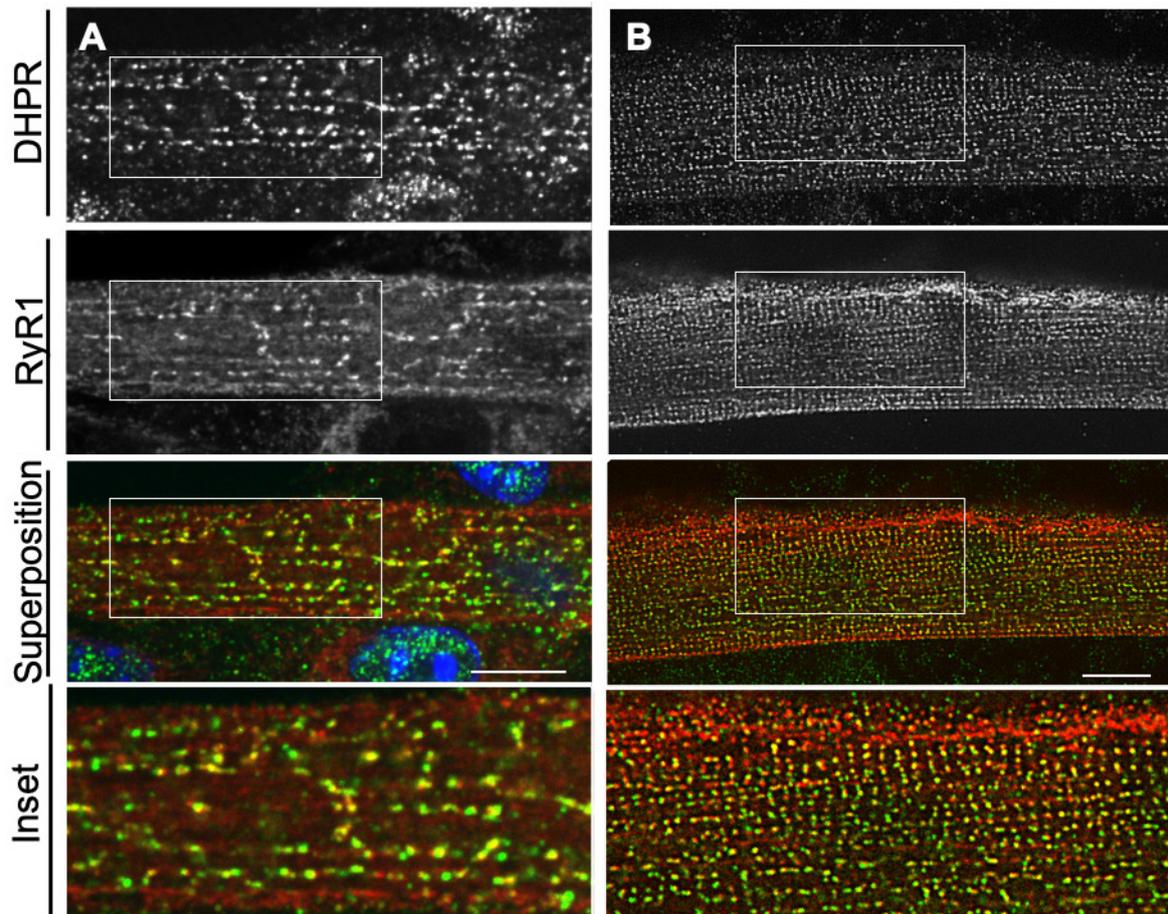
**Figure 47. Les tubules-T sont organisés longitudinalement lors de la différenciation *in vitro* avec un départ transversal depuis la membrane plasmique.**

(A) Marquage immunofluorescent avec des anticorps dirigés contre Bin1 (vert) et RyR1 (rouge) sur des cultures de myotubes primaires différenciés pendant 7 jours sur Matrigel. Le marquage RyR1 est longitudinal. Le marquage Bin1 apparaît comme tubulaire partant de la membrane plasmique. (B) Image d'un myotube dont les tubules-T sont marqués par la sonde lipidique MemBright. On remarque que les tubules émanent transversalement du sarcolemme et s'organisent longitudinalement dans la longueur du myotube (têtes de flèches blanches). (B') Reconstruction 3D du marquage du myotube (B) par la sonde lipidique MemBright. Certains tubules sont colorés à partir de la membrane plasmique afin de permettre une meilleure visualisation de leur orientation. (C) Image de la surface d'un myotube marqué par une incubation rapide (10min) avec la sonde MemBright. Barres d'échelle : 10µm .

Ces expériences m'ont ainsi permis de montrer l'orientation majoritairement longitudinale et la localisation superficielle des tubules-T dans les cultures de myotubes humains et murins. Les travaux de microscopie électronique de Clara Franzini-Armstrong sur le développement musculaire post-natal murin ont montré que l'organisation transversale qui permet l'invagination des tubules-T en profondeur entre les sarcomères n'apparaissait *in vivo* qu'environ deux semaines après la naissance (Franzini-Armstrong 1991). Nous avons émis l'hypothèse que des facteurs externes

tels que la contraction musculaire, l'innervation et la formation d'une matrice extracellulaire pouvaient être nécessaires à la réorientation des tubes transversalement. J'ai donc appris la technique de co-cultures de myotubes et de motoneurones pour permettre l'innervation des cellules musculaires *in vitro*. Cependant, ces expériences n'ont pas permis de différencier plus extensivement les myotubes et d'obtenir des tubules organisés transversalement et identiques à ceux observés dans le muscle adulte (résultats non montrés), l'innervation *in vitro* dans nos conditions ne suffirait donc pas pour réorienter les tubules-T transversalement.

Bien que les tubules-T gardent leur orientation longitudinale au cours de la différenciation *in vitro*, les protéines de la triade, elles, sont capables d'acquérir une orientation transversale caractéristique d'une différenciation extensive (Falcone et al. 2014). Cinq jours après induction de la différenciation, le co-marquage du DHPR (canal calcique du tubule-T) et du RyR1 (canal calcique du RS), par immunofluorescence sur des myotubes murins, apparaît majoritairement longitudinal (Figure 48 (A)). Lorsque les myotubes sont différenciés sur une matrice extracellulaire épaisse et recouverts d'une fine couche de Matrigel (#356231 ; Corning, France) durant neuf à dix jours, le marquage caractéristique des triades matures en doubles rangées de points transversales retrouvé dans les fibres musculaires adultes (Falcone et al. 2014) est clairement observable (Figure 48 (B)). Cette organisation est surtout présente à la surface des myotubes et cette périodicité du marquage RyR1/DHPR est perdue en profondeur du myotube.



**Figure 48. Les marqueurs des triades sont organisés longitudinalement puis transversalement lors de la différenciation *in vitro*.**

**(A)** Marquage immunofluorescent du récepteur des dihydropyridines (DHPR) (vert) et du récepteur à la Ryanodine (RyR1) (rouge) dans des myotubes primaires murins différenciés pendant 5 jours. Le marquage apparaît longitudinal. **(B)** Marquage immunofluorescent du DHPR (vert) et du RyR1 (rouge) sur des myotubes primaires murins extensivement différenciés pendant 10 jours. Le marquage apparaît en doubles rangées de points. Barre d'échelle : 10 $\mu$ m .

Notre modèle cellulaire est donc capable de reproduire les étapes précoces de la différenciation des cellules musculaires *in vitro*. C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier les cavéoles dans ce contexte de différenciation et en particulier leur localisation en rapport avec les protéines marqueurs des tubules-T et de la triade.

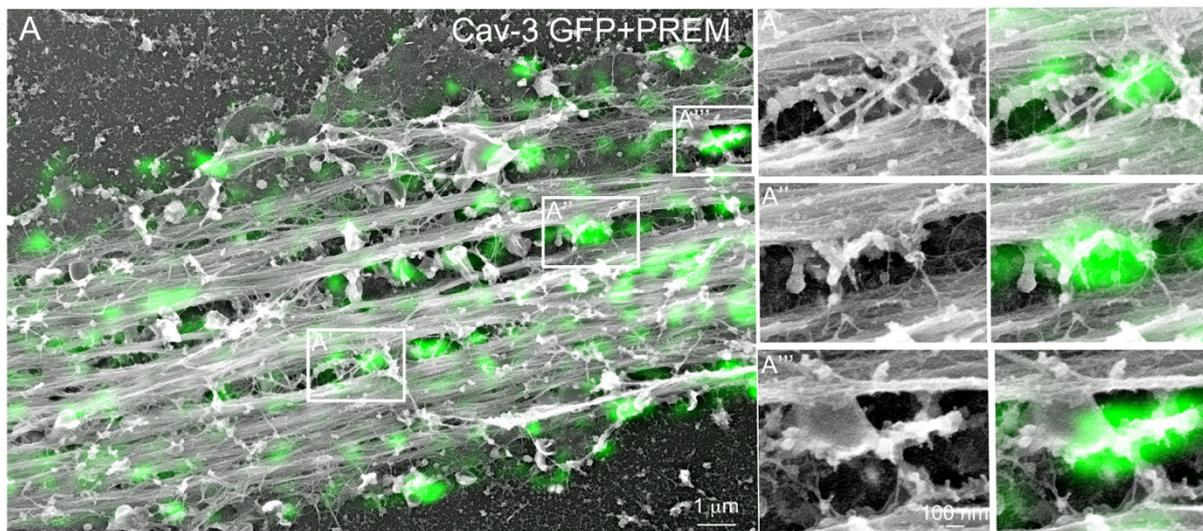
## II.2. LA BIOGENESE DES TUBULES-T

La technique de microscopie électronique sur réplique de métal après décapage des cellules par sonication permet d'accéder à des vues de la membrane plasmique cytosolique de face et donc d'observer facilement et précisément les structures du sarcolemme. Les questions auxquelles nous voulons répondre à ce stade de notre étude sont les suivantes : Comment les anneaux de cavéoles entraînent-ils la

formation des tubules-T ? Les anneaux de cavéoles présentent-ils des interactions avec Bin1 ?

Afin de visualiser simultanément l'ultrastructure des myotubes et la localisation des protéines d'intérêt, j'ai effectué des expériences de microscopie corrélative en combinant les marquages fluorescents de Cav-3 avec d'autres protéines d'intérêt, telles que Bin1 et RyR1 sur des myotubes issus de cultures primaires de cellules murines.

J'ai ainsi pu montrer qu'en plus des cavéoles canoniques rencontrées à tous les stades de la formation des muscles, les myotubes différenciés extensivement présentent de nombreux tubes marqués par Cav-3 (Figure 49). L'inspection minutieuse des micrographes permet de retrouver le même matériel protéique, les petits filaments formés par l'association des oligomères de cavéoline et les oligomères de cavines sur des tubes courts qui s'invaginent depuis la membrane plasmique des myotubes. Cependant, les tubes marqués par Cav-3 sont souvent issus de structures membranaires complexes et pléomorphes. Ils n'émanent jamais directement du sarcolemme et semblent bien plus complexes que de simples tubes formés par des cavéoles mises bout à bout.



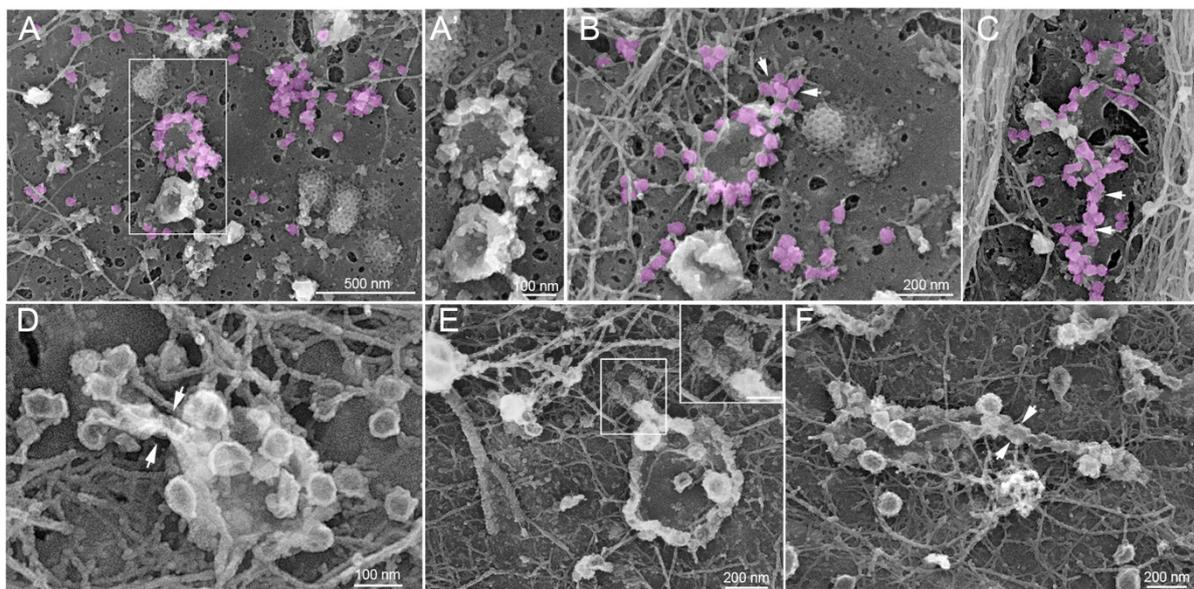
**Figure 49. Les cavéoles forment des tubes qui sont marqués par Cav-3.**

L'image de gauche correspond à une image à faible grossissement d'un myotube murin décapé par sonication. L'image du marquage Cav-3 (vert) en super-résolution est superposée à l'image de ME à transmission. (A'-A''') Images à fort grossissement des régions correspondant aux encarts de l'image de gauche. Pour chaque encart la fluorescence correspondant au marquage Cav-3 est superposée avec l'image de PREM dans l'image de droite. On remarque un marquage Cav-3 de structures tubulaires au niveau du sarcolemme.

J'ai voulu savoir suite à ces observations, si les tubes observés par la PREM et la microscopie corrélative pouvaient avoir un lien avec les anneaux de cavéoles décrits précédemment.

### II.2.1. Les cavéoles semblent fusionner au niveau des anneaux de cavéoles

J'ai émis l'hypothèse dans la première partie de mes travaux que la formation des tubules-T dans les cellules musculaires serait dépendante de la formation des anneaux de cavéoles, les "*caveolae daisies*". Pourtant, le mécanisme par lequel des tubes pourraient être formés à partir des plateformes cavéolaires restait énigmatique.

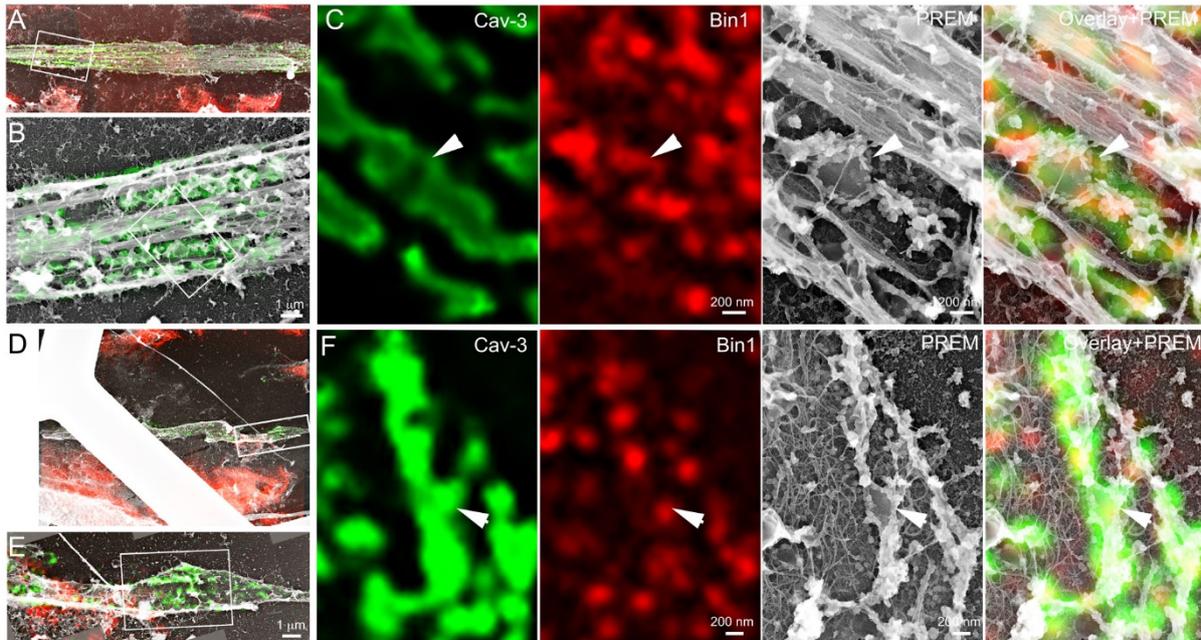


**Figure 50. Les tubes émanent des anneaux de cavéoles.**

**(A-C)** Galerie d'images à fort grossissement des anneaux de cavéoles observés sur des myotubes contrôles issus de cultures primaires de souris et décapé par sonication avant le PREM. Les cavéoles sont pseudo-colorées en violet pâle. Les flèches blanches indiquent les tubes perlés qui émanent de structures formées de cavéoles en anneaux. **(A')** Image à plus fort grossissement correspondant à l'encart dans (A). **(D-F)** Galerie d'images à fort grossissement des anneaux de cavéoles observés au sarcolemme de myotubes primaires de souris décapés par sonication et observés en ME à transmission. Les flèches blanches indiquent les tubes perlés qui émanent de structures formées de cavéoles en anneaux.

Nous avons donc observé plus précisément en ME sur répliques de métal ces structures en anneaux à la surface cytosolique du sarcolemme des myotubes. Et au cours de mes observations, j'ai remarqué que, parfois, les anneaux étaient connectés à un tube perlé présentant les mêmes bandelettes caractéristiques du manteau cavéolaire (Figure 50). Afin d'affiner cette découverte, j'ai une nouvelle fois eu recours à la microscopie corrélative pour tester l'hypothèse selon laquelle les anneaux de

cavéoles pourraient donner naissance à des plateformes permettant l'élongation de tubes de membrane plasmique marqués par Bin1 (Figure 51). Pour cela j'ai réalisé un double marquage Cav-3 et Bin1 avant d'observer les répliques de membrane par microscopie électronique. En utilisant la microscopie corrélative, j'ai montré la présence de Bin1 marqué par des anticorps sur les anneaux de cavéoles et les tubules qui en émanent (Figure 51 Inserts).



**Figure 51. Les anneaux de cavéoles forment des plateformes à partir desquelles émanent des tubules sur lesquels on peut détecter du Bin1 endogène.**

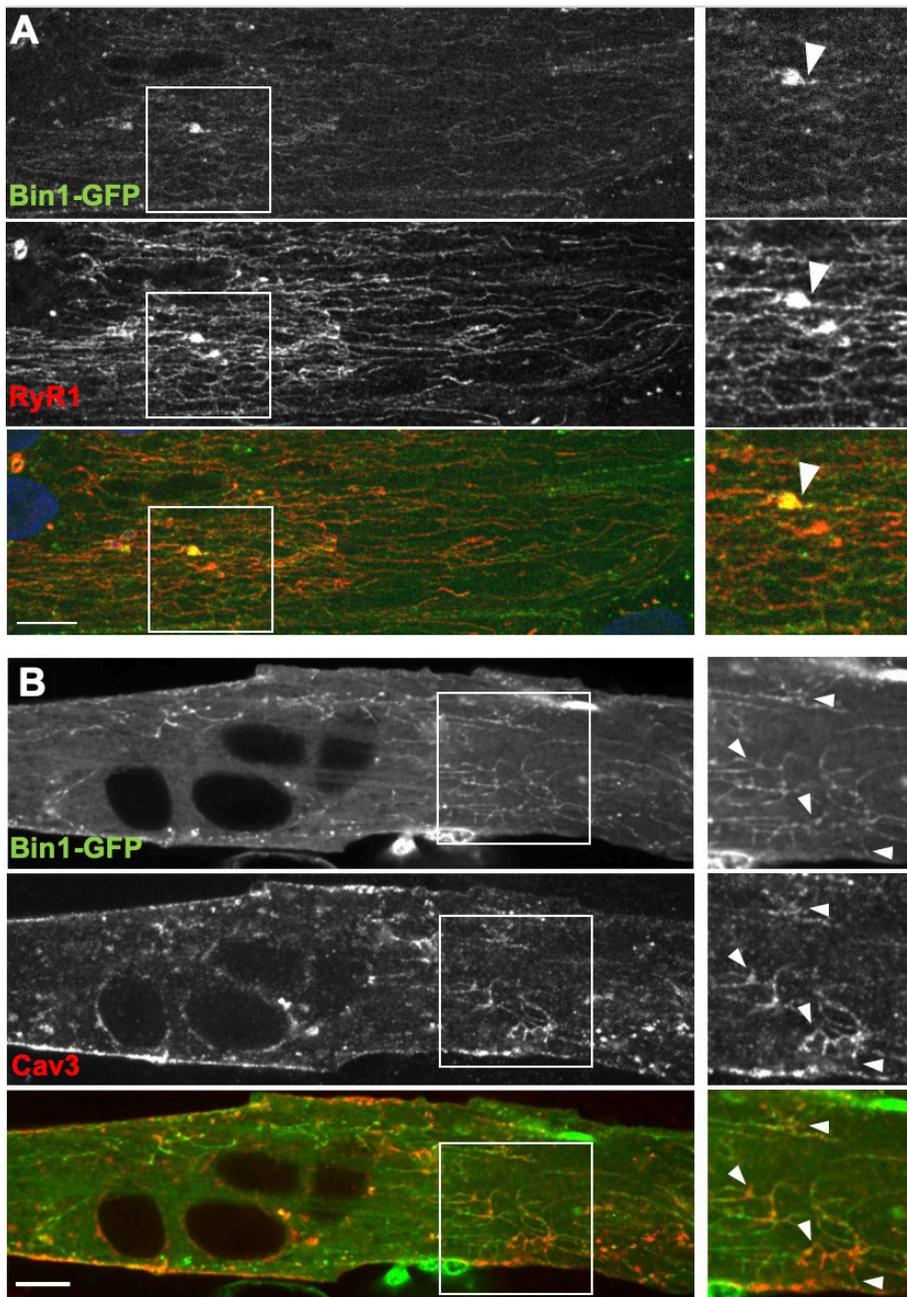
(A-C) Microscopie corrélative entre le marquage de Cav-3 (vert) et de Bin1 (rouge) sur un myotube issu de cultures primaires murines extensivement différenciés durant 9 jours. (B) Image correspondant à un grossissement de l'encart dans (A) présentant le marquage Cav-3. (C) Images à fort grossissement correspondant à l'encart dans (B). Les têtes de flèches blanches indiquent la présence de Bin1 et de Cav-3 sur des anneaux de cavéoles desquels émanent des tubes perlés de cavéoles. (D-F) Exemple supplémentaire de marquage Cav-3 et Bin1 sur les cultures primaires. (E) Image correspondant à un grossissement de l'encart dans (D). (F) Images à fort grossissement correspondant à l'encart dans (E). Les têtes de flèches blanches indiquent la présence de Bin1 et de Cav-3 sur des anneaux de cavéoles desquels émanent des tubes perlés de cavéoles.

### II.2.2. Bin1 entraîne la formation de plateformes circulaires à la membrane plasmique tout en tubulant les lipides

La tubulation des cavéoles en tubes perlés nous a amenés à émettre l'hypothèse selon laquelle des protéines capables de tubuler les membranes pouvaient être impliquées dans le processus en interagissant directement avec les cavéoles de la surface cytosolique du sarcolemme. J'ai donc décidé d'étudier la protéine Bin1, bien

connue pour son implication dans la formation des tubules-T et qui tubule les membranes biologiques grâce à son domaine N-BAR (Lee 2002). Bin1 est aussi capable d'interagir avec les tubules-T grâce à son domaine de liaison aux phosphoinositides codé par l'exon 11, spécifiquement inclus dans le muscle squelettique (Lee 2002; Razzaq et al. 2001).

Nous avons utilisé pour cela le vecteur adénoviral surexprimant la protéine Bin1-GFP et contenant l'exon 11, Bin1+exon11-GFP. Cela nous a permis d'observer en microscopie photonique puis électronique les tubules formés par Bin1, d'étudier la nature des tubules de membranes ainsi que l'effet général de la protéine sur le sarcolemme et les cavéoles. Ce vecteur viral a été décrit dans la littérature comme entraînant une tubulation excessive des membranes par Bin1+exon 11 (Fugier et al. 2011). Et en effet, lorsqu'on infecte des cellules en culture, on observe en immunofluorescence la formation d'un réseau de tubules intracellulaires très denses (Figure 52).



**Figure 52. La surexpression de Bin1-GFP entraîne la formation de tubes qui émanent de la membrane plasmique.**

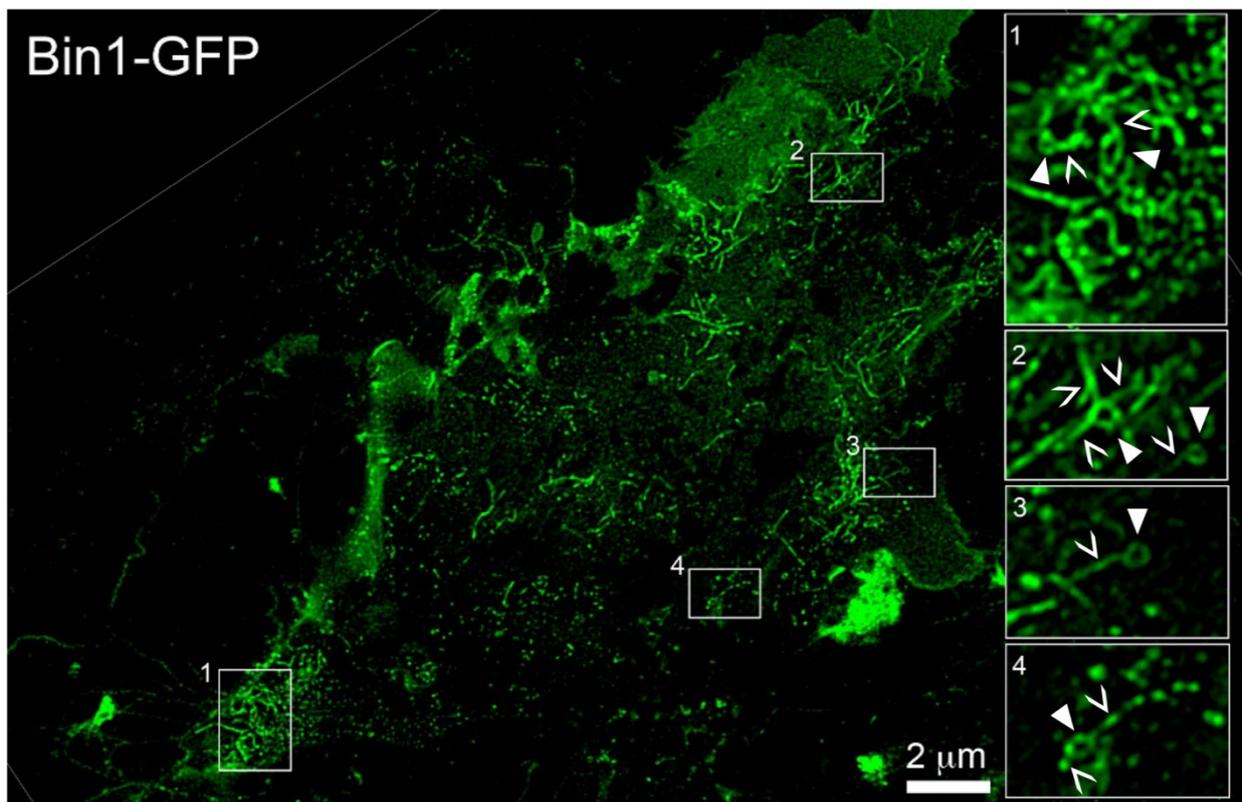
(A) Images de microscopie à super-résolution de myotubes humains transduits par Adv Bin1-GFP (vert) et marqués avec des anticorps contre RyR1 (rouge). Le réseau de réticulum

endo/sarcoplasmique marqué par RyR1 ne colocalise que partiellement avec le réseau de tubes formés par Bin1. Les têtes de flèches blanches indiquent des zones de colocalisation des deux marquages. (B) Image de microscopie à super-résolution de myotubes humains transduits par Adv Bin1-GFP (vert) et marqués avec des anticorps contre Cav-3 (rouge). Le marquage immunofluorescent de Cav-3 est partiellement colocalisé avec le marquage de Bin1 mais contrairement à RyR1,

Cav-3 marque le même réseau de tubules que Bin1 (têtes de flèches blanches). Barres d'échelle : 10μm.

Les tubules formés par Bin1 ne colocalisent que partiellement avec le réseau de tubes formés par RyR1 correspondant au réticulum sarcoplasmique. Mis à part certains points de contact qui pourraient correspondre à des spécialisations du réticulum en citernes terminales, les deux réseaux formés par RyR1 et Bin1 sont distincts (Figure 52 (A)). J'ai ensuite voulu savoir comment était localisée Cav-3 dans les myotubes surexprimant Bin1. Grâce à des marquages immunofluorescents avec des anticorps spécifiques de Cav-3, j'ai montré que Cav-3 est localisée sur les tubules formés par Bin1 (Figure 52 (B)).

Mais quel est l'effet de la surexpression de Bin1 sur les cavéoles du sarcolemme ? Après transduction des myotubes pendant 24h avec le vecteur adénoviral, des expériences de microscopie photonique m'ont permis d'analyser la localisation de Bin1 dans des myotubes en culture. Comme précédemment, la surexpression de Bin1+exon 11 dans les myotubes induit la formation de très nombreux tubes majoritairement présents à la surface du myotube (Figure 53). Nous avons constaté, à différents stades de différenciation, que la surexpression de Bin1 induit la formation de tubes longitudinaux émanant de la membrane plasmique. Grâce à l'utilisation de la microscopie à super-résolution permettant d'atteindre une résolution de 100-120nm, j'ai pu montrer que Bin1-GFP formait très fréquemment des structures circulaires à la surface des myotubes transduits, structures dont émanent des tubes (Figure 53 (1-4)).

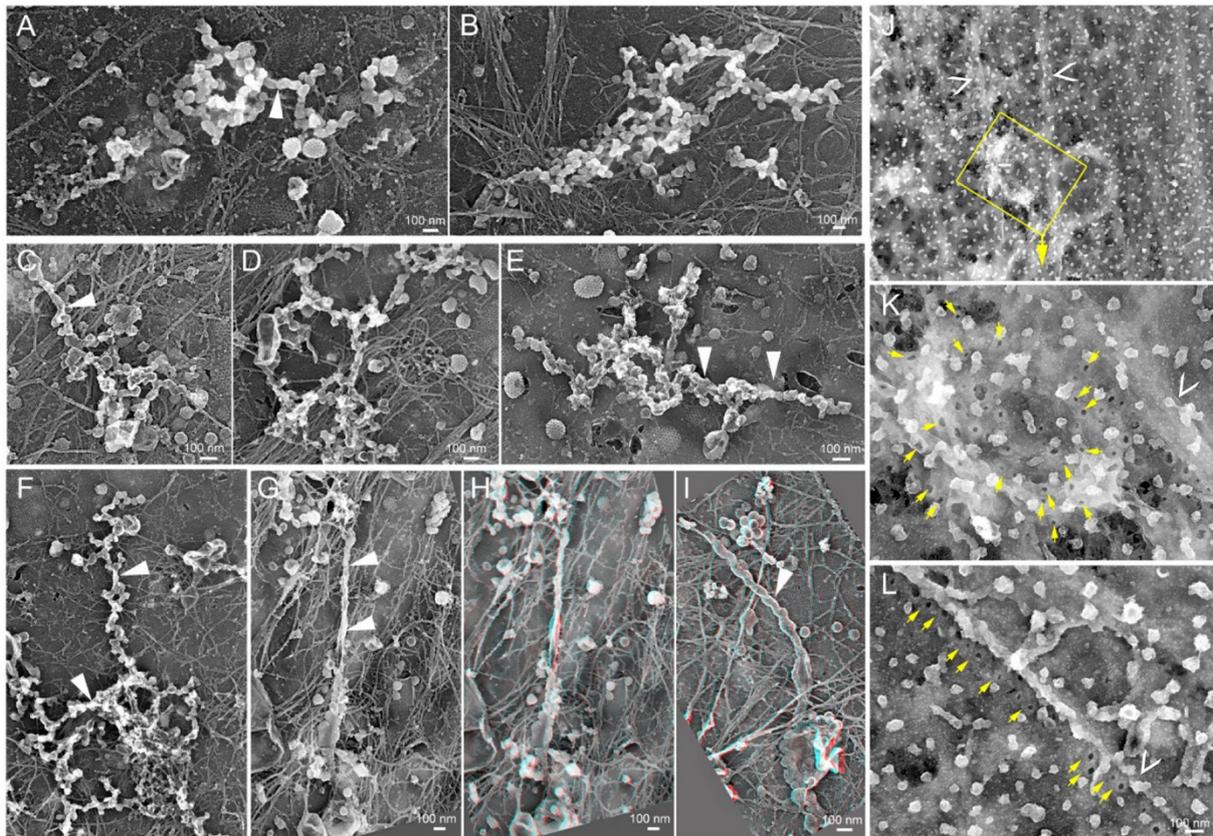


**Figure 53. Anneaux et tubes de Bin1-GFP à la surface des myotubes humains.**

Image de microscopie à super-résolution de myotubes humains transduits par Adv Bin1-GFP (vert) puis décapés par des ultrasons. L'image de gauche montre la surface adhérente de la membrane. Les encarts numérotés de **1** à **4** montrent l'organisation circulaire (têtes de flèches blanches) des structures formées par Bin1 et dont émanent fréquemment des tubes (têtes de flèches vides).

### II.2.3. Cav-3 et les cavéoles utilisent Bin1 comme échafaudage afin de former des tubules

Sachant que nous avons observé dans la première partie de ce projet des anneaux formés par les cavéoles, le marquage circulaire de Bin1+exon 11-GFP nous a particulièrement intrigués. D'autant plus qu'à l'instar des anneaux de cavéoles, des tubes semblent émaner des anneaux de Bin1+exon 11 (Figures 53 et 54). Afin de visualiser l'ultrastructure des objets formés par Bin1+exon 11-GFP à la surface des myotubes, nous avons utilisé la technique de PREM sur des myotubes humains transduits 24h avec le vecteur Adv Bin1+exon 11-GFP. Les images de PREM montrent que Bin1+exon 11 induit la formation de structures tubulaires perlées qui émanent d'anneaux (Figure 54). J'ai ensuite voulu savoir si les structures formées par Bin1+exon 11 étaient connectées au milieu extracellulaire, c'est-à-dire si elles pouvaient avoir comme origine la membrane plasmique. L'ouverture des cavéoles (entre 20 et 25 nm de diamètre) ainsi que les anneaux formés par Bin1 à l'intérieur de la cellule peuvent être visualisés en observant les cellules de l'extérieur sans les avoir préalablement décapées par sonication (Figure 54 (J-L)). Dans ces exemples, j'ai montré que des trous de la taille du cou des cavéoles sont retrouvés et que ceux-ci présentent une organisation circulaire ou en rangées de points longitudinaux (Figure 54 (J-L)).



**Figure 54. Surexpression de Bin1 in vivo dans des myotubes humains**

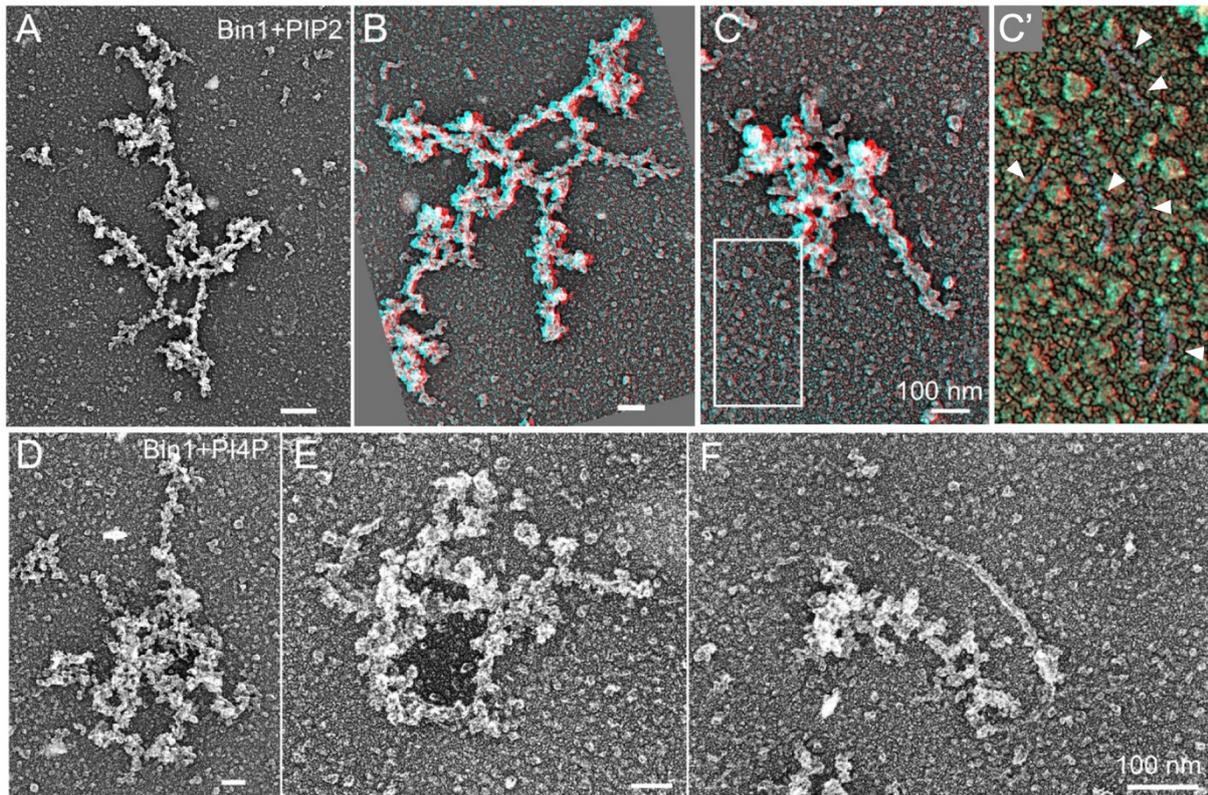
(A-I) Galerie d'images à fort grossissement des structures rencontrées à la surface des myotubes humains en culture surexprimant Bin1+exon 11. Les myotubes sont observés en ME à transmission après décapage par sonication. Les pointes de flèche blanches indiquent les tubules émanant des anneaux induits par la surexpression de Bin1+exon 11. (J-L) Galerie d'images à fort grossissement des structures rencontrées à la surface des myotubes humains entiers (non décapés lors de la sonication) en culture surexprimant Bin1+exon 11. (J) Image de ME à transmission à faible grossissement d'un myotube entier. Des structures sous-jacentes à la membrane plasmique sont visibles. (K) Vue à fort grossissement de l'encart dans (J). Les anneaux formés par Bin1 à l'intérieur sont aussi retrouvés en regardant les cellules entières de l'extérieur. Les flèches jaunes indiquent l'ouverture des cavéoles (20 à 25 nm de diamètre) retrouvées à l'extérieur des myotubes surexprimant Bin1+exon 11. (L) Vue à fort grossissement de la membrane plasmique d'un myotube entier en ME à transmission. Les flèches jaunes indiquent l'ouverture des cavéoles (20 à 25 nm de diamètre) retrouvées à l'extérieur des myotubes surexprimant Bin1. Les ouvertures des cavéoles peuvent s'organiser longitudinalement le long de fibres de stress d'actine (indiquées par les têtes de flèches vides).

Les structures formées par la surexpression de Bin1 dans des myotubes ressemblent donc étrangement aux anneaux de cavéoles, et sont positives au marquage de Bin1 (Figure 56) avec un diamètre pouvant varier de 100 à 500nm.

Des structures similaires ont été observées sur les bicouches lipidiques indiquant que Bin1 est capable de former spontanément ces plateformes. Une collaboration avec le Dr. Laura Picas à l'institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier (IRIM) nous a permis d'étudier la protéine Bin1 recombinante déposée sur une bicouche lipidique afin d'observer sa structure et son interaction avec les membranes. Nous avons

effectué exactement le même protocole pour la protéine recombinante sur bicouche lipidique que pour la préparation des échantillons cellulaires. Nous avons alors pu visualiser directement sur la membrane de support le type de structures formées par l'auto-assemblage de Bin1 (Figure 55). De façon particulièrement remarquable, les structures formées par Bin1 sur des bicouches lipidiques ressemblent aux structures formées par Bin1 à la surface des myotubes en culture. Elles sont invariablement composées d'une partie circulaire dont le diamètre peut varier de 100 à 500 nm de diamètre et de prolongements tubulaires qui irradient de cette partie centrale (Figure 55). La surexpression de Bin1 sur une bicouche lipidique mime donc l'effet de la surexpression de Bin1 dans une cellule et entraîne la formation excessive de tubules perlés provenant de la membrane plasmique par sa capacité d'auto-assemblage en un échafaudage circulaire dont émanent les tubes.

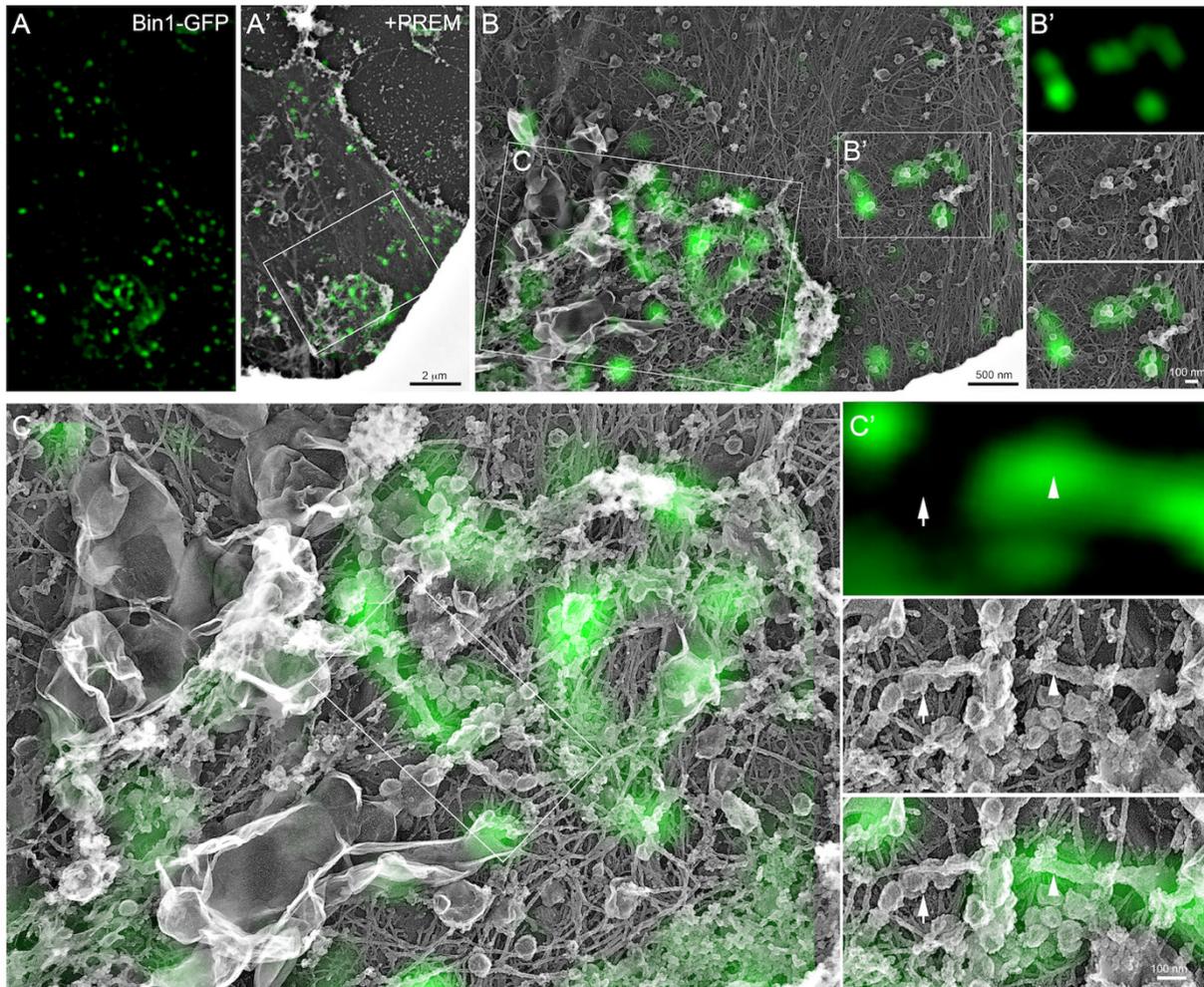
L'inspection minutieuse des répliques de métal nous a permis de visualiser directement la protéine Bin1 recombinante sur la bicouche lipidique artificielle (Figure 55 (C')). La majorité des objets présents sur la réplique de métal de la bicouche lipidique sont globulaires et correspondent très probablement à des formes repliées de la protéine Bin1 ou à des homo-multimères assemblés entre eux avant d'entrer en interaction avec la membrane. Nous avons tout de même remarqué de nombreux objets de forme filamenteuse de quelques dizaines de nm de longueur et de 5 nm d'épaisseur qui pourraient correspondre à la forme étalée de Bin1 (Figure 55 (C')). De par sa capacité à courber les membranes avec lesquelles il interagit et grâce à son domaine BAR, Bin1 pourrait ainsi s'auto-assembler de manière circulaire et former un échafaudage. Suite au recrutement des cavéoles, cet échafaudage permettrait de former les premiers tubules-T longitudinaux observés au cours de la différenciation des myotubes.



**Figure 55. Formation d'assemblages in vitro sur des bicouches lipidiques artificielles.**

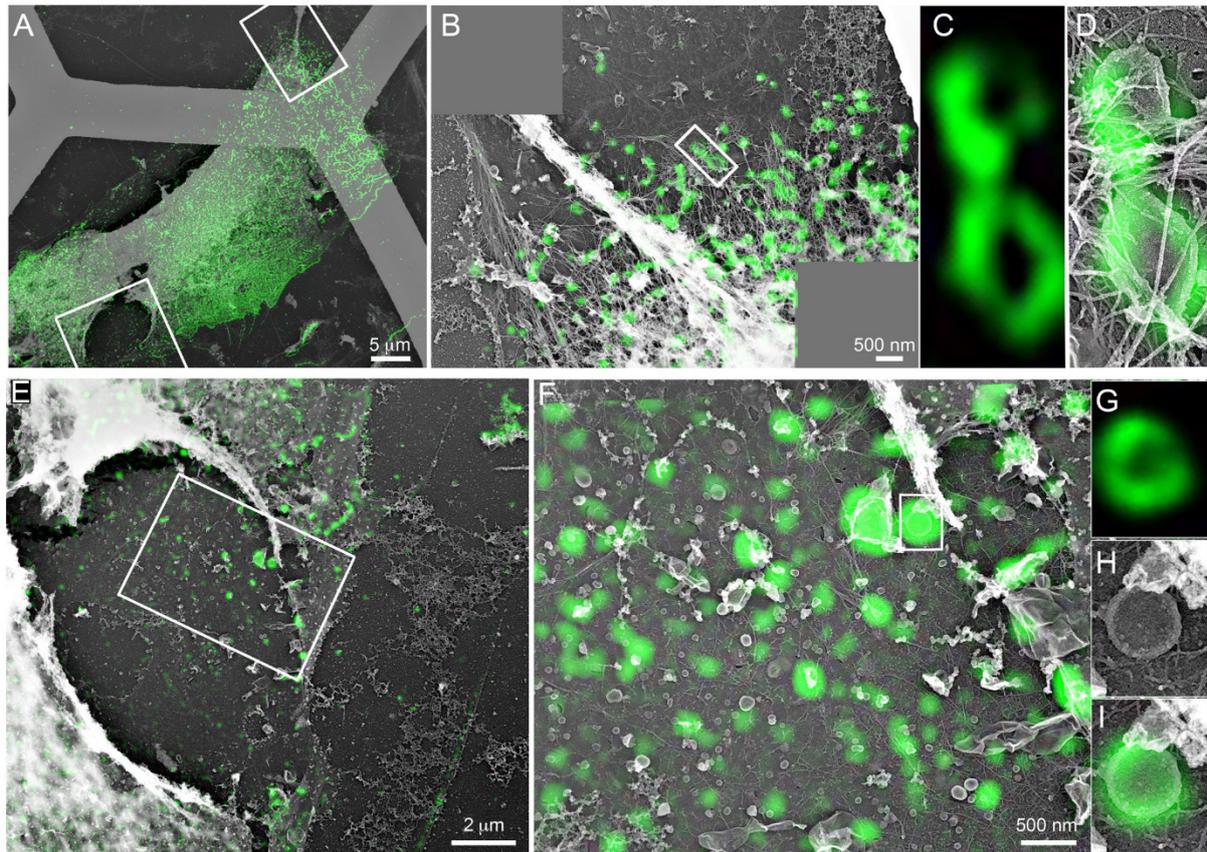
(A-C') Images de microscopie électronique sur répliques de métal de structures tubulaires perlées induites par la surexpression de Bin1 et phosphatidylinositol-4,5-biphosphate sur des bicouches lipidiques artificielles. Elles sont composées d'une partie circulaire dont le diamètre peut varier de 100 à 500 nm de diamètre et de prolongements tubulaires qui irradient de cette partie centrale. (C') Grossissement de l'encart de (C) présentant des objets de forme filamenteuse indiqués par les flèches blanches (en gris) sur une membrane pseudo-colorée en jaune. Ils mesurent quelques dizaines de nm de longueur et de 5 nm d'épaisseur et pourraient correspondre à la forme étalée de Bin1. (D-F) Images de microscopie électronique sur répliques de métal de structures tubulaires perlées induites par la surexpression de Bin1 et de phosphatidylinositol-4-phosphate sur des bicouches lipidiques artificielles. Elles sont, elles aussi, composées d'une partie circulaire et de prolongements tubulaires qui irradient depuis celle-ci.

Ces observations nous ont donc conduits à étudier, par microscopie corrélative, Cav-3 et les cavéoles au sarcolemme de myotubes surexprimant Bin1. Je me suis demandé comment les deux protéines étaient localisées l'une par rapport à l'autre à la surface des cellules musculaires. J'ai effectué les expériences de microscopie corrélative sur des myotubes transduits par le vecteur Adv Bin1+exon 11-GFP (Figure 56). Ces expériences m'ont permis de montrer que Bin1 est directement recruté sur les formations tubulo-vésiculaires de la membrane plasmique induites par sa surexpression. Nous avons ainsi retrouvé un marquage de Bin1 sur des tubes perlés présents dans des myotubes surexprimant Bin1+exon 11-GFP (Figure 56).



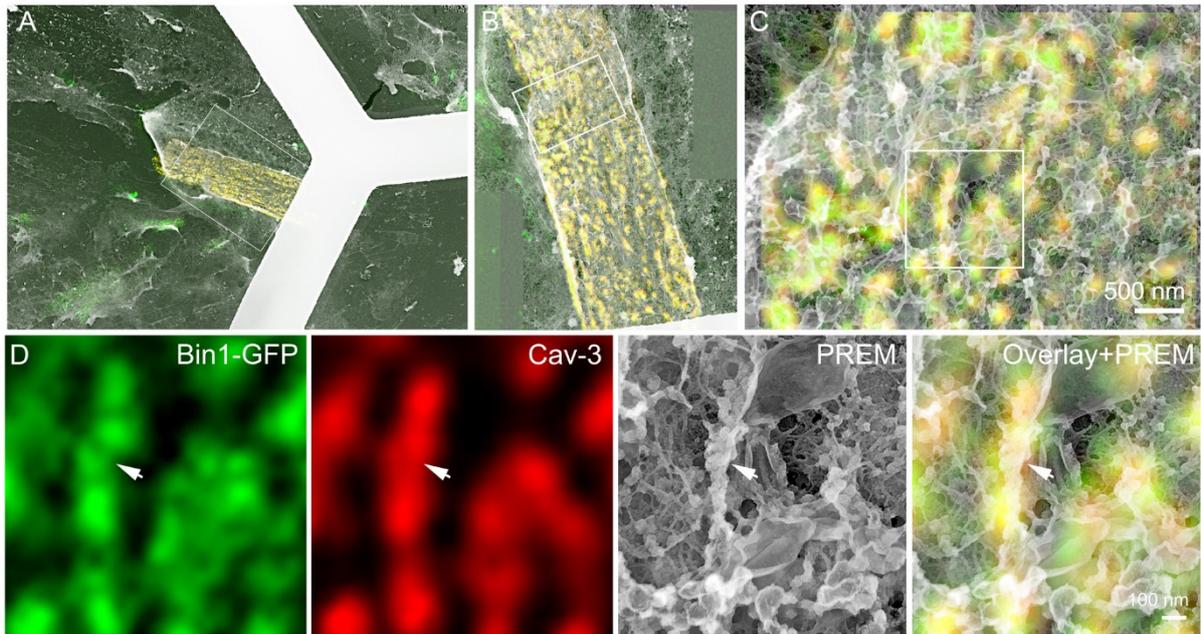
**Figure 56. Microscopie corrélative de Bin1+exon 11-GFP sur des myotubes humains en culture.** (A-C) Images de microscopie corrélative avec des grossissements croissants du marquage fluorescent obtenu par surexpression de Bin1-GFP (vert) dans des myotubes humains superposé sur les images de ME correspondantes. (A) Image correspondant au marquage fluorescent de Bin1 en super-résolution, et superposé à l'image en ME à transmission (A'). (B) Image correspondant au grossissement de l'encart dans (A). (B') Vues à fort grossissement de l'encart de droite de (B). Le marquage Bin1-GFP est retrouvé sur des structures tubulaires perlées ou lisses et sur des anneaux de cavéoles. (C) Image de microscopie corrélative correspondant à l'encart de gauche dans (B). (C') Vues à très fort grossissement de l'encart dans (C). Les flèches blanches indiquent un tube de cavéoles perlé marqué par Bin1+exon 11-GFP dans sa partie la plus lisse.

De manière étonnante, la fluorescence correspondant à la localisation de Bin1 est souvent associée à des régions de la membrane dépourvues de cavéoles au niveau ultrastructural. Grâce à l'utilisation de la microscopie à super-résolution afin d'observer le marquage Bin1 après surexpression de Bin1+exon 11-GFP couplée à la PREM, j'ai pu retrouver des structures circulaires à la surface des myotubes transduits (Figure 57). Ces structures circulaires, qui ressemblent étonnement aux anneaux de cavéoles, suggèrent que Bin1 pourrait, en s'auto-assemblant, former des plateformes qui serviraient d'échafaudage dans le recrutement des cavéoles pour former les anneaux dont émanent des tubules-T naissants.



**Figure 57. Microscopie corrélative de Bin1-GFP sur des myotubes humains en culture.** (A-G) Images de microscopie corrélative avec des grossissements croissants du marquage fluorescent obtenu par la surexpression de Bin1-GFP dans des myotubes. Le marquage fluorescent est ensuite superposé sur les images de ME à transmission correspondantes. (B) Image à plus fort grossissement de l'encart de droite dans (A). (C-D) Images à très fort grossissement de l'encart dans (B) en super-résolution (C) et en superposition de la SR à la ME à transmission (D). (E) Image à plus fort grossissement de l'encart de gauche dans (A). (F) Images à plus fort grossissement de l'encart dans (E) en microscopie corrélative. (G-I) Images à très fort grossissement de l'encart dans (F) en super-résolution (G), en ME à transmission (H) et en superposition des deux (I). La surexpression de Bin1-GFP dans les myotubes induits la formation de structures circulaires semblables aux anneaux de cavéoles.

J'ai ensuite voulu savoir quel était l'effet de la surexpression de Bin1+exon 11 dans le contexte de différenciation la plus poussée possible. J'ai donc transduit des myotubes primaires murins avec le vecteur Adv Bin1+exon 11-GFP afin de visualiser directement l'effet de la surexpression de Bin1 sur les cavéoles. Ces expériences, relativement difficiles de par le grand nombre d'étapes sensibles, ont tout de même permis d'obtenir des images très impressionnantes de l'effet de Bin1 sur l'organisation de la surface des myotubes (Figure 58). Dans ces cellules, Bin1+exon 11-GFP est fortement colocalisé avec le marquage fluorescent de Cav-3 au niveau de structures tubulo-vésiculaires observables en ME et ressemblant fortement aux tubes perlés.

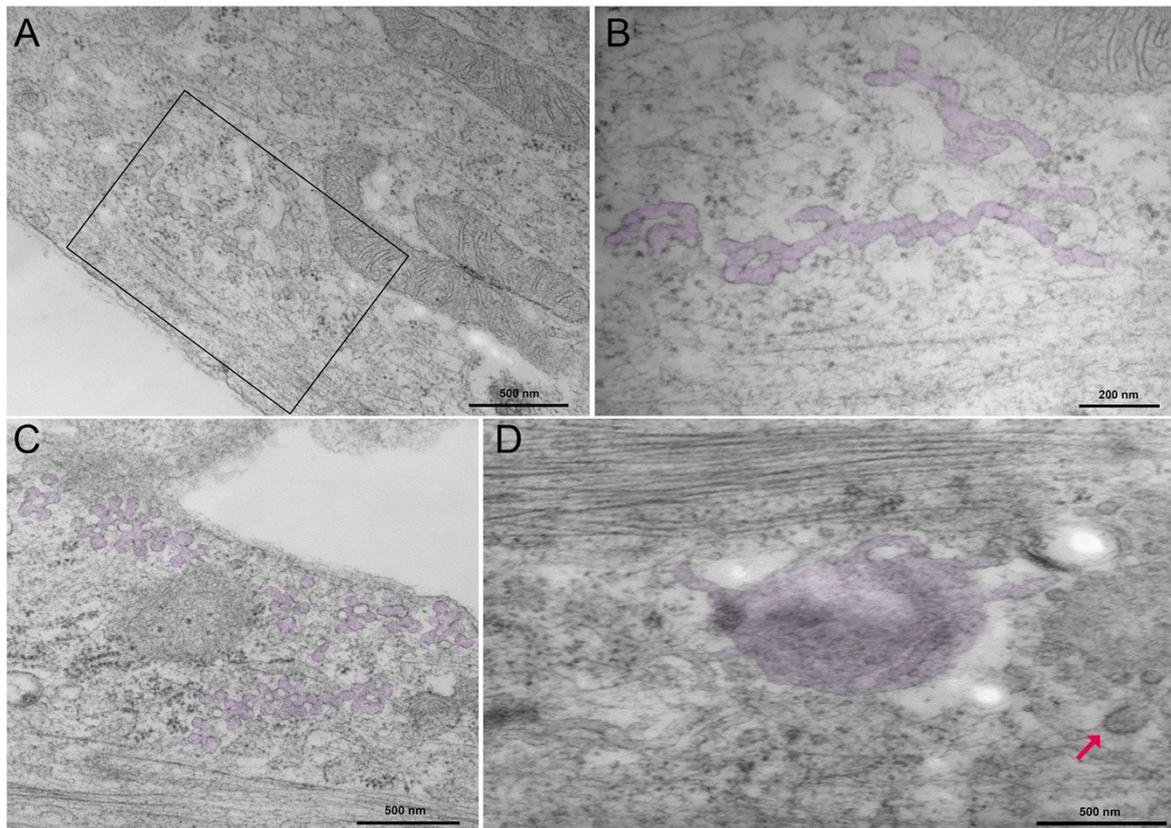


**Figure 58. Microscopie corrélative de Bin1-GFP sur des myotubes murins primaires extensivement différenciés.**

(A-C) Images de microscopie corrélative avec des grossissements croissants du co-marquage fluorescent obtenu par surexpression de Bin1-GFP (vert) dans des myotubes murins décapés par sonication marqués par Cav-3 (rouge) superposé sur les images de ME correspondantes. (B) Image de microscopie corrélative correspondant au grossissement de l'encart dans (A). (C) Image de microscopie corrélative correspondant au grossissement de l'encart dans (B). (D) Vues à très fort grossissement de l'encart dans (C), en super-résolution, en ME à transmission et la superposition des deux. Dans ces cellules, Bin1-GFP est fortement colocalisé avec le marquage de Cav-3 au niveau de structures tubulo-vésiculaires ressemblant fortement aux tubes perlés (flèches blanches).

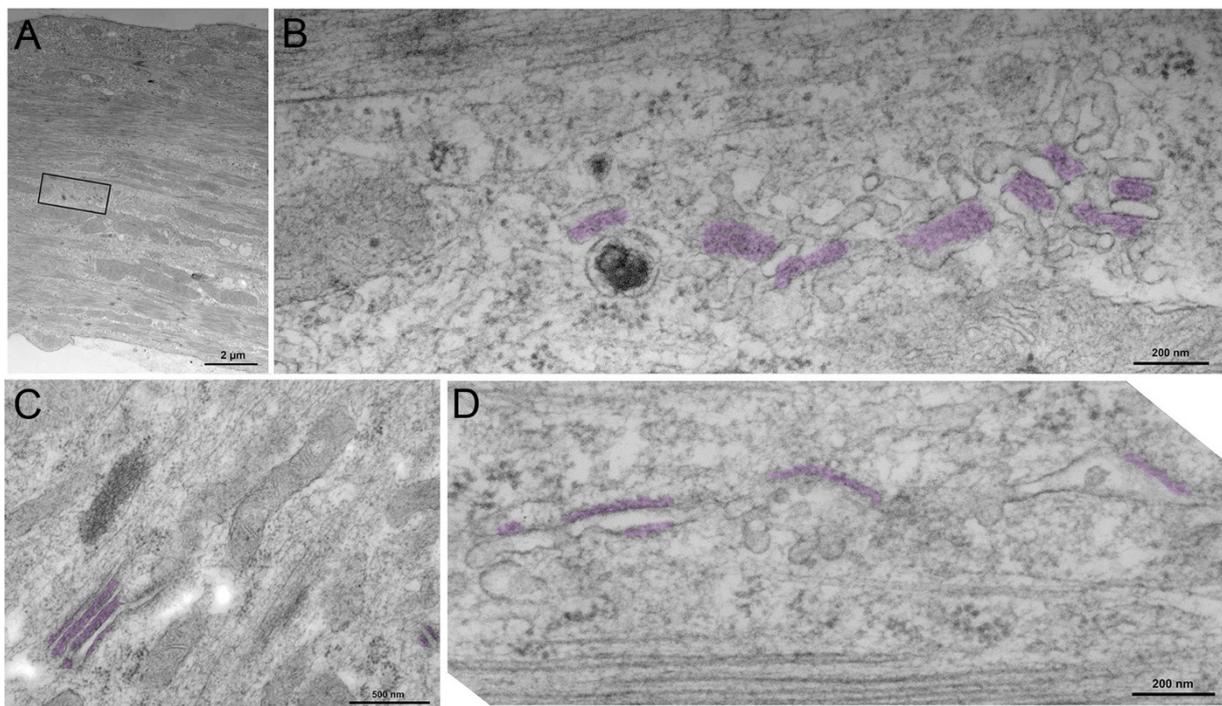
Nos expériences de microscopie PREM et corrélative permettent de visualiser les objets membranaires à l'échelle nanométrique. Cependant, leur mise en place nécessite de décapier les cellules aux ultrasons ce qui peut être destructeur pour les tubules-T qui s'invaginent en profondeur au sein de l'appareil contractile de la cellule musculaire. Afin de visualiser les structures de cavéoles sous un autre angle et ce sans devoir casser les myotubes préalablement, nous avons effectué des expériences de microscopie électronique sur coupes de myotubes cultivés exactement comme les expériences précédentes. Ces expériences ont été effectuées avec Jeanne Lainé, experte dans l'analyse des tubules-T par microscopie électronique dans notre équipe. J'ai cultivé des myotubes primaires de souris avec mon protocole de culture extensive mais cette fois les myotubes ont été fixés et inclus en résine pour l'obtention de coupes ultrafines. L'analyse de ces échantillons a confirmé les résultats obtenus par PREM en mettant en évidence de nombreuses structures tubulaires de nature perlée et ressemblant très fortement aux structures que j'ai observées à la surface des myotubes par PREM (Figure 59).

Ces observations de ME classique sur coupes nous ont aussi permis de retrouver, dans les myotubes, des structures qui pourraient correspondre aux anneaux de cavéoles au niveau de la membrane du myotube adhérente au substrat (Figure 59 (D)). De plus, nous avons pu valider l'interaction des citernes terminales de RyR1 avec les tubes perlés en montrant les sites de contact caractéristiques de couplages naissants entre le RS et le tubule-T (Figure 60). Ces contacts sont visibles grâce à la densité électronique du récepteur à la ryanodine et du matériel présent dans le lumen du RS. En effet le RS contient de la calséquestrine, la protéine permettant de séquestrer le calcium à proximité du RyR1 au niveau de la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique. Nous avons ainsi pu montrer que ce sont les régions du tube exemptes de matériel caractéristique des cavéoles qui forment des contacts avec le RS. (Figure 60).



**Figure 59. Analyse des structures d'origine cavéolaire de la surface des myotubes.**  
**(A-D)** Images de microscopie électronique à transmission sur coupes ultrafines de myotubes issus de cultures primaires de souris cultivées dans du Matrigel pendant 9 jours. Les structures en anneaux de cavéoles et les tubes perlés émanent de la surface des myotubes ou ces anneaux sont pseudo-colorés en violet. **(B)** Vue à fort grossissement de l'encart dans (A). Exemple de tube perlé émanant d'une structure circulaire et pseudo-colorés en violet. **(C)** Des structures complexes de cavéoles en forme de tube sont pseudo-colorées en violet. **(D)** Des structures en anneaux de cavéoles dont émanent des tubes sont pseudo-colorées en violet. La flèche rouge indique un puit de clathrine qui confirme que ces structures sont localisées à la surface des myotubes.

Ce résultat qui peut sembler contradictoire avec la littérature et notre hypothèse de départ est cependant en accord avec les résultats récents du groupe de Rob Parton à l'Université de Queensland. Ils ont en effet montré que le recyclage des cavéoles est un prérequis pour la formation des tubules-T dans le muscle squelettique du poisson zèbre (Lo et al. 2021). Un mécanisme permettant le désassemblage du manteau de cavéolines/cavines semble nécessaire pour la formation d'un tubule capable d'interagir avec le RS pour former des triades.



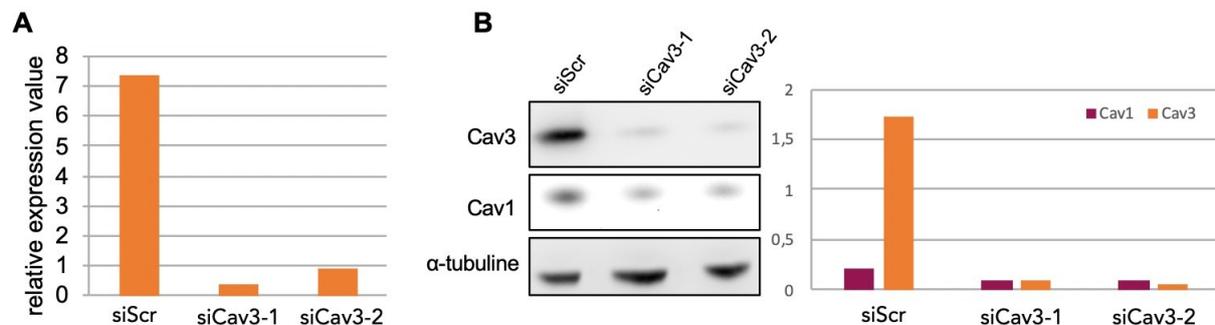
**Figure 60. Association des tubules naissants avec des citernes terminales du RS.**

(A-D) Images de microscopie électronique à transmission sur coupes ultrafines de myotubes issus de cultures primaires de souris cultivées dans du Matrigel pendant 9 jours. (A) Image à faible grossissement d'un myotube murin en culture. (B) Image à plus fort grossissement correspondant à l'encart dans (A). Les citernes de réticulum endo/sarcoplasmique sont pseudo-colorées en violet. (C-D) Les tubes perlés des myotubes peuvent former d'étroits contacts de type "couplage" avec des citernes de réticulum endo/sarcoplasmique (pseudo-coloré en violet) caractérisées par la présence de matériel dans les citernes et de densités électroniques. Seules les régions du tube qui ne contiennent pas de cavéoles forment ces contacts avec le SR. Le matériel dense aux électrons dans les zones pseudo-colorées en violet correspond aux 'pieds' de RyR1.

### II.3. DEPLETION DE CAV-3 DANS LES CELLULES MUSCULAIRES

#### II.3.1. Validation des siARN dirigés contre CAV-3

Afin de tester l'implication fonctionnelle de Cav-3 dans le mécanisme de tubulation par Bin1, nous avons utilisé une stratégie d'inactivation par des siARN dirigés contre Cav-3 sur des cellules murines primaires. Les siARN que nous avons utilisés sont efficaces et entraînent une diminution d'environ 95% de la quantité totale de Cav-3 par rapport au contrôle tant au niveau de l'ARN qu'au niveau protéique (Figure 61). On observe aussi au niveau protéique une diminution de la quantité de Cav-1 (environ 50%) due à une similarité dans les séquences des deux ARN (Figure 61 (B)). Nous avons choisi d'utiliser dans la suite de l'étude le siARN Cav-3-1.



**Figure 61. L'utilisation de siARN dirigés contre Cav-3 permet de diminuer la quantité de Cav-3 dans les myotubes et de mimer la diminution de Cav-3 décrite dans les cellules de patients.**

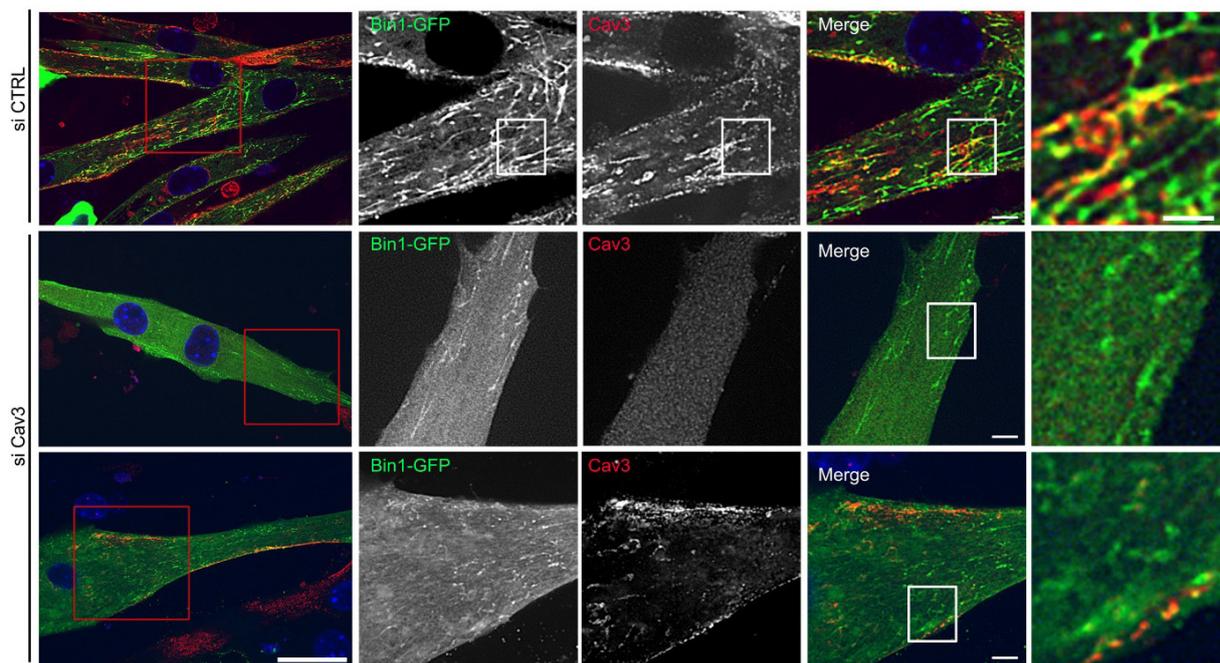
**(A)** Quantification relative de l'expression du gène CAV-3 après transfection des myotubes en culture par des siARN dirigés contre CAV-3. Le traitement entraîne une diminution de la quantité d'ARN Cav-3 de 95,3% dans le cas du siCav-3-1 et de 87,7% dans le cas du siCav-3-2. **(B)** Quantification relative par Western Blot des protéines Cav-3 et Cav-1 dans des myotubes en culture après transfection par des siARN dirigés contre CAV-3. Le traitement entraîne une diminution de la quantité de protéine Cav-3 de 94,1% et 96,6% pour les siCav-3-1 et 2 respectivement et une diminution de Cav-1 de 56,1% et 50,1%. n=1.

#### II.3.2. Effet fonctionnel de la diminution de l'expression de Cav-3 sur la formation de tubes par Bin1

J'ai utilisé la stratégie siARN contre Cav-3 dans le modèle de surexpression de Bin1+exon 11-GFP par le vecteur Adv. Ceci a permis de tester si la présence de Cav-3 était fonctionnellement indispensable à la formation des tubules de Bin1 et de tester l'effet du déficit en Cav-3 sur la tubulation.

J'ai montré dans la partie précédente qu'une surexpression de Bin1 dans les myotubes en culture induisait une tubulation excessive de la membrane plasmique (Figure 52).

Ce résultat est retrouvé après transfection d'un siARN contrôle dans les myotubes (Figure 62) alors que l'utilisation du siARN Cav-3, entraîne une diminution importante de la tubulation des membranes formées par Bin1 (Figure 62). Contrairement à la situation contrôle, les myotubes dépletés en Cav-3 forment de petits foci à la membrane plasmique sans se prolonger en tubes. Ce résultat confirme l'importance des structures de Cav-3 en tant qu'initiatrices de la formation des tubules et montre comment l'absence de Cav-3 peut entraîner une diminution drastique du nombre de tubules formés.



**Figure 62. La diminution de Cav-3 entraîne une diminution de la tubulation excessive induite par la surexpression de Bin1.**

Images d'immunomarquages de myotubes primaires murins à 7 jours de différenciation traités avec des siARN contrôles ou dirigés contre CAV-3 ainsi qu'avec des vecteurs adénoviraux entraînant la surexpression de Bin1-GFP dans les cellules. Dans les cellules contrôle, la surexpression de Bin1+exon 11 entraîne une tubulation excessive des membranes et l'apparition d'un réseau dense de tubes. Le déficit en Cav-3 dans les myotubes traités avec le siARN semble entraîner une diminution dramatique de cette tubulation. Barres d'échelle : 10µm.

Ces résultats suggèrent dans leur ensemble que les défauts de tubulation observés dans des myopathies pourraient être dus à une diminution de la quantité de Cav-3 dans la cellule musculaire et que des défauts dans l'homéostasie des cavéoles à la membrane pourrait induire des défauts dans la formation des tubules-T.

### III. CAVEOLES, TUBULES-T ET PATHOLOGIES MUSCULAIRES

---

Plusieurs pathologies musculaires dues à des mutations dans le gène CAV-3 ou dans le gène BIN1 ont pour phénotype une désorganisation des tubules-T. Dans la partie qui suit, j'ai réalisé le même type d'expériences que précédemment mais sur des myotubes issus de biopsies musculaires de patients atteints de cavéolinopathies. Ces cellules présentent des mutations validées au niveau moléculaire dans le gène codant pour Cav-3. Le but de cette partie est de remettre mes découvertes sur les structures de cavéoles et leur implication dans la formation des tubules-T dans un contexte de myopathies. En effet, les myopathies pourraient être causées par les défauts de la machinerie qui participe à la formation des anneaux de cavéoles et des tubules-T. On sera ainsi en mesure de mieux comprendre les défauts observés dans les muscles de patients.

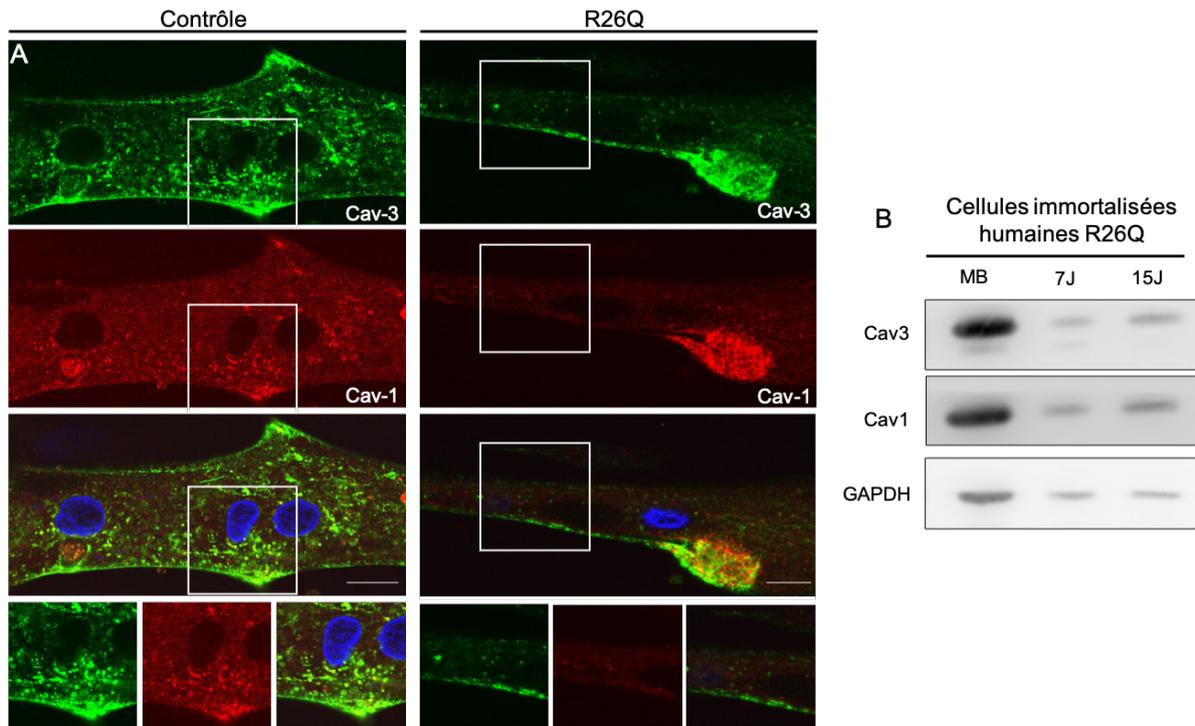
#### III.1. LES CAVEOLES DANS LE CAS DES CAVEOLINOPATHIES

##### III.1.1. L'expression de la cavéoline 3 diminue au cours de la différenciation dans les cellules de patients

Au laboratoire j'ai eu accès à deux lignées de myoblastes immortalisés issues de biopsies de patients atteints de cavéolinopathies. La première lignée exprime la mutation P28L, entraînant généralement une hyperCKémie chez les patients (Merlini et al. 2002). La seconde exprime la mutation R26Q qui entraîne un phénotype plus critique de dystrophie musculaire des ceintures 1c (LGMD1C, (Figarella-Branger et al. 2003), une maladie des muscles dits "ondulants" (Vogler et al. 2001) ainsi qu'une hyperCKémie (Carbone et al. 2000).

Des études chez les patients ont précédemment montré une réduction de la quantité de Cav-3 totale dans le muscle, une diminution du nombre de cavéoles à la membrane plasmique ainsi que la présence d'agrégats de Cav-3 au niveau de l'appareil de Golgi témoignant du mauvais adressage au sarcolemme des oligomères de Cav-3 mutée et non mutée et leur dégradation suite à une ubiquitination (Gazzerro, Bonetto, et Minetti 2011).

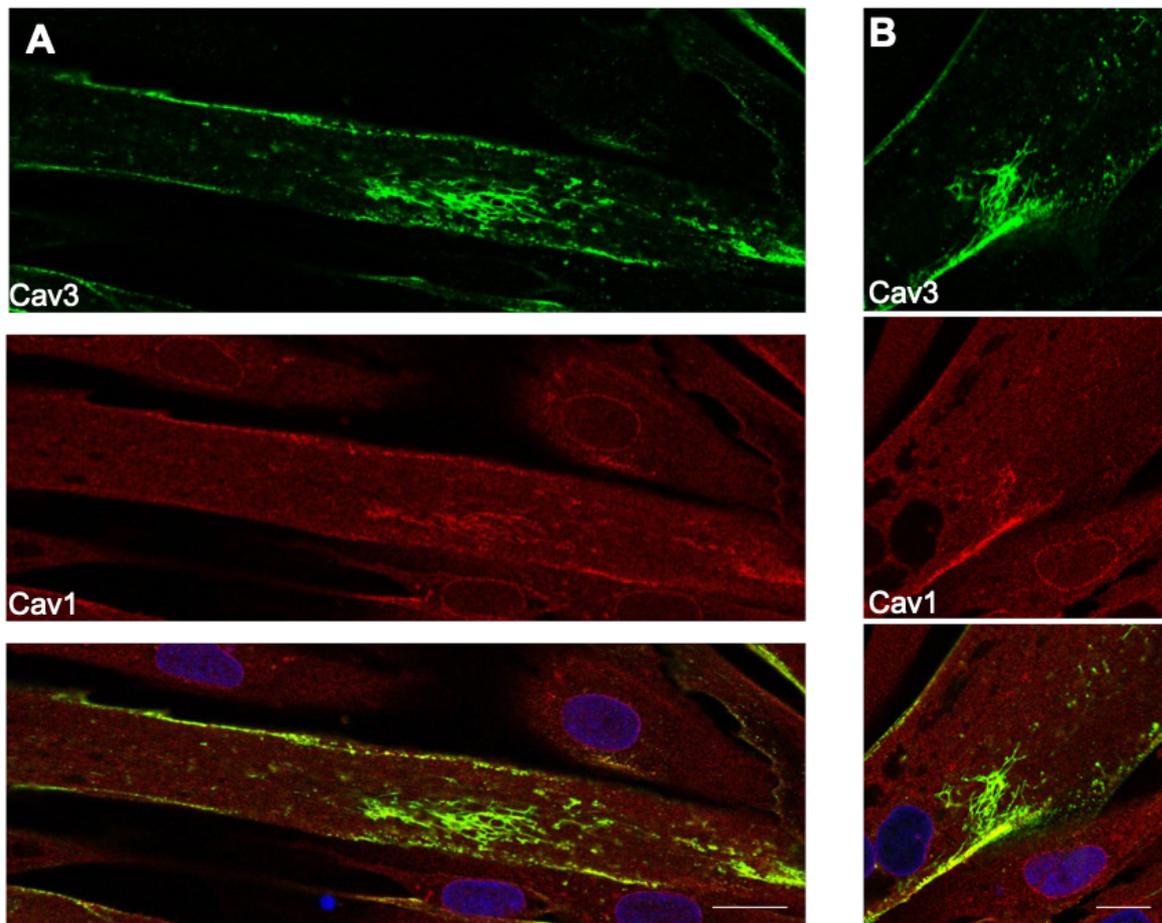
Nous avons d'abord étudié nos cellules immortalisées pour savoir si nous avons un phénotype similaire et si ce modèle d'étude était pertinent. Une étude de l'évolution de la quantité de Cav-3 par Western Blot a montré une expression de Cav-3 dramatiquement inférieure à celle des cellules contrôles (Figure 63 (B)).



**Figure 63. L'expression de la cavéoline dans les myotubes de patients présentant des mutations de Cav-3 est altérée.**

**(A)** Images d'immunomarquages de myotubes humains immortalisés à 4 jours de différenciation. Des myotubes d'individus contrôle et de patients présentant la mutation R26Q dans le gène CAV-3 ont été marqués avec des anticorps dirigés contre Cav-3 (vert) et Cav-1 (rouge). La quantité de marquage des cavéolines à la membrane des cellules de patients semblent drastiquement diminuée au sarcolemme. La ligne inférieure correspond aux grossissements des encarts dans (A). Barres d'échelle : 10µm **(B)** Observation relative par Western blot de l'expression des protéines Cav-3 et Cav-1 dans les myotubes au cours de la différenciation au stade myoblaste (MB) non différencié, myotubes à 7 jours (7J) et 15 jours (15J) de différenciation. GAPDH est utilisé comme marqueur de charge. On observe une diminution de la quantité relative de Cav-3 et Cav-1 au cours de la différenciation.

Un marquage immunofluorescent de Cav-3 a permis de montrer dans les myotubes R26Q, une diminution du marquage de Cav-3 au niveau de la membrane plasmique (Figure 63 (A)) ainsi qu'une agrégation de Cav-3 au niveau cytosolique. Ces agrégats correspondent à des amas de Cav-3 mutée et non mutée séquestrés dans des compartiments cytosoliques avant leur dégradation (Figure 64), ces compartiments pourraient correspondre à du Golgi (Dewulf et al. 2019).



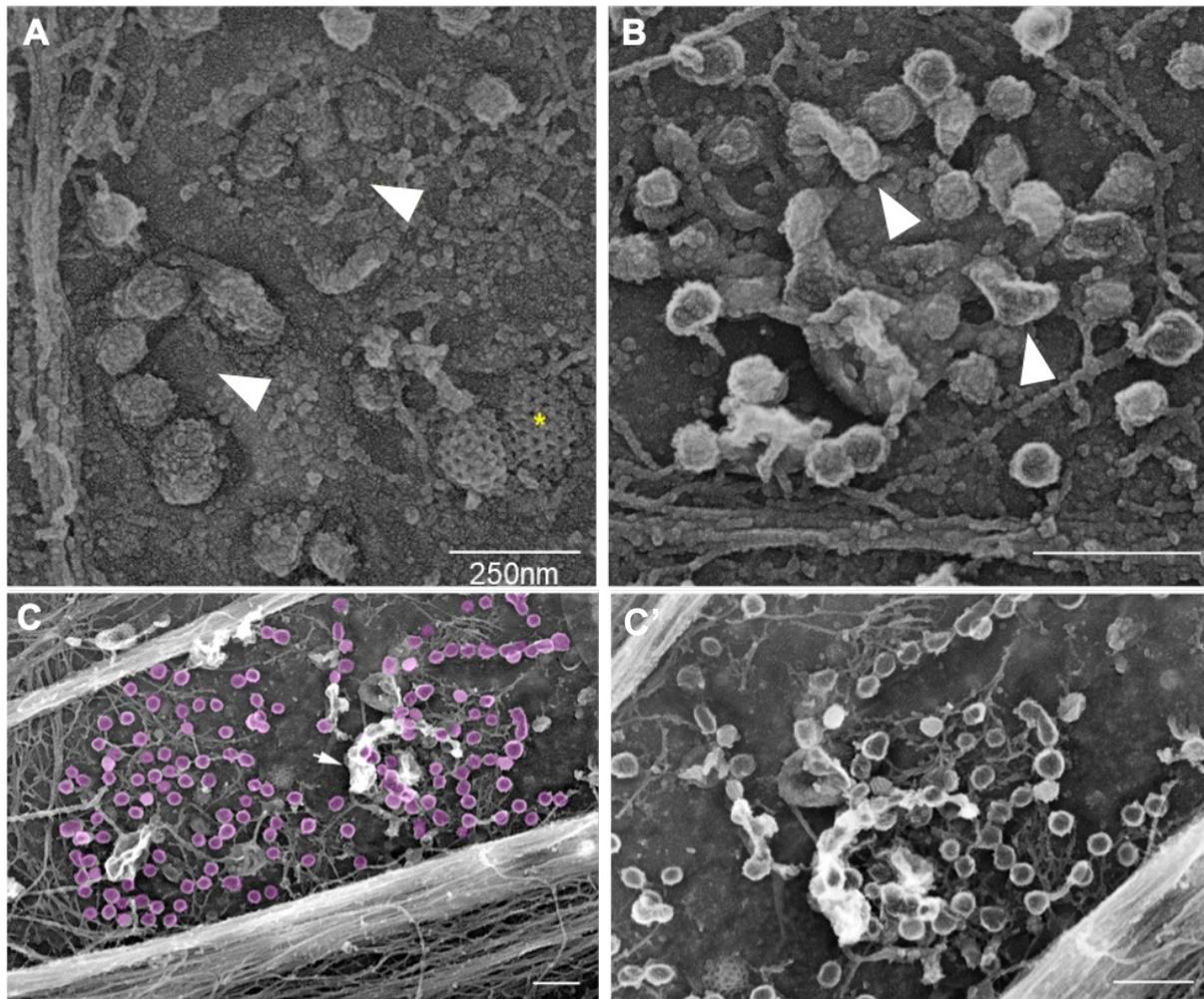
**Figure 64. Les mutations dans la protéine Cav-3 entraîne son accumulation intracellulaire.**  
**(A-B)** Immunomarquages de myotubes humains immortalisés issus de patients présentant la mutation R26Q dans le gène CAV-3. Les cellules ont été marquées avec des anticorps dirigés contre Cav-3 (vert) et Cav-1 (rouge). On remarque une agrégation de marquage Cav-3 intracytoplasmique dans ces myotubes de patients. Barres d'échelle : 10µm.

De nos deux lignées cellulaires, celle qui possède la mutation reproduisant le mieux des effets observables dans les muscles de patients est la lignée R26Q. J'ai donc concentré mon étude sur cette mutation.

### III.1.2. La morphologie des cavéoles est altérée dans les cellules de patients

Des articles publiés sur l'effet des mutations de Cav-3 induisant des cavéolinopathies décrivent une diminution drastique de la quantité de cavéoles à la membrane plasmique (Gazzerro, Bonetto, et Minetti 2011). Cependant mes observations "en face" de la membrane cytosolique des myotubes de patients montrent que ces myotubes présentent toujours des cavéoles au sarcolemme (Figures 65 et 66). Néanmoins, l'analyse ultrastructurale par ME montre que leur structure est

altérée (Figure 65 (A-B)). Il en est de même pour leur organisation spatiale (Figure 65 (C)). La présence de cavéoles à la membrane plasmique pourrait être due au fait que Cav-3 non mutée puisse s'échapper de l'appareil de Golgi et rejoindre le sarcolemme, emportant avec elle de la Cav-3 mutée. La formation de cavéoles contenant la forme mutée et la forme non mutée aurait pour conséquence de modifier les interactions avec les protéines accessoires et donc d'altérer leur morphologie.

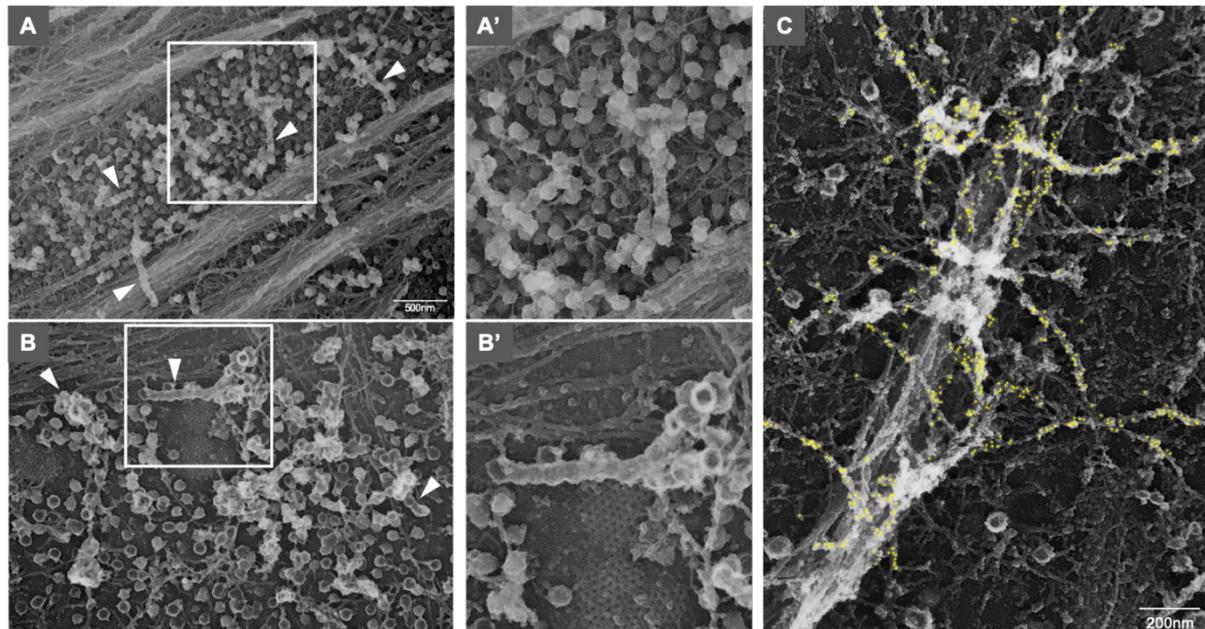


**Figure 65. L'organisation des cavéoles est altérée dans les myotubes de patients atteints de cavéolinopathie.**

(A-B) Image à fort grossissement de la membrane plasmique des myotubes de patients en culture par PREM après décapage par sonication. Les pointes de flèches blanches indiquent des cavéoles mal formées ou qui s'accumulent anormalement. L'astérisque jaune dans (A) indique un puits de clathrine. (C) Les cavéoles sont pseudo-colorées en violet dans l'image à faible grossissement. (C') Grossissement de l'organisation des cavéoles altérée dans (C).

Ces cellules présentent aussi une tubulation anarchique et excessive des cavéoles au sarcolemme (Figure 66 (A-B)) comparée aux cellules contrôles. Nous avons très fréquemment observé dans ces myotubes des chaînettes formées par la succession de cavéoles (Figure 66 (A'-B')). De plus des expériences d'immuno-marquages avec

des billes d'or en microscopie électronique sur ces myotubes m'ont permis de montrer une tubulation excessive marquée par l'anticorps couplé à des billes d'or dirigé contre Bin1 (Figure 66 (C)).



**Figure 66. Tubulation anarchique et excessives des cavéoles dans les cellules de patients présentant la mutation CAV-3 R26Q**

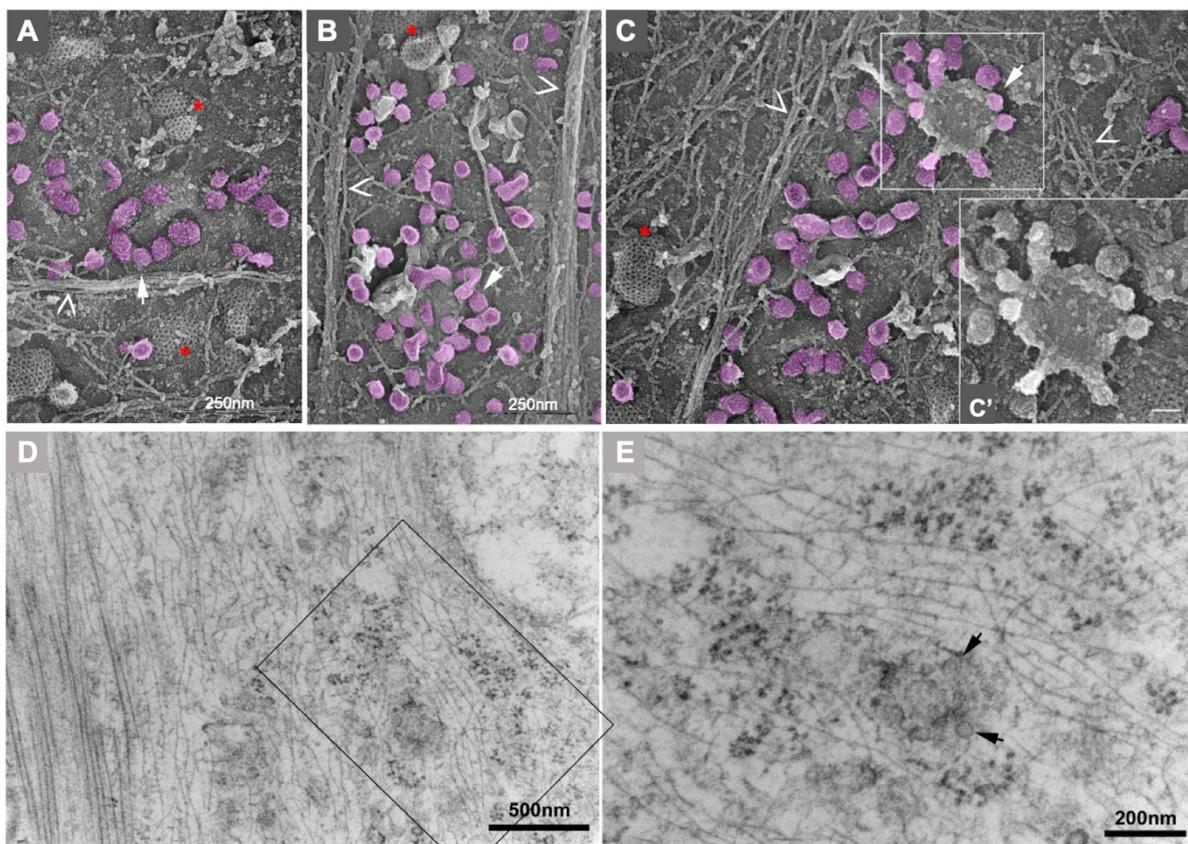
(A-C) Images de microscopie électronique sur répliques de métal de myotubes immortalisés humains présentant la mutation R26Q à 5 jours de différenciation. (A-B) Tubulation anormale des cavéoles au sarcolemme (flèches blanches). (A'-B') Images à très fort grossissement des encarts dans (A) et (B). (C) Immuno-marquage de Bin1 avec des anticorps couplés à des billes d'or de 15nm (jaune) dans des myotubes humains. La membrane de la cellule présente une tubulation anarchique et excessive marquée par Bin1.

### III.1.3. La morphologie des anneaux de cavéoles est altérée dans les cellules de patients

D'après la littérature on sait que des mutations de la protéine Cav-3 entraînent des défauts de formation des tubules-T et ainsi des défauts de flux calciques (Gazzerro, Bonetto, et Minetti 2011). De même une suppression de la protéine Cav-3 dans des souris (KO-Cav-3) entraîne des défauts de formation des tubules-T qui perdent alors leur orientation transversale (Galbiati, Razani, et Lisanti 2001).

Je me suis donc demandé s'il n'y avait pas des défauts dans l'organisation des anneaux de cavéoles dans les cellules de patients. Pour ce faire j'ai étudié les myotubes de patients à cinq jours de différenciation en PREM. J'ai facilement retrouvé des structures circulaires dans ces myotubes. Néanmoins, ces anneaux de cavéoles

sont souvent mal fermés, mal organisés sur la plateforme de membrane plasmique et ils semblent incapables d'initier la formation d'un tube (Figure 67). En effet je n'ai pas réussi à trouver de tubes émanant des anneaux dans les cellules de ces patients. Nous avons donc émis l'hypothèse que les cavéoles défectueuses formées d'oligomères de Cav-3 mutée et non mutée seraient incapable de se former correctement sur les plateformes de membrane initiées par Bin1, ce qui empêcherait la formation précoce des tubules-T. A l'inverse les cavéoles au sarcolemme des myotubes de patients auraient une capacité accrue à s'assembler pour former des tubes formés par la succession de cavéoles.



**Figure 67. Les myotubes de patients présentent une altération dans l'organisation des anneaux de cavéoles.**

**(A-C)** Images de PREM de la membrane cytosolique de myotubes de patients présentant la mutation R26Q décapés par sonication. Les cavéoles sont pseudo-colorées en violet. Les flèches blanches montrent des anneaux de cavéoles déformés. Les têtes de flèches vides indiquent les fibres de stress d'actine. Les étoiles rouges indiquent la clathrine en plaques ou en vésicules au sarcolemme. **(C')** Vue à très fort grossissement de l'encart **(D-E)** Images de ME à transmission sur coupes ultra-fines d'anneaux de cavéoles déformés (flèches noires).

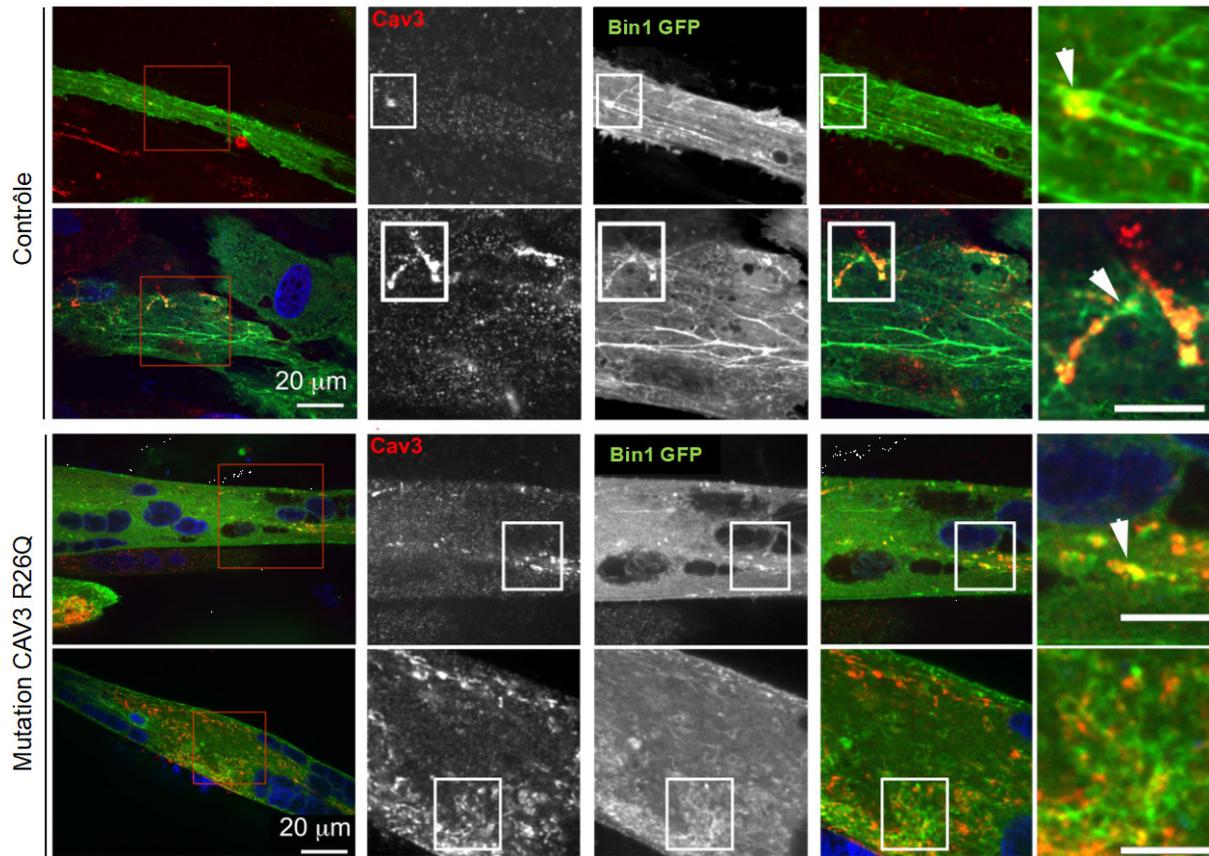
### III.2. L'EFFET DES MUTATIONS DE CAV-3 DANS LES CELLULES DE PATIENTS

Les résultats précédant laissent penser que l'organisation des cavéoles et la formation des tubules-T seraient dépendantes de l'interaction fonctionnelle entre Bin1 et les cavéoles. Nous avons donc décidé d'étudier la tubulation par Bin1+exon 11 dans le contexte de déficit en Cav-3 dans le cas de la mutation R26Q dans les cellules de patients.

J'ai réalisé la même étude qu'avec l'utilisation du siARN dirigé contre Cav-3 afin de déterminer si une mutation dans le gène CAV-3 pouvait avoir un effet similaire à la diminution de la protéine totale sur la tubulation par Bin1+exon 11-GFP.

Pour ce faire, j'ai transduit le vecteur Adv Bin1+exon 11-GFP dans les myotubes de patients R26Q pendant 24h. J'ai alors observé une diminution importante de la tubulation comparée aux cellules d'un individu contrôle (Figure 68).

Cette expérience suggère que les myotubes de patients sont moins efficaces à tubuler la membrane par Bin1. Au vu des défauts dans l'organisation des cavéoles à la surface de ces myotubes il est tentant de penser que les mutations de Cav-3 ont un effet direct sur son aptitude à former ces sites d'initiation qui seront tubulés par Bin1. Pour s'adapter à cette contrainte, le myotube forme des tubes de moins bonne qualité en enchaînant des cavéoles (Lo et al. 2021).



**Figure 68. Les mutations de Cav-3 présentes dans les myotubes de patients entraînent une diminution de la sur-tubulation induite par la surexpression de Bin1 + exon 11.**

Images d'immunomarquages de myotubes humains contrôles et présentant la mutation de CAV-3 R26Q à 7 jours de différenciation. Les myotubes ont été traités avec des vecteurs adénoviraux durant 24h entraînant la surexpression de Bin1+exon 11-GFP (vert) dans les cellules. Les myotubes ont aussi été immuno-marqués avec un anticorps dirigé contre Cav-3 (rouge). La surexpression de Bin1 entraîne une tubulation excessive des membranes dans les cellules contrôles et ainsi l'apparition d'un réseau dense de tubes. La mutation R26Q dans CAV-3 semble entraîner une diminution dramatique de cette tubulation.

---

# DISCUSSION ET FUTURES DIRECTIONS

---



L'implication des cavéoles dans la biogenèse des tubules transverses n'est pas une hypothèse nouvelle. La première étude les impliquant dans ce processus date de 1968 (Ishikawa 1968) et elles n'ont depuis jamais cessé de réapparaître et disparaître des hypothèses de formation des tubules-T.

Elles ont initialement été associées à la formation précoce des tubules-T (Franzini-Armstrong 1991), voire même à l'origine de la tubulation. En effet, au niveau de la membrane plasmique externe les ouvertures des cavéoles et des tubules-T sont de la même taille (20-25nm) et indiscernables (Franzini-armstrong et Porter 1964b; Franzini-Armstrong et al. 1975). Il a aussi été montré qu'elles seraient utiles dans le processus mais pas nécessaires. Ainsi on observe chez les patients présentant des déficits en cavéoles et chez les souris KO pour Cav-3, des défauts d'orientation des tubules-T ainsi que des défauts de flux calciques mais les tubules-T et le couplage excitation-contraction semblent toujours fonctionnels (Galbiati et al. 2000; Galbiati et al. 2001). En 1991, Flucher et ses collègues ont émis l'hypothèse que la formation des tubules-T se ferait en deux temps avec l'aide de deux mécanismes différents (Flucher et al. 1991). Dans un premier temps des tubules émanent de la membrane plasmique longitudinalement. Ils rejoignent par la suite un compartiment tubulaire cytosolique et acquièrent leur orientation transversale par des remodelages de membranes. Les cavéoles pourraient alors avoir un rôle plus important au cours de la première phase de la biogenèse des tubules-T même si cela reste à vérifier expérimentalement

L'étude la formation des tubules-T est donc compliquée. De par la complexité des structures mises en jeu, leur enchevêtrement avec l'appareil contractile mais aussi de par le manque d'outils pour visualiser leur organisation à l'échelle des molécules qui les composent. Pour toutes ces raisons qui rendent la tâche d'autant plus compliquée, ce phénomène est encore trop mal compris. Un article récent de l'équipe de Rob Parton a montré, dans le poisson zèbre, que l'apport de membrane par les endosomes était nécessaire à la formation des tubules-T. La même équipe a montré que la cavine 4 était impliquée dans la formation des tubules-T et que son absence entraînait des défauts importants dans leur formation (Lo et al. 2021; Hall et al. 2020).

Dans ce travail je propose que les cavéoles soient des éléments initiateurs de la formation du tubule-T et qu'elles soient nécessaires à la formation des tubules longitudinaux.

## **I. LA MICROSCOPIE CORRELATIVE, UN NOUVEL OUTIL D'OBSERVATION DES OBJETS MEMBRANAIRES**

---

La première partie de mon travail de thèse était de mettre au point une technique de microscopie corrélative. Elle permet de corréler la microscopie fluorescente à super-résolution avec la microscopie électronique et d'ainsi visualiser les structures à l'échelle nanométrique. Cette technique est puissante et nous a permis de travailler sur des structures de tailles comprises entre 20 et 80 nm. La notion de colocalisation des protéines dans la cellule est alors toute autre. En effet en observant les cellules en microscopie photonique à fluorescence la colocalisation est évaluée suite à la superposition des marquages avec une résolution donnée. En microscopie électronique (ME) cette résolution augmente considérablement et les objets sont visibles directement. Des objets qui colocalisent en fluorescence peuvent être seulement très proches en ME. Dans nos observations c'est le cas par exemple du co-marquage de Cav-3 avec le récepteur à la ryanodine (RyR1) (Résultats Figure 45). Le marquage immunofluorescent nous laissait penser que les deux protéines colocalisaient, mais on se rend compte en ME que le marquage RyR1 se trouve sur des structures juxtaposées à des structures marqués par Bin1.

J'ai donc pu utiliser cette technique tout au long de mon travail ce qui a permis de comprendre un tout autre mécanisme permettant d'expliquer comment les cavéoles participent à la formation des tubules-T dont je vais discuter maintenant.

## **II. COMPOSITION ET ORGANISATION DES CAVEOLES DANS LES CELLULES MUSCULAIRES**

---

Les cavéoles sont des structures membranaires particulièrement abondantes dans le muscle squelettique et possédant des fonctions variées. Cependant, des informations cruciales sur leur structure dans les cellules musculaires manquent encore pour permettre de comprendre les défauts contribuant à la physiopathologie de nombreuses myopathies. Le but de mon travail de thèse était, parmi les nombreuses fonctions attribuées aux cavéoles, d'étudier une des plus énigmatiques : leur rôle dans la formation des tubules-T au cours de la différenciation des cellules musculaires.

J'ai donc étudié la distribution et l'ultrastructure des cavéoles à différents stades de la différenciation des myoblastes en myotubes dans des cellules saines et pathologiques. Ceci a permis de mieux comprendre leur organisation et leur structure dans le muscle squelettique.

Nos premières observations ont permis de remettre les cavéoles dans le contexte de la cellule musculaire. Les cavéoles présentent un manteau constitué de bandelettes formées d'hétéro-oligomères de cavines 1 et 4 et de cavéoline 3. La cavine 4 et Cav-3 étant spécifiques du muscle (Bastiani et al. 2009), j'ai pu observer que la structure des cavéoles musculaires étaient différentes de celles de fibroblastes. La microscopie électronique sur réplique de métal nous a permis de décrire de multiples structures formées à partir de cavéoles à la membrane. Il est tentant de penser que la différence de morphologie entre différents types cellulaires est due à la présence de ces isoformes. On peut aussi supposer que ce pléomorphisme structurale serait rendue possible par une différence dans la tension physique de la membrane et du cortex cellulaire, en particulier lors de la contraction musculaire ou dans notre cas de la contraction cellulaire. En effet, il a été décrit par de la modélisation mathématique que des structures complexes de cavéoles pouvaient être stabilisées ou déstabilisées par les variations de tension de membrane (Golani et al. 2019).

La structure la plus impressionnante et inédite que nous ayons observée au cours de ce travail est sans doute l'anneau de cavéoles que nous avons surnommé la marguerite de cavéoles ou *caveolae daisies*. Elle correspond à une plateforme de membrane plasmique encerclée de cavéoles, exempte de cytosquelette et contenant dans la partie centrale de la plateforme des protéines membranaires. Ces anneaux ont un diamètre variable de 570nm dans les cellules musculaires humaines à 370nm dans les cellules murines. Cependant le nombre de cavéoles qui les composent reste constant, à environ 16 cavéoles par anneau. La différence de diamètre des anneaux entre les deux types cellulaires pourrait résulter de la différence de tailles des cavéoles. En effet, les cavéoles des cellules murines ont un diamètre d'environ 60 nm ce qui est inférieur à la moyenne des cavéoles qui est en général de 70nm (Yamada 1955). Alors que nous n'avons pas d'explication sûre, cette variation de taille pourrait être due à la contraction intense des myotubes murins issus de cellules satellites primaires en culture. Les cavéoles subiraient de nombreux cycles d'assemblage et désassemblage

(Sinha et al. 2011; Dewulf et al. 2019) à la membrane plasmique ce qui réduirait la quantité de protéines accessoires recrutées sur la cavéole. Cette théorie mériterait une étude approfondie et pourrait se faire par exemple en bloquant la contraction des myotubes murins ou stimulant la contraction dans les myotubes humains grâce aux techniques de stretch mécanique ou bien aux techniques d'optogénétique qui stimule la contraction par la lumière.

L'organisation des anneaux de cavéoles semblent dans tous les cas liés aux mouvements du cytosquelette d'actine. En effet, lorsqu'on observe les répliques de métal des myotubes décapés par sonication, on retrouve les anneaux de cavéoles situés entre les fibres de stress d'actine et on observe de nombreux filaments branchés autour et sous les anneaux. La contraction et le cytosquelette cortical pourraient promouvoir la fusion des cavéoles au niveau de ces plateformes dans les cellules qui se contractent ; c'est-à-dire les cellules murines à partir de cinq jours de différenciation. Il y aurait donc un lien direct entre la mise en place de ces structures et la contraction musculaire et inversement.

Les anneaux de cavéoles sont parfois enchevêtrés avec le réticulum endo/sarcoplasmique (RE/RS). Ceci nous a permis d'émettre l'hypothèse que les plateformes de cavéoles pouvaient avoir un rôle dans la formation de couplages périphériques avant la mise en place triades. Bien des expériences supplémentaires d'imagerie calcique pour affirmer ou infirmer cette hypothèse soient nécessaires, les images de microscopie électronique dans la littérature ne montrent pas l'accumulation de cavéoles au niveau des couplages périphériques décrits par Clara Franzini-Armstrong. Il est donc possible que les contacts entre le RS que j'ai décrit en microscopie corrélative soient les premiers sites de formation de triades précoces.

Il a été montré dans la littérature que des cavéoles en grappes sont présentes au site d'initiation de la formation des tubules-T, en particulier au niveau de la membrane plasmique (Ishikawa 1968; Franzini-Armstrong 1991). De plus on sait que la composition lipidique des tubules-T est similaire à la composition lipidique des cavéoles, c'est-à-dire enrichie en cholestérol et en sphingolipides (Parton et al. 1997). La découverte de ces anneaux dans les cellules musculaires nous a donc permis d'émettre l'hypothèse qu'elles pourraient être impliquées dans la formation de

plateformes membranaires à la surface des cellules musculaires qui participeraient à la formation des tubules-T.

### III. LA BIOGENESE DES TUBULES-T

---

Les tubules-T sont des structures musculaires spécialisées dans la propagation des potentiels d'action au cœur de la fibre musculaire. Ils sont donc essentiels dans le couplage excitation-contraction du muscle. De nombreuses protéines telles que Bin1, la dysferline, les junctophilines et les mitsugumines ont été décrites comme pouvant participer à leur formation. Cependant, il n'est pas encore clair comment ces protéines s'articulent et quelles sont les étapes essentielles à la formation d'un tube capable de transmettre le potentiel d'action en profondeur de la fibre musculaire.

Dans ce travail je me suis focalisée sur deux protéines majeures, Cav-3 comme composante des cavéoles (Way et Parton 1995; Tang et al. 1996), et Bin1 comme protéine capables de tubuler les lipides membranaires et de former des tubes (Butler et al. 1997; Lee 2002). En effet l'importance de ces protéines dans la physiologie du muscle squelettique est soulignée par le fait que des mutations dans le gène CAV-3 sont mises en cause dans une famille de maladies neuromusculaires autosomiques dominantes appelées cavéolinopathies (Flucher et al. 1991) et que des mutations de BIN1 induisent des défauts de tubules-T et de triades dans la myopathie centronucléaire (Nicot et al. 2007). De plus, il a été montré à l'institut que des défauts d'épissage dans l'exon responsable de l'interaction de Bin1 avec les membranes induisent des défauts de tubules-T dans la dystrophie myotonique (Fugier et al. 2011).

Les tubules-T ont une composition lipidique et moléculaires différentes de celle du sarcolemme tout au long de la myogenèse (Flucher et al. 1991). Cette observation a laissé penser que la formation de ces deux domaines serait indépendante et que peu d'échanges protéiques existeraient entre les deux compartiments. Avant la finalisation du système de tubules-T, les fibres musculaires présentent un réseau étendu de membranes tubulaires formant des tubules-T immatures. Il a été montré dans le processus de mise en place du système de tubules-T la coexistence de deux types de tubes. Tout d'abord des tubes courts partant perpendiculairement du sarcolemme et marqués par notre sonde lipidique, confirmant ainsi leur contact avec la membrane plasmique et le milieu extérieur. Une hypothèse possible serait que les tubes

connectés au sarcolemme se développeraient longitudinalement. Soit ils se connecteraient plus tardivement à un compartiment tubulaire interne différent du sarcolemme soit ils seraient reformés *de novo* lors de la seconde phase post-natale permettant ainsi de donner son organisation transversale au système des tubules-T matures (Flucher et al. 1991). La formation des tubules-T se ferait donc en deux temps. Une première vague de formation impliquerait des protéines membranaires et formerait des tubes longitudinaux à partir du sarcolemme. Par la suite ce compartiment rejoindrait le compartiment interne ou serait reformé grâce à un remodelage par des protéines capables de fragmenter le réseau de tubules-T préexistant. Grâce à son activité GTPase, la dynamine 2 pourrait être un candidat idéal pour accomplir cette fonction en permettant la scission des tubules afin qu'un nouveau réseau se forme. Cette deuxième phase se terminerait par la mise en place des tubules-T en contact avec le sarcolemme et traversant la fibre musculaire transversalement.

Au cours de notre étude du mécanisme de formation des tubules-T nous sommes donc partis de l'hypothèse de départ que les cavéoles, et en particulier les anneaux de cavéoles pourraient être à l'origine du processus et qu'ils seraient nécessaires à l'élongation longitudinale des tubules au départ du sarcolemme.

### III.1. BIN 1, LA PROTEINE INSTIGATRICE DU PROCESSUS

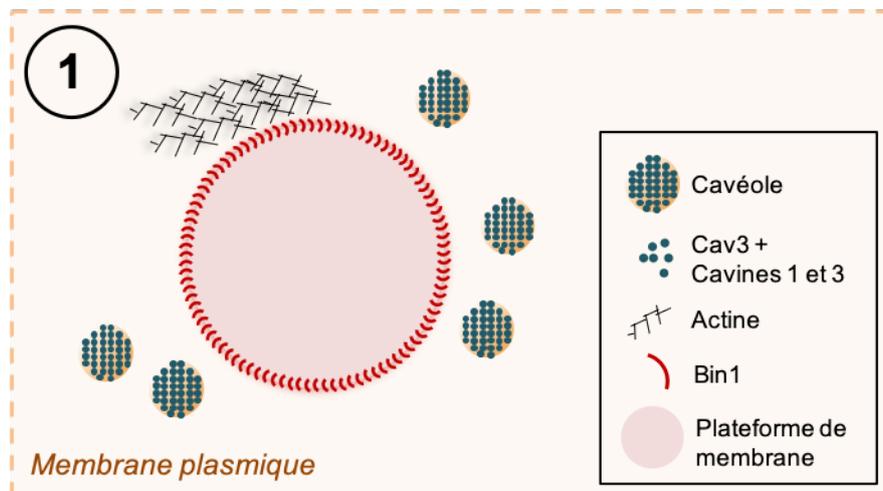
Pour comprendre le mécanisme de formation des tubules-T au cours de la différenciation des cellules musculaires nous avons étudié la protéine Bin1 comme marqueur des tubules-T (Lee 2002). Bin1 est décrite pour son implication dans la tubulation des membranes, grâce à son domaine N-BAR, ainsi que dans les interactions lipides-protéines et protéines-protéines grâce à la présence d'un site de liaison aux phosphoinositides PI(4,5)P2 et PI4P codé par l'exon 11 (Nicot et al. 2007).

En surexprimant le variant de Bin1 spécifique du muscle, Bin1+exon 11, dans des cellules musculaires en différenciation, j'ai mis en évidence la formation d'un réseau de tubules membranaires dense mais superficiel aussi bien en microscopie confocale qu'en microscopie électronique. L'utilisation de la sonde MemBright, permettant de marquer les membranes lipidiques de la cellule, a permis de révéler que ces tubes étaient en connexion directe avec le milieu extérieur. Cette connexion est particulièrement bien visible sur des myotubes entiers qui n'ont pas été décapés

préalablement (Figure 54 (J-L)). De l'extérieur, on peut voir que les nombreux trous formés par l'invagination des cavéoles forment des plateformes circulaires. Ces plateformes de membrane plasmique, dont émanent des tubes de membrane, semblent correspondre aux mêmes structures que j'ai mises en évidence lors de l'observation des anneaux de cavéoles sur les cultures primaires. Nous avons ainsi pu établir un modèle de formation de ces plateformes comme point de départ de la formation des anneaux de cavéoles et des tubules-T (Figure 69).

La surexpression de Bin1 dans les cellules, bien qu'artificielle, permet de mettre en évidence les protéines impliquées dans cette tubulation. Il a déjà été décrit dans la littérature que la surexpression de Bin1+exon 11 entraînait la présence abondante de tubes ainsi qu'une diminution de la quantité de cavéoles à la membrane plasmique des cellules (Nicot et al. 2007). Je me suis donc demandé quel était le lien entre les cavéoles et la tubulation des membranes par Bin1+exon 11. Nous avons donc décidé d'étudier la surexpression de Bin1+exon 11 dans le cas d'un déficit en cavéoles dans la cellule. L'utilisation d'un siARN dirigé contre la protéine Cav-3 a montré une diminution drastique de la quantité de tubes dans les cellules transduites. Il semblerait que Cav-3 soit requise pour la tubulation par Bin1+exon 11. Sachant que la surexpression de Bin1+exon 11 entraîne une diminution de la quantité de cavéoles et une tubulation excessive de la membrane, et que l'induction de la diminution de la quantité de cavéoles empêche la tubulation, on peut émettre l'hypothèse que Bin1 utiliserait les cavéoles ou un de ses constituants afin de tubuler la membrane.

Mes résultats avec Bin1 montrent que non seulement Bin1 est capable de tubuler la membrane au niveau des cavéoles mais qu'il peut aussi former un échafaudage moléculaire, souvent de forme circulaire qui par la suite recrute les cavéoles (Résultats Figure 57 et Figure 69).



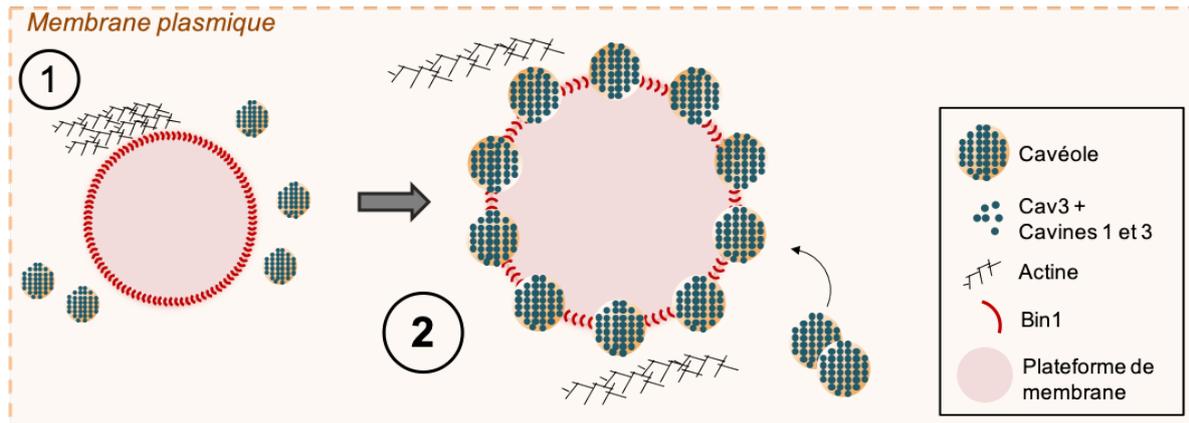
**Figure 69. Bin1 à l'origine de plateformes de membranes plasmiques dans les cellules musculaires.**

Représentation schématique de la formation de la plateforme de membrane par la protéine Bin1. Le centre de la plateforme est dépourvu de cytosquelette. La protéine Bin1 courbe la membrane avec grâce à son domaine N-BAR formant ainsi une plateforme. On retrouve au niveau du sarcolemme cytosolique des cavéoles individualisées ainsi que du cytosquelette.

Il y aurait donc dans les cellules musculaires un mécanisme physiologique qui permet de préformer les structures sur lesquelles va avoir lieu l'accumulation de cavéoles et la tubulation par Bin1 lors de la formation des tubules-T.

### III.2. LES CAVEOLES, LES STRUCTURES STABILISANTS LE PROCESSUS

Comme décrit dans la partie précédente, nous avons postulé que les anneaux de cavéoles s'organiseraient sur des plateformes de membrane plasmique déformées par Bin1 dans les cellules musculaires. Ce que décrit le modèle présenté en Figure 70. Les cavéoles se regroupent d'abord en anneaux sur l'échafaudage préformé par Bin1. Ces structures grandissent au fur et à mesure que les cavéoles y sont recrutées. Des filaments d'actine qui sont retrouvés tout autour des anneaux pourraient pousser sur les cavéoles afin qu'elles se regroupent.

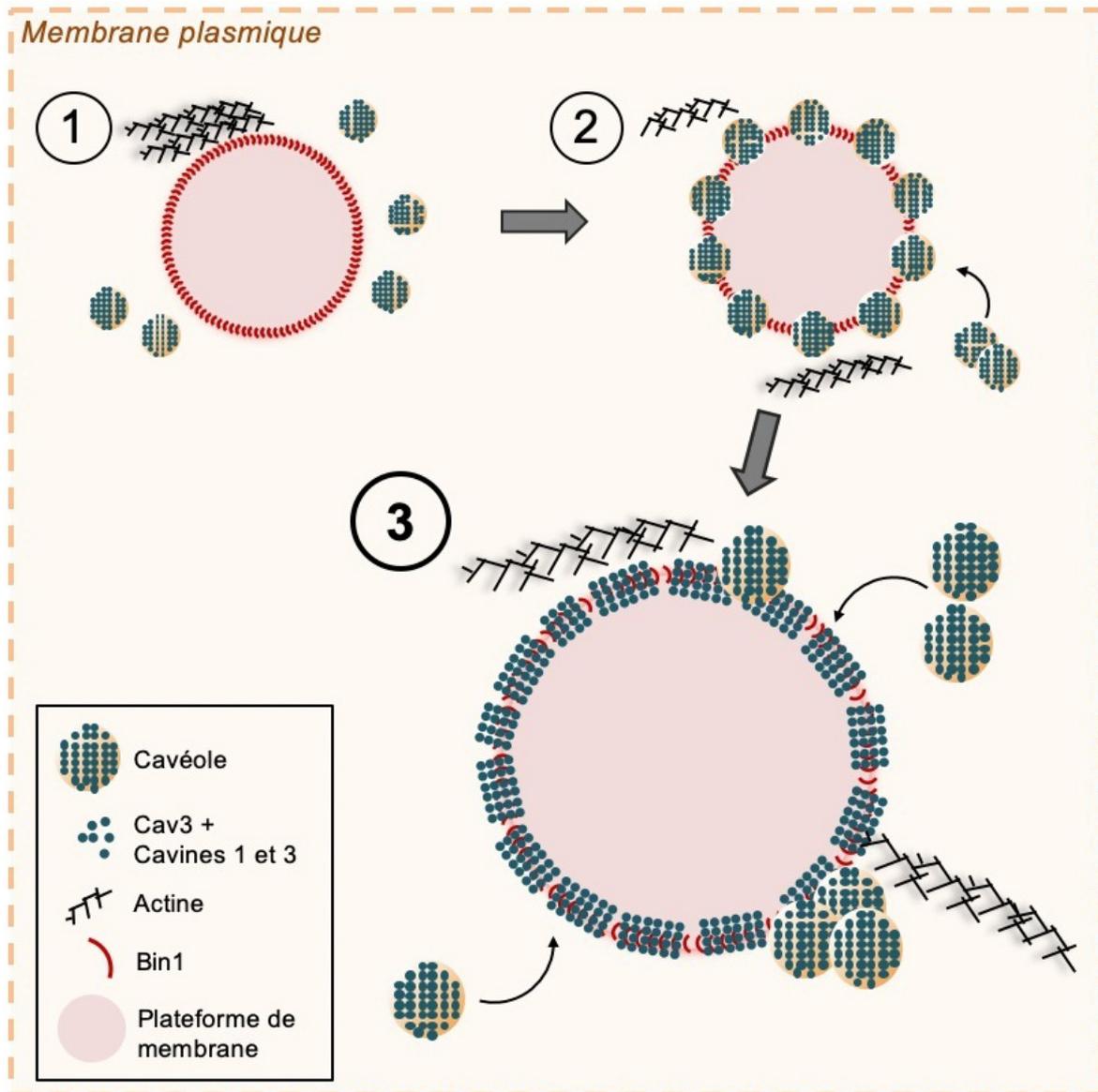


**Figure 70. Les cavéoles s'organisent sur la plateforme pour former les anneaux de cavéoles. (1)** Bin1 à l'origine de plateformes de membranes plasmiques dans les cellules musculaires. **(2)** Représentation schématique de l'organisation des cavéoles sur la plateforme de Bin1 pour former les anneaux de cavéoles. Les cavéoles individualisées s'organisent en anneau sur la plateforme de membrane formée par Bin1.

Comment les cavéoles s'organiseraient-elles précisément dans cette zone de la membrane ? C'est une question très intéressante. D'abord il faudrait déterminer comment les cavéoles sont recrutées depuis le sarcolemme jusqu'à la plateforme, c'est-à-dire sous forme de cavéoles, ou si les cavéoles se forment au niveau de la plateforme, c'est-à-dire que les protéines sont recrutées dans cette zone. En effet, l'environnement pré-incurvé de la membrane pourrait permettre à Cav-3 de s'organiser plus rapidement à la membrane et donc de recruter les autres protéines nécessaires à la formation des cavéoles. La plateforme formée par Bin1 pourrait aussi être composée de lipides dont des phospholipides, du cholestérol et des sphingolipides qui entraîneraient l'enrichissement en Cav-3. On sait de plus que la cavine 4 peut interagir directement avec Bin1 (Lo et al. 2021), les cavéoles musculaires, riches en cavine 4 (Bastiani et al. 2009), pourraient donc être attirées par la structure circulaire Bin1. On sait que le cholestérol est important pour la formation des cavéoles et leur formation à la membrane plasmique (Anderson 1998). De même le cholestérol est un lipide important dans la composition des tubules-T (Carozzi et al. 2000). On pourrait donc essayer d'étudier la composition en cholestérol des plateformes en déplaçant le cholestérol de la cellule avec la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine et étudier les anneaux de cavéoles, la tubulation par Bin1 et la formation des tubules-T qui devraient être très fortement perturbées.

Mes observations de microscopie corrélative ainsi que mes marquages immunofluorescents étudiés en ME et en microscopie confocale m'ont permis de

montrer une interaction entre les anneaux de cavéoles et Bin1, la présence de Bin1 dans des zones de fusion de cavéoles ainsi que sur des tubules marqués par Bin1 émanant des anneaux de cavéoles. Nous avons observé sur les anneaux de cavéoles : a) la fusion des cavéoles qui deviennent indiscernables les unes des autres mais qui présentent toujours le manteau caractéristique de la présence de Cav-3, cavine 1 et cavine 4, b) la formation d'agrégats de cavéoles à certains pôles de la plateforme. Nous avons donc complété notre modèle en figure 71 pour prendre en compte ces modifications structurales.



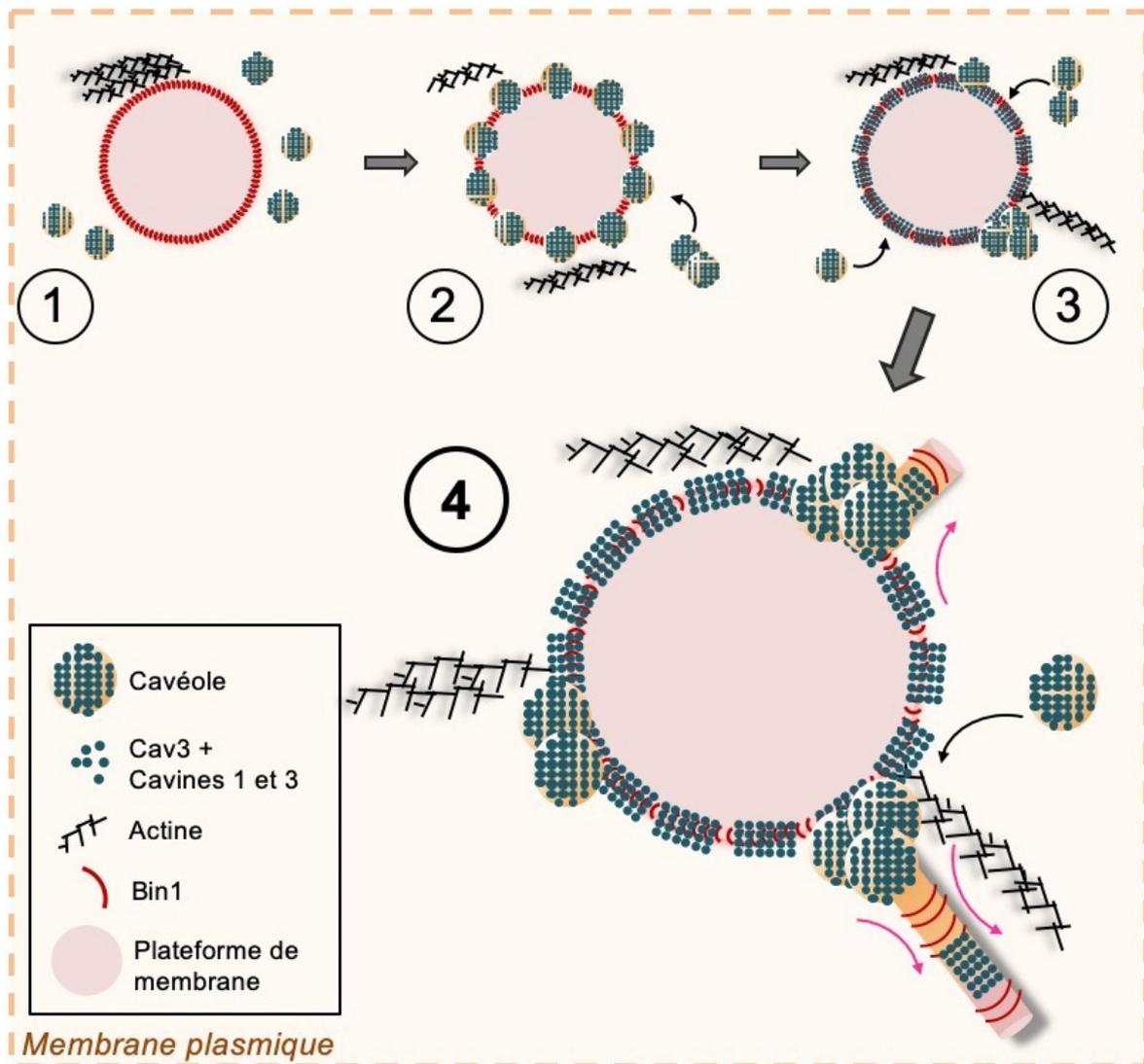
**Figure 71. Les cavéoles fusionnent au niveau de la plateforme et s'agrègent à certaines zones de l'anneau de cavéoles.**

(1) Bin1 à l'origine de plateformes de membranes plasmiques dans les cellules musculaires. (2) Les cavéoles s'organisent sur la plateforme pour former les anneaux de cavéoles. (3) Représentation schématique de la fusion des cavéoles au niveau de la plateforme et de la mise en place de pôle enrichis en cavéoles sur l'anneau. Les cavéoles fusionnent au niveau de l'anneau qui présentent alors les bandelettes caractéristiques du manteau cavéolaire. Des cavéoles individualisées forment des pôles riches en cavéoles au niveau de l'anneau.

Pour faire suite à ces observations, nous voudrions savoir par quel mécanisme les cavéoles fusionnent-elles exactement. Est-ce un mécanisme physique ou est-ce l'interdigitation de filaments de Bin1 avec des filaments de cavine/cavéoline ? En effet, on sait que la formation de super-structures de cavéoles peut être induite par la courbure de la membrane (Golani et al. 2019), courbure qui serait due à la présence de Bin1 à la membrane. De plus il a été décrit que des structures complexes de cavéoles pouvaient être stabilisées ou déstabilisées par les variations de tension de

membrane (Golani et al. 2019), la contraction des cellules musculaires pourrait donc avoir un effet dans cette organisation. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions faire varier la tension de membrane, par pression osmotique, par modification de la dureté du substrat de culture, ou en étirant mécaniquement les cellules. D'un point de vue moléculaire on sait que les protéines comme l'ATPase EHD2 et la GTPase dynamine 2 sont situées au niveau du col des cavéoles stabilisant la cavéole à la membrane (Morén et al. 2012) ou induisant sa fission (Henley et al. 1998). Des variations dans la régulation de ces protéines dans des cellules qui se contractent pourraient donc être à l'origine de la fusion des cavéoles. Il est justement fort intéressant de noter que l'isoforme EHD1 ait été impliquée dans la formation des tubules-T (Posey et al. 2014; Demonbreun et al. 2015). Une stratégie de transfection par ARN interférence couplée à la CLEM des EHD1-2 pourrait être efficace pour tenter de répondre à cette question.

La microscopie électronique nous a permis d'observer les anneaux de cavéoles en 3D et de face et j'ai pu ainsi apprécier tous les changements structuraux qu'ils subissent au cours de la différenciation musculaire. Les agrégats de cavéoles présents au niveau d'un des pôles de l'anneau de cavéoles semble s'allonger en tubes qui ont toutes les caractéristiques de tubules-T naissants. Pourquoi l'élongation se fait-elle à cet endroit précisément ? Cette question demeure sans réponse et devra faire l'objet d'expériences futures. Nous pouvons néanmoins compléter une nouvelle fois notre modèle pour prendre en compte la possibilité que ces élongations tubulaires puissent s'initier à plusieurs positions sur l'anneau (Figure 72). Cette hypothèse, très attractive est corroborée par la localisation de Bin-GFP surexprimée dans les myotubes. Les images de microscopie à fluorescence dite de super-résolution (Figure 53) ainsi que les expériences in-vitro avec Bin1 recombinante (Figure 55) démontrent que des plusieurs tubes peuvent émaner d'un seul anneau.



**Figure 72. La fusion des cavéoles et Bin1 permettent la formation de tubes provenant des anneaux de cavéoles.**

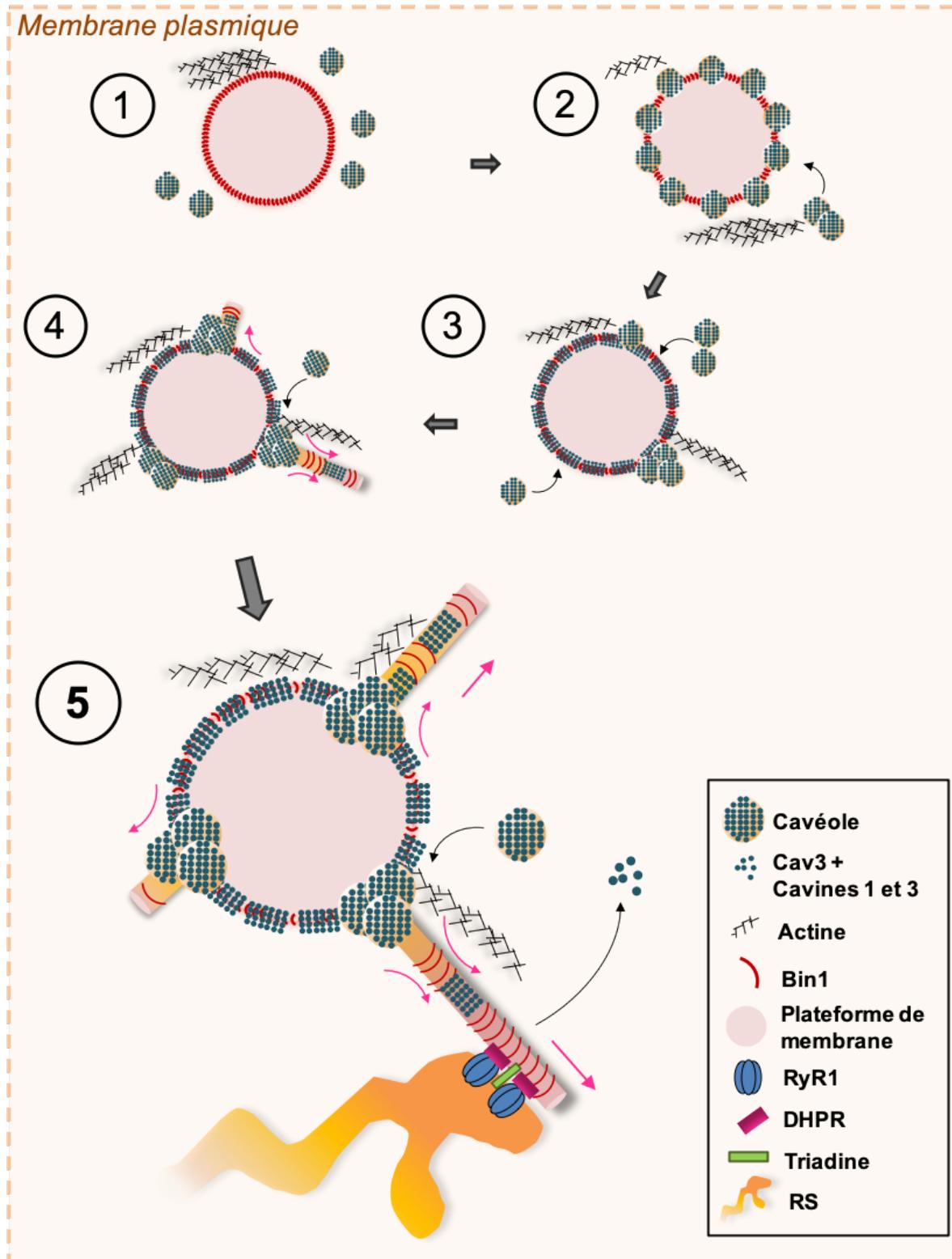
**(1)** Bin1 à l'origine de plateformes de membranes plasmiques dans les cellules musculaires. **(2)** Les cavéoles s'organisent sur la plateforme pour former les anneaux de cavéoles. **(3)** Les cavéoles fusionnent au niveau de la plateforme et s'agrègent à certaines zones de l'anneau de cavéoles. **(4)** Représentation schématique de la tubulation des membranes à partir des anneaux de cavéoles. Bin1 tubule les membranes. Des tubes de membrane émanent, sous l'action de Bin1, des pôles riches en cavéoles de l'anneau. On retrouve du manteau cavéolaire le long des tubules naissants avec les filaments de cavine/cavéoline organisés transversalement le long du tube.

Le domaine BAR de Bin1 lui permet de courber des membranes et ainsi de les tubuler, comme nous l'avons montré lors de sa surexpression in vivo et in vitro. Nous en avons déduit que la tubulation au départ des anneaux de cavéoles était induite par Bin1. Quelle est donc la fonction exacte de la cavéole dans ce processus ? Est-ce juste un substrat qui est déjà courbe ou y a-t-il une interaction entre Bin1 et les protéines des cavéoles ? Il faudrait tenter d'étudier les interactions des protéines cavéolaires unes à unes afin de déterminer lesquelles sont importantes dans ce processus. Les travaux

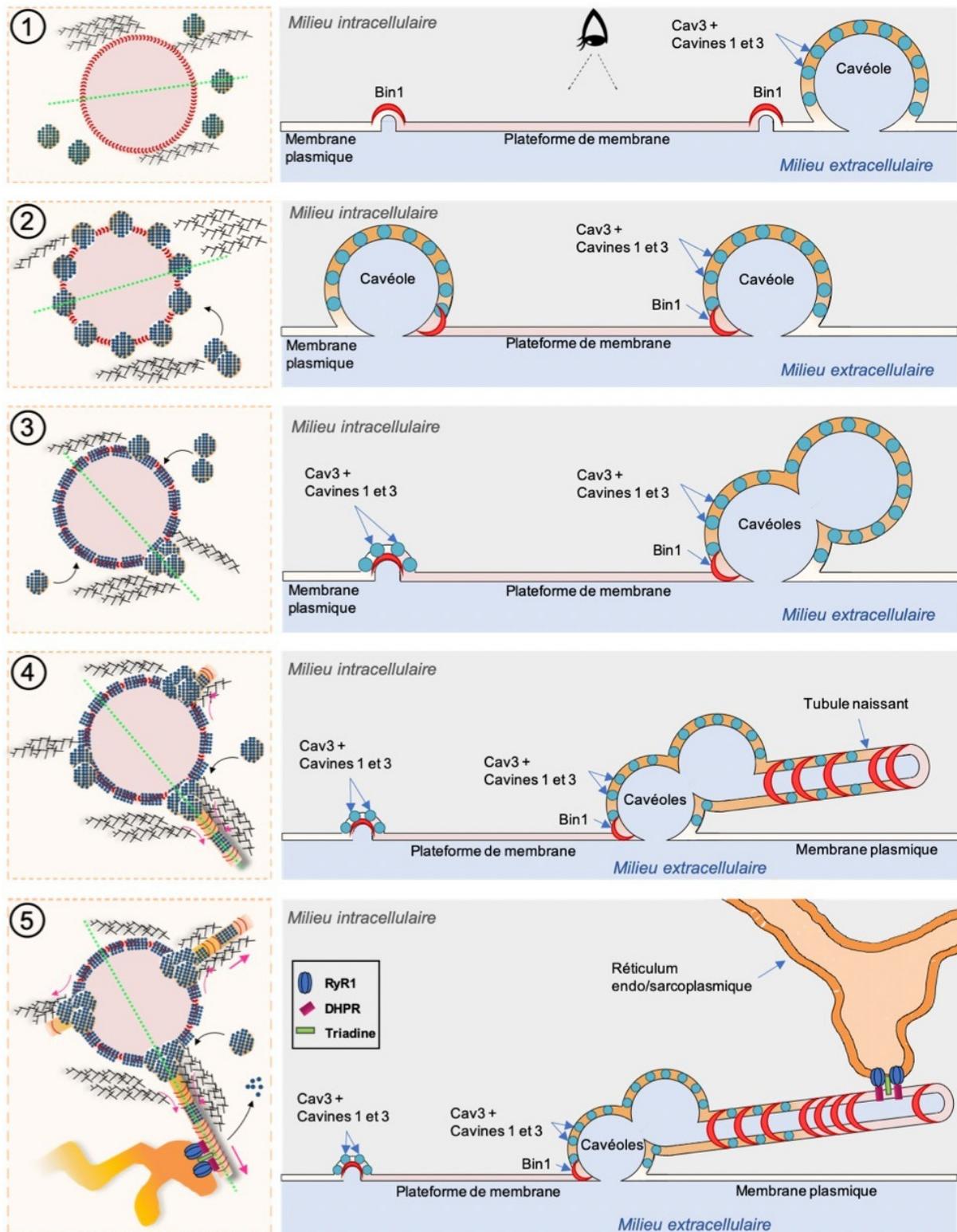
récents montrant que Bin1 interagit avec la cavine 4 au niveau de tubules-T en formation (Lo et al. 2021) permettent de penser que les cavéoles attirent Bin1 par des interactions protéine-protéine. Une de ces deux protéines pourrait donc être nécessaire à recruter Bin1 au niveau de ces sites de nucléation de tubules-T. Une fois l'initiation de la tubulation engagée on observe toujours la présence d'un manteau cavéolaire à la surface des tubules. Cependant au fur et à mesure de l'allongement des tubules-T immatures nous avons observé la disparition de ce manteau. Cette disparition coïncide avec la formation de contacts entre le réticulum sarcoplasmique (RS) et le tubule-T naissant qui se font plus en profondeur du myotube. Nous avons émis l'hypothèse que le désassemblage des protéines cavéolaires libérerait la membrane du tubule qui pourrait alors être accessible aux protéines du RS. Nous avons ainsi finalisé notre modèle (Figure 73) qui représente le mécanisme putatif complet de formation des tubules-T depuis le sarcolemme à partir des anneaux de cavéoles (Figures 73 et 74).

Au cours de mes observations j'avais observé un rapprochement du RS avec les anneaux de cavéoles mais pas de contact direct entre ces deux structures. Ces contacts semblaient se faire avec la plateforme centrale de l'anneau de cavéoles.

Dans un article récent, l'équipe de Rob Parton a étudié l'interaction de la cavine 4 et de Bin1 dans le muscle (Lo et al. 2021). Ils ont décrit une interaction directe de la cavine 4 avec Bin1, le domaine riche en proline (PRD) de la cavine 4 interagit avec le domaine de liaison SH3 de Bin1 situé au niveau de son extrémité C-terminale. Ils ont proposé que la cavine 4 aurait un rôle dans le remodelage de la membrane des tubules-T au moment du développement précoce en recyclant les cavéoles de la membrane des tubules-T (Lo et al. 2021). Cela permet de générer un domaine de tubule-T stable et sans cavéoles qui paraît essentiel au bon fonctionnement des tubules-T. Dans notre modèle nous avons remarqué que les interactions des tubules issus des anneaux de cavéoles avec le RS se faisaient au niveau des tubules lisses sans matériel cavéolaire. Notre hypothèse semble donc en accord avec les observations déjà réalisées dans le poisson zèbre, c'est-à-dire qu'il est nécessaire que le matériel cavéolaire soit recyclé du tubule-T afin de le rendre fonctionnel.



**Figure 73. Les protéines cavéolaires quittent le tubule permettant la mise en place de la triade.** (1) Bin1 à l'origine de plateformes de membranes plasmiques dans les cellules musculaires. (2) Les cavéoles s'organisent sur la plateforme pour former les anneaux de cavéoles. (3) Les cavéoles fusionnent au niveau de la plateforme et s'agrègent à certaines zones de l'anneau de cavéoles. (4) La fusion des cavéoles et Bin1 permettent la formation de tubes provenant des anneaux de cavéoles. (5) Représentation schématique de l'élongation du tubule-T à partir de l'anneau de cavéoles. Les protéines cavéolaires (Cav-3 et la cavine 4) quittent la membrane tubulaire permettant ainsi des contacts entre le tube et le RS et donc la mise en place du couplage E-C entre les canaux calciques RyR1 et DHPR au niveau de la triade.



**Figure 74. Vue en coupe transversale du mécanisme de formation des tubules-T à partir d'un anneau membranaire de Bin1.**

(1) Bin1 à l'origine de plateformes de membranes plasmiques dans les cellules musculaires. (2) Les cavéoles s'organisent sur la plateforme pour former les anneaux de cavéoles. (3) Les cavéoles fusionnent au niveau de la plateforme et s'agrègent à certaines zones de l'anneau de cavéoles. (4) La fusion des cavéoles et Bin1 permettent la formation de tubes provenant des anneaux de cavéoles. (5) Les protéines cavéolaires quittent le tubule permettant la mise en place de la triade.

Il semblerait donc que l'accumulation de cavéoles et de Cav-3 au niveau des tubules-T, peut-être à cause de la similarité entre leur composition lipidique (Carozzi et al. 2000), soit essentielle pour leur formation. Cependant ce qui semble être l'étape clé dans l'élongation des tubules-T et la formation de triades est la suppression des cavéoles de la membrane du tubule (Lo et al. 2021). C'est dans cette étape que l'interaction entre la cavine 4 et Bin1 aurait un rôle. Le recyclage du matériel cavéolaire pourrait ainsi permettre l'interaction du RS avec les tubules-T. De même, il a été montré qu'en l'absence de cavine 4, une surexpression de Bin1 permet de restaurer la redistribution de Cav-3 du tubule-T au sarcolemme. Ceci suggère que Bin1 contribue au recyclage des composants des tubules-T précoces et est liée à l'activité de la cavine 4.

Nous avons montré cours de notre étude l'importance des cavéoles dans la formation des tubules-T et ce par l'organisation d'une structure nouvellement décrite, l'anneau de cavéoles. Il faut cependant noter que les cavéoles ne sont pas absolument essentielles à la formation des tubules-T. Par exemple, la drosophile présente un système de tubule-T alors qu'elle n'exprime pas de cavéoline mais sa fonction semble être prise en charge par les fofilines (Galbiati et al. 2001; Kirkham et al. 2008). Cependant dans les espèces étudiées telles que le poisson zèbre, la souris, l'humain et le poulet, la perte des cavéoles entraîne une désorganisation des tubules-T souvent associée à des défauts musculaires (Al-Qusairi et Laporte 2011).

Notre étude a été réalisée dans des modèles cellulaires. Bien qu'utile et puissant ce modèle n'est pas totalement physiologique et la fonction de Cav-3 devra être testée *in vivo* sur un modèle murin. Il pourrait s'agir de l'utilisation de souris invalidées pour le gène de Cav-3 ou d'un vecteur de type shRNA transduit à la naissance des souris. Ces outils pourraient apporter de précieuses informations sur l'implication de Cav-3 dans la formation des tubules-T au cours des différentes phases de développement: la première phase de formation de tubules longitudinaux ou la seconde phase lorsqu'il s'organisent transversalement (Flucher et al. 1991). Une autre expérience qui permettrait de tester l'importance de Cav-3 dans la première phase, consisterait à injecter un shRNA au niveau des cellules satellites des muscles de souris adultes puis entraîner une lésion dans les muscles avec de la cardiotoxine (Couteaux et al. 1988) afin d'induire la formation des tubules-T dans les fibres en régénération.

## IV. CONSEQUENCES SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DES CAVEOLINOPATHIES

---

Après avoir étudié le processus de formation des tubules-T dans le contexte d'un défaut d'expression de Cav-3, j'ai étudié les anneaux de cavéoles et la tubulation par Bin1 dans des cellules de patients présentant la mutation R26Q dans le gène CAV-3. Cette mutation entraîne un phénotype sévère de dystrophie musculaire des ceintures 1c (LGMD1C)(Figarella-Branger et al. 2003), une maladie des muscles dits "ondulants" (Vogler et al. 2001) ainsi qu'une hyperCKémie (Carbone et al. 2000).

Dans la littérature il est décrit dans les muscles de patients une diminution de la quantité de cavéoles à la membrane plasmique, une agrégation de Cav-3 au niveau de l'appareil de Golgi ainsi que des défauts de morphologie des tubules-T (Gazzerro, et al. 2011). Dans mon modèle cellulaire j'ai bien décrit une agrégation de Cav-3 dans un compartiment intracellulaire. Cette agrégation serait due à l'incapacité d'adressage de la forme mutée de Cav-3 à la membrane plasmique. La cavéoline 3 formant des oligomères au niveau du réticulum endoplasmique, les oligomères Cav-3 mutée / Cav-3 non mutées seraient séquestrés dans l'appareil de Golgi avant qu'elle soit dégradée. On aurait ainsi une diminution de la quantité de Cav-3 disponible au sarcolemme, ainsi qu'une diminution de la quantité totale de Cav-3.

Cependant, dans mon modèle de cellules de patients un grand nombre de cavéoles est toujours présent à la membrane plasmique. On peut supposer qu'un certain nombre d'oligomères de Cav-3 mutée / Cav-3 non mutée parvient à atteindre le sarcolemme malgré le mauvais adressage de la Cav-3 mutée. De plus, la cellule pourrait mettre en place un mécanisme de compensation du déficit en cavéoles en formant des cavéoles enrichies en Cav-1 à la place des cavéoles Cav-3. Afin d'étudier ces hypothèses nous pourrions isoler les cavéoles biochimiquement, d'après des méthodes déjà bien décrites (Westermann et al. 1999) et étudier leur composition exacte en cavéolines et protéines associées.

Notre résultat le plus important est l'observation de défauts dans la formation des anneaux de cavéoles ainsi que les défauts de tubulation par Bin1. On peut supposer que les cavéoles mixtes Cav-3 mutée / Cav-3 non mutée ne pourraient pas se placer efficacement au niveau de la plateforme de Bin1. Ensuite les mutations pourraient

altérer la fusion des cavéoles au niveau de l'anneau et ainsi perturber l'initiation du tube. Finalement, les protéines mutées pourraient être incapables de quitter le tubule neo-formé et pas conséquence inhiber la formation de contacts avec le RS.

Nous pourrions envisager la mise en place d'une restauration de la formation de ces structures grâce à deux techniques : (a) d'abord, nous pourrions surexprimer Cav-3 non mutée dans la cellule afin d'augmenter la quantité de Cav-3 à atteindre le sarcolemme. Cette méthode semble cependant compromise car la protéine non mutée resterait séquestrée par la forme mutée au niveau de l'appareil de Golgi. De plus la forme mutée pourrait toujours atteindre la membrane plasmique et altérer la structure des cavéoles. La seconde méthode que nous pourrions utiliser est la diminution de la quantité de Cav-3 mutée dans la cellule. Pour cela nous pourrions mettre en place une technique par ARN interférence allèle spécifique comme déjà développée par l'équipe pour invalider l'allèle muté du gène de la DNM2 dans la myopathie autosomique dominante (Trochet et al. 2018).

Au cours de ma thèse j'ai défini une nouvelle structure membranaire de la cellule musculaire, l'anneau de cavéoles. Cette plateforme, induite par une organisation circulaire de la protéine Bin1 à la membrane plasmique, est la structure essentielle à l'initiation de la formation des tubules-T. J'ai montré qu'un déficit en Cav-3, induit ou dû à des mutations, entraînait des défauts de formation des anneaux de cavéoles ainsi que des défauts de tubulation par Bin1. Mes résultats confirment le modèle selon lequel le désassemblage des protéines cavéolaires du tube serait nécessaire pour permettre l'élongation du tubule-T et la mise en place du complexe responsable du couplage excitation-contraction.

La découverte de ces nouvelles structures cavéolaires et l'étude de leurs défauts dans le contexte de myopathies congénitales présentant des défauts d'organisation des tubules-T pourraient ouvrir la porte à de nouvelles thérapies ciblant les cavéoles, les lipides membranaires et les étapes précoces de la formation des tubules-T.



---

# REFERENCES

---

**- A -**

- Abmayr, S. M., et G. K. Pavlath. 2012. « Myoblast Fusion: Lessons from Flies and Mice ». *Development* 139 (4): 641-56. <https://doi.org/10.1242/dev.068353>.
- Alias, Laura, Pía Gallano, Dolores Moreno, Ramón Pujol, Juan Antonio Martínez-Matos, Montserrat Baiget, Isidro Ferrer, et Montse Olivé. 2004. « A Novel Mutation in the Caveolin-3 Gene Causing Familial Isolated HyperCKaemia ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 14 (5): 321-24. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.01.006>.
- Al-Qusairi, Lama, et Jocelyn Laporte. 2011. « T-Tubule Biogenesis and Triad Formation in Skeletal Muscle and Implication in Human Diseases ». *Skeletal Muscle* 1 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-26>.
- Al-Qusairi, Lama, Norbert Weiss, Anne Toussaint, Céline Berbey, Nadia Messaddeq, Christine Kretz, Despina Sanoudou, et al. 2009. « T-Tubule Disorganization and Defective Excitation-Contraction Coupling in Muscle Fibers Lacking Myotubularin Lipid Phosphatase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18763-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900705106>.
- Anderson, R. G. 1998. « The Caveolae Membrane System ». *Annual Review of Biochemistry* 67: 199-225. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.199>.
- Anderson, R.G.W. 1991. « Molecular motors that shape endocytic membrane ». In *Intracellular Trafficking of Proteins*, Cambridge University Press, 13-47. Cambridge.
- Araya, Roberto, José L. Liberona, J. César Cárdenas, Nora Riveros, Manuel Estrada, Jeanne A. Powell, M. Angélica Carrasco, et Enrique Jaimovich. 2003. « Dihydropyridine Receptors as Voltage Sensors for a Depolarization-evoked, IP3R-mediated, Slow Calcium Signal in Skeletal Muscle Cells ». *The Journal of General Physiology* 121 (1): 3-16. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028671>.
- Ardissone, Anna, Cinzia Bragato, Lorella Caffi, Flavia Blasevich, Sabrina Maestrini, Maria Luisa Bianchi, Lucia Morandi, Isabella Moroni, et Marina Mora. 2013. « Novel PTRF Mutation in a Child with Mild Myopathy and Very Mild Congenital Lipodystrophy ». *BMC Medical Genetics* 14 (septembre): 89. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-89>.
- Austin, Eric D., Lijiang Ma, Charles LeDuc, Erika Berman Rosenzweig, Alain Borczuk, John A. Phillips, Teresa Palomero, et al. 2012. « Whole Exome Sequencing to Identify a Novel Gene (Caveolin-1) Associated with Human Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 5 (3): 336-43. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.961888>.

**- B -**

- Bae, Jong Seok, Chang-Seok Ki, Jong-Won Kim, Yeon-Lim Suh, Min Soo Park, Byung Joon Kim, et Sung-Jae Kim. 2007. « A Novel In-Frame Deletion in the CAV3 Gene in a Korean Patient with Rippling Muscle Disease ». *Journal of the Neurological Sciences* 260 (1-2): 275-78. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.04.023>.
- Bansal, Dimple, Katsuya Miyake, Steven S. Vogel, Séverine Groh, Chien-Chang Chen, Roger Williamson, Paul L. McNeil, et Kevin P. Campbell. 2003. « Defective Membrane Repair in Dysferlin-Deficient Muscular Dystrophy ». *Nature* 423 (6936): 168-72. <https://doi.org/10.1038/nature01573>.
- Bastiani, Michele, Libin Liu, Michelle M. Hill, Mark P. Jedrychowski, Susan J. Nixon, Harriet P. Lo, Daniel Abankwa, et al. 2009. « MURC/Cavin-4 and Cavin Family Members Form Tissue-Specific Caveolar Complexes ». *The Journal of Cell Biology* 185 (7): 1259. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903053>.

## REFERENCES

- Beard, N. A., D. R. Laver, et A. F. Dulhunty. 2004. « Calsequestrin and the Calcium Release Channel of Skeletal and Cardiac Muscle ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 85 (1): 33-69. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.07.001>.
- Beauchamp, Jonathan R., Louise Heslop, David S.W. Yu, Shahragim Tajbakhsh, Robert G. Kelly, Anton Wernig, Margaret E. Buckingham, Terence A. Partridge, et Peter S. Zammit. 2000. « Expression of Cd34 and Myf5 Defines the Majority of Quiescent Adult Skeletal Muscle Satellite Cells ». *Journal of Cell Biology* 151 (6): 1221-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1221>.
- Bers, Donald M. 2004. « Macromolecular Complexes Regulating Cardiac Ryanodine Receptor Function ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (2): 417-29. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.026>.
- Betz, R. C., B. G. Schoser, D. Kasper, K. Ricker, A. Ramírez, V. Stein, T. Torbergson, et al. 2001. « Mutations in CAV3 Cause Mechanical Hyperirritability of Skeletal Muscle in Rippling Muscle Disease ». *Nature Genetics* 28 (3): 218-19. <https://doi.org/10.1038/90050>.
- Bezakova, Gabriela, Johannes P. Helm, Maura Francolini, et Terje Lømo. 2001. « Effects of Purified Recombinant Neural and Muscle Agrin on Skeletal Muscle Fibers in Vivo ». *The Journal of Cell Biology* 153 (7): 1441-52.
- Bitoun, Marc, Svetlana Maugenre, Pierre-Yves Jeannot, Emmanuelle Lacène, Xavier Ferrer, Pascal Laforêt, Jean-Jacques Martin, et al. 2005. « Mutations in Dynamin 2 Cause Dominant Centronuclear Myopathy ». *Nature Genetics* 37 (11): 1207-9. <https://doi.org/10.1038/ng1657>.
- Blondeau, F., J. Laporte, S. Bodin, G. Superti-Furga, B. Payrastre, et J. L. Mandel. 2000. « Myotubularin, a Phosphatase Deficient in Myotubular Myopathy, Acts on Phosphatidylinositol 3-Kinase and Phosphatidylinositol 3-Phosphate Pathway ». *Human Molecular Genetics* 9 (15): 2223-29. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.hmg.a018913>.
- Bowman, W. C. 1990. *Pharmacology of neuromuscular function*. 2nd ed. London ; Boston: Wright.
- Breen, Michael R., Marta Camps, Francisco Carvalho-Simoes, Antonio Zorzano, et Paul F. Pilch. 2012. « Cholesterol Depletion in Adipocytes Causes Caveolae Collapse Concomitant with Proteosomal Degradation of Cavin-2 in a Switch-like Fashion ». *PloS One* 7 (4): e34516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034516>.
- Briand, Nolwenn, Soazig Le Lay, William C. Sessa, Pascal Ferré, et Isabelle Dugail. 2011. « Distinct Roles of Endothelial and Adipocyte Caveolin-1 in Macrophage Infiltration and Adipose Tissue Metabolic Activity ». *Diabetes* 60 (2): 448-53. <https://doi.org/10.2337/db10-0856>.
- Briand, Nolwenn, Cécilia Prado, Guillaume Mabilieu, Françoise Lasnier, Xavier Le Lièvre, Jeffrey D. Covington, Eric Ravussin, Soazig Le Lay, et Isabelle Dugail. 2014. « Caveolin-1 Expression and Cavin Stability Regulate Caveolae Dynamics in Adipocyte Lipid Store Fluctuation ». *Diabetes* 63 (12): 4032-44. <https://doi.org/10.2337/db13-1961>.
- Buckingham, Margaret, Lola Bajard, Ted Chang, Philippe Daubas, Juliette Hadchouel, Sigolène Meilhac, Didier Montarras, Didier Rocancourt, et Frédéric Relaix. 2003. « The formation of skeletal muscle: from somite to limb ». *Journal of Anatomy* 202 (1): 59-68. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x>.
- Buffelli, Mario, Giuseppe Busetto, Carlo Bidoia, Morgana Favero, et Alberto Cangiano. 2004. « Activity-Dependent Synaptic Competition at Mammalian Neuromuscular Junctions ». *Physiology* 19 (3): 85-91. <https://doi.org/10.1152/nips.01464.2003>.
- Burgener, R., M. Wolf, T. Ganz, et M. Baggiolini. 1990. « Purification and Characterization of a Major Phosphatidylserine-Binding Phosphoprotein from Human Platelets ». *The Biochemical Journal* 269 (3): 729-34. <https://doi.org/10.1042/bj2690729>.

## REFERENCES

Butler, M. H., C. David, G. C. Ochoa, Z. Freyberg, L. Daniell, D. Grabs, O. Cremona, et P. De Camilli. 1997. « Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a Member of the Amphiphysin/Rvs Family, Is Concentrated in the Cortical Cytomatrix of Axon Initial Segments and Nodes of Ranvier in Brain and around T Tubules in Skeletal Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 137 (6): 1355-67. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.6.1355>.

### - C -

Cadot, Bruno, Vincent Gache, et Edgar R. Gomes. 2015. « Moving and Positioning the Nucleus in Skeletal Muscle - One Step at a Time ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 6 (5): 373-81. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1090073>.

Cagliani, R., N. Bresolin, A. Prella, A. Gallanti, F. Fortunato, M. Sironi, P. Ciscato, et al. 2003. « A CAV3 Microdeletion Differentially Affects Skeletal Muscle and Myocardium ». *Neurology* 61 (11): 1513-19. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000097320.35982.03>.

Cai, Chuanxi, Noah Weisleder, Jae-Kyun Ko, Shinji Komazaki, Yoshihide Sunada, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, et Jianjie Ma. 2009. « Membrane Repair Defects in Muscular Dystrophy Are Linked to Altered Interaction between MG53, Caveolin-3, and Dysferlin ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (23): 15894-902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009589>.

Cao, Henian, Lindsay Alston, Jennifer Ruschman, et Robert A. Hegele. 2008. « Heterozygous CAV1 Frameshift Mutations (MIM 601047) in Patients with Atypical Partial Lipodystrophy and Hypertriglyceridemia ». *Lipids in Health and Disease* 7 (janvier): 3. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-7-3>.

Capozza, Franco, Alex W. Cohen, Michelle W.-C. Cheung, Federica Sotgia, William Schubert, Michela Battista, Hyangkyu Lee, Philippe G. Frank, et Michael P. Lisanti. 2005. « Muscle-Specific Interaction of Caveolin Isoforms: Differential Complex Formation between Caveolins in Fibroblastic vs. Muscle Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 288 (3): C677-691. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00232.2004>.

Capozza, Franco, Terence M. Williams, William Schubert, Steve McClain, Boumediene Bouzahzah, Federica Sotgia, et Michael P. Lisanti. 2003. « Absence of Caveolin-1 Sensitizes Mouse Skin to Carcinogen-Induced Epidermal Hyperplasia and Tumor Formation ». *The American Journal of Pathology* 162 (6): 2029-39. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64335-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64335-0).

Carbone, I., C. Bruno, F. Sotgia, M. Bado, P. Broda, E. Masetti, A. Panella, et al. 2000. « Mutation in the CAV3 Gene Causes Partial Caveolin-3 Deficiency and HyperCKemia ». *Neurology* 54 (6): 1373-76. <https://doi.org/10.1212/wnl.54.6.1373>.

Carozzi, Amanda J., Elina Ikonen, Margaret R. Lindsay, et Robert G. Parton. 2000. « Role of Cholesterol in Developing T-Tubules: Analogous Mechanisms for T-Tubule and Caveolae Biogenesis ». *Traffic* 1 (4): 326-41. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010406.x>.

Chang, Yi-Wei, Songye Chen, Elitza I. Tocheva, Anke Treuner-Lange, Stephanie Löbach, Lotte Søgaard-Andersen, et Grant J. Jensen. 2014. « Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and electron cryotomography ». *Nature methods* 11 (7): 737-39. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2961>.

Charuk, J H, C Guerin, et P C Holland. 1992. « Sarcoplasmic-reticulum biogenesis in contraction-inhibited skeletal-muscle cultures. » *Biochemical Journal* 282 (Pt 2): 399-407.

Cheng, Xiaoyang, et Jonathan H. Jaggar. 2006. « Genetic ablation of caveolin-1 modifies Ca<sup>2+</sup> spark coupling in murine arterial smooth muscle cells ». *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 290 (6): H2309-19. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01226.2005>.

## REFERENCES

- Cohen, Alex W., Babak Razani, Xiao Bo Wang, Terry P. Combs, Terence M. Williams, Philipp E. Scherer, et Michael P. Lisanti. 2003. « Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285 (1): C222-35. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00006.2003>.
- Collot, Mayeul, Pichandi Ashokkumar, Halina Anton, Emmanuel Boutant, Orestis Faklaris, Thierry Galli, Yves Mély, Lydia Danglot, et Andrey S. Klymchenko. 2019. « MemBright: A Family of Fluorescent Membrane Probes for Advanced Cellular Imaging and Neuroscience ». *Cell Chemical Biology* 26 (4): 600-614.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.01.009>.
- Cooper, S. T., A. L. Maxwell, E. Kizana, M. Ghoddusi, E. C. Hardeman, I. E. Alexander, D. G. Allen, et K. N. North. 2004. « C2C12 Co-Culture on a Fibroblast Substratum Enables Sustained Survival of Contractile, Highly Differentiated Myotubes with Peripheral Nuclei and Adult Fast Myosin Expression ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 58 (3): 200-211. <https://doi.org/10.1002/cm.20010>.
- Couchoux, Harold, Hicham Bichraoui, Christophe Chouabe, Xavier Altafaj, Robert Bonvallet, Bruno Allard, Michel Ronjat, et Christine Berthier. 2011. « Caveolin-3 is a direct molecular partner of the Cav1.1 subunit of the skeletal muscle L-type calcium channel ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43 (5): 713-20. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.01.011>.
- Couteaux, R., J. C. Mira, et A. d'Albis. 1988. « Regeneration of Muscles after Cardiotoxin Injury. I. Cytological Aspects ». *Biology of the Cell* 62 (2): 171-82.
- Crosbie, Rachelle H, Hiroki Yamada, David P Venzke, Michael P Lisanti, et Kevin P Campbell. 1998. « Caveolin-3 Is Not an Integral Component of the Dystrophin Glycoprotein Complex ». *FEBS Letters* 427 (2): 279-82. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00442-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00442-6).
- Cusimano, V., F. Pampinella, E. Giacomello, et V. Sorrentino. 2009. « Assembly and Dynamics of Proteins of the Longitudinal and Junctional Sarcoplasmic Reticulum in Skeletal Muscle Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (12): 4695-4700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810243106>.

## - D -

- Demonbreun, Alexis R., Kaitlin E. Swanson, Ann E. Rossi, H. Kieran Deveaux, Judy U. Earley, Madison V. Allen, Priyanka Arya, et al. 2015. « Eps 15 Homology Domain (EHD)-1 Remodels Transverse Tubules in Skeletal Muscle ». *PLoS One* 10 (9): e0136679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136679>.
- Dewulf, Melissa, Darius Vasco Köster, Bidisha Sinha, Christine Viaris de Lesegno, Valérie Chambon, Anne Bigot, Mona Bensalah, et al. 2019. « Dystrophy-Associated Caveolin-3 Mutations Reveal That Caveolae Couple IL6/STAT3 Signaling with Mechanosensing in Human Muscle Cells ». *Nature Communications* 10 (1): 1974. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09405-5>.
- Di Biase, Valentina, et Clara Franzini-Armstrong. 2005. « Evolution of Skeletal Type e-c Coupling ». *Journal of Cell Biology* 171 (4): 695-704. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503077>.
- Díaz, Jorge, Pablo Mendoza, Rina Ortiz, Natalia Díaz, Lisette Leyton, Dwayne Stupack, Andrew F. G. Quest, et Vicente A. Torres. 2014. « Rab5 Is Required in Metastatic Cancer Cells for Caveolin-1-Enhanced Rac1 Activation, Migration and Invasion ». *Journal of Cell Science* 127 (Pt 11): 2401-6. <https://doi.org/10.1242/jcs.141689>.
- Dietzen, D. J., W. R. Hastings, et D. M. Lublin. 1995. « Caveolin Is Palmitoylated on Multiple Cysteine Residues. Palmitoylation Is Not Necessary for Localization of Caveolin to Caveolae ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (12): 6838-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.12.6838>.
- Dotti, M. Teresa, Alessandro Malandrini, Simona Gambelli, Claudio Salvadori, Nicola De Stefano, et Antonio Federico. 2006. « A New Missense Mutation in Caveolin-3 Gene Causes Rippling Muscle

## REFERENCES

Disease ». *Journal of the Neurological Sciences* 243 (1-2): 61-64. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.11.032>.

Dowling, James J., Romain Joubert, Sean E. Low, Ashley N. Durban, Nadia Messaddeq, Xingli Li, Ashley N. Dulin-Smith, et al. 2012. « Myotubular myopathy and the neuromuscular junction: a novel therapeutic approach from mouse models ». *Disease Models & Mechanisms* 5 (6): 852-59. <https://doi.org/10.1242/dmm.009746>.

Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, et al. 2001. « Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5539): 2449-52. <https://doi.org/10.1126/science.1062688>.

## - E -

Engelman, J. A., X. L. Zhang, et M. P. Lisanti. 1999. « Sequence and Detailed Organization of the Human Caveolin-1 and -2 Genes Located near the D7S522 Locus (7q31.1). Methylation of a CpG Island in the 5' Promoter Region of the Caveolin-1 Gene in Human Breast Cancer Cell Lines ». *FEBS Letters* 448 (2-3): 221-30. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00365-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00365-8).

Epand, Richard M., Brian G. Sayer, et Raquel F. Epand. 2005. « Caveolin Scaffolding Region and Cholesterol-Rich Domains in Membranes ». *Journal of Molecular Biology* 345 (2): 339-50. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.064>.

Ezerman, Elizabeth B., et Harunori Ishikawa. 1967. « DIFFERENTIATION OF THE SARCOPLASMIC RETICULUM AND T SYSTEM IN DEVELOPING CHICK SKELETAL MUSCLE IN VITRO ». *Journal of Cell Biology* 35 (2): 405-20. <https://doi.org/10.1083/jcb.35.2.405>.

## - F -

Falcone, Sestina, William Roman, Karim Hnia, Vincent Gache, Nathalie Didier, Jeanne Lainé, Frederic Auradé, et al. 2014. « N-WASP Is Required for Amphiphysin-2/BIN1-Dependent Nuclear Positioning and Triad Organization in Skeletal Muscle and Is Involved in the Pathophysiology of Centronuclear Myopathy ». *EMBO Molecular Medicine* 6 (11): 1455. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404436>.

Faulkner, G., G. Lanfranchi, et G. Valle. 2001. « Telethonin and Other New Proteins of the Z-Disc of Skeletal Muscle ». *IUBMB Life* 51 (5): 275-82. <https://doi.org/10.1080/152165401317190761>.

Fauré, J., S. Oddoux, I. Marty, et J. Lunardi. 2007. « Le complexe de relâchement du calcium du muscle squelettique et ses pathologies ». *La Revue de Médecine Interne* 28 (11): 801-4. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2007.05.024>.

Fernandez, Imma, Yunshu Ying, Joseph Albanesi, et Richard G. W. Anderson. 2002. « Mechanism of Caveolin Filament Assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (17): 11193-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.172196599>.

Fernández, Manuel A., Cecilia Albor, Mercedes Ingelmo-Torres, Susan J. Nixon, Charles Ferguson, Teymuraz Kurzchalia, Francesc Tebar, Carlos Enrich, Robert G. Parton, et Albert Pol. 2006. « Caveolin-1 Is Essential for Liver Regeneration ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5793): 1628-32. <https://doi.org/10.1126/science.1130773>.

Figarella-Branger, D., J. Pouget, R. Bernard, M. Krahn, C. Fernandez, N. Lévy, et J. F. Pellissier. 2003. « Limb-Girdle Muscular Dystrophy in a 71-Year-Old Woman with an R27Q Mutation in the CAV3 Gene ». *Neurology* 61 (4): 562-64. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000076486.57572.5c>.

## REFERENCES

- Fischer, Dirk, Anja Schroers, Ingmar Blümcke, Horst Urbach, Klaus Zerres, Wilhelm Mortier, Matthias Vorgerd, et Rolf Schröder. 2003. « Consequences of a Novel Caveolin-3 Mutation in a Large German Family ». *Annals of Neurology* 53 (2): 233-41. <https://doi.org/10.1002/ana.10442>.
- Fishman, Robert A. 1994. « Myology: Basic and Clinical, Second Edition, Vols 1 and 2. Edited by Andrew G. Engel and Clara Franzini-Armstrong, New York, McGraw-Hill, 1994, 1937 Pp. Illustrated. \$350.00 ». *Annals of Neurology* 36 (5): 808-808. <https://doi.org/10.1002/ana.410360536>.
- Flucher, B. E., S. B. Andrews, et M. P. Daniels. 1994. « Molecular Organization of Transverse Tubule/Sarcoplasmic Reticulum Junctions during Development of Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle ». *Molecular Biology of the Cell* 5 (10): 1105-18. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.10.1105>.
- Flucher, B. E., H. Takekura, et C. Franzini-Armstrong. 1993. « Development of the Excitation-Contraction Coupling Apparatus in Skeletal Muscle: Association of Sarcoplasmic Reticulum and Transverse Tubules with Myofibrils ». *Developmental Biology* 160 (1): 135-47. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1292>.
- Flucher, Bernhard E., Mark Terasaki, Hemin Chin, Troy J. Beeler, et Mathew P. Daniels. 1991. « Biogenesis of Transverse Tubules in Skeletal Muscle in Vitro ». *Developmental Biology* 145 (1): 77-90. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90214-N](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90214-N).
- Forcina, Laura, Marianna Cosentino, et Antonio Musarò. 2020. « Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing ». *Cells* 9 (5). <https://doi.org/10.3390/cells9051297>.
- Fosset, M., E. Jaimovich, E. Delpont, et M. Lazdunski. 1983. « [3H]Nitrendipine Receptors in Skeletal Muscle ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (10): 6086-92.
- Fra, A. M., E. Williamson, K. Simons, et R. G. Parton. 1995. « De Novo Formation of Caveolae in Lymphocytes by Expression of VIP21-Caveolin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19): 8655-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8655>.
- Frank, Andreas, et Matthias Unger. 2006. « Analysis of Frankincense from Various Boswellia Species with Inhibitory Activity on Human Drug Metabolising Cytochrome P450 Enzymes Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry after Automated On-Line Extraction ». *Journal of Chromatography. A* 1112 (1-2): 255-62. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.116>.
- Franzini-Armstrong, C. 1970. « STUDIES OF THE TRIAD : I. Structure of the Junction in Frog Twitch Fibers ». *The Journal of Cell Biology* 47 (2): 488-99. <https://doi.org/10.1083/jcb.47.2.488>.
- . 1991. « Simultaneous Maturation of Transverse Tubules and Sarcoplasmic Reticulum during Muscle Differentiation in the Mouse ». *Developmental Biology* 146 (2): 353-63.
- Franzini-Armstrong, C., A. B. Eastwood, et L. D. Peachey. 1986. « Shape and Disposition of Clefts, Tubules, and Sarcoplasmic Reticulum in Long and Short Sarcomere Fibers of Crab and Crayfish ». *Cell and Tissue Research* 244 (1): 9-19. <https://doi.org/10.1007/BF00218376>.
- Franzini-Armstrong, C., L. Landmesser, et G. Pilar. 1975. « Size and Shape of Transverse Tubule Openings in Frog Twitch Muscle Fibers ». *The Journal of Cell Biology* 64 (2): 493-97. <https://doi.org/10.1083/jcb.64.2.493>.
- Franzini-Armstrong, C., et G. Nunzi. 1983. « Junctional Feet and Particles in the Triads of a Fast-Twitch Muscle Fibre ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 4 (2): 233-52. <https://doi.org/10.1007/BF00712033>.
- Franzini-Armstrong, C., et F. Protasi. 1997. « Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions ». *Physiological Reviews* 77 (3): 699-729. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.699>.

## REFERENCES

Franzini-Armstrong, Clara. 2018. « The Relationship between Form and Function throughout the History of Excitation-Contraction Coupling ». *The Journal of General Physiology* 150 (2): 189-210. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711889>.

Franzini-armstrong, Clara, et Keith R. Porter. 1964a. « SARCOLEMMAL INVAGINATIONS CONSTITUTING THE T SYSTEM IN FISH MUSCLE FIBERS ». *Journal of Cell Biology* 22 (3): 675-96. <https://doi.org/10.1083/jcb.22.3.675>.

———. 1964b. « SARCOLEMMAL INVAGINATIONS CONSTITUTING THE T SYSTEM IN FISH MUSCLE FIBERS ». *The Journal of Cell Biology* 22 (3): 675-96.

Fugier, Charlotte, Arnaud F. Klein, Caroline Hammer, Stéphane Vassilopoulos, Ylva Ivarsson, Anne Toussaint, Valérie Tosch, et al. 2011. « Misregulated Alternative Splicing of BIN1 Is Associated with T Tubule Alterations and Muscle Weakness in Myotonic Dystrophy ». *Nature Medicine* 17 (6): 720-25. <https://doi.org/10.1038/nm.2374>.

Fulizio, Luigi, Anna Chiara Nascimbeni, Marina Fanin, Giulio Piluso, Luisa Politano, Vincenzo Nigro, et Corrado Angelini. 2005. « Molecular and Muscle Pathology in a Series of Caveolinopathy Patients ». *Human Mutation* 25 (1): 82-89. <https://doi.org/10.1002/humu.20119>.

## - G -

Galbiati, F., D. Volonte, J. A. Engelman, P. E. Scherer, et M. P. Lisanti. 1999. « Targeted Down-Regulation of Caveolin-3 Is Sufficient to Inhibit Myotube Formation in Differentiating C2C12 Myoblasts. Transient Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Required for Induction of Caveolin-3 Expression and Subsequent Myotube Formation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 30315-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30315>.

Galbiati, F., D. Volonte, J. A. Engelman, G. Watanabe, R. Burk, R. G. Pestell, et M. P. Lisanti. 1998. « Targeted Downregulation of Caveolin-1 Is Sufficient to Drive Cell Transformation and Hyperactivate the P42/44 MAP Kinase Cascade ». *The EMBO Journal* 17 (22): 6633-48. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6633>.

Galbiati, F., D. Volonte, C. Minetti, D. B. Bregman, et M. P. Lisanti. 2000. « Limb-Girdle Muscular Dystrophy (LGMD-1C) Mutants of Caveolin-3 Undergo Ubiquitination and Proteasomal Degradation. Treatment with Proteasomal Inhibitors Blocks the Dominant Negative Effect of LGMD-1C Mutanta and Rescues Wild-Type Caveolin-3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 37702-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006657200>.

Galbiati, Ferruccio, Jeffrey A. Engelman, Daniela Volonte, Xiao Lan Zhang, Carlo Minetti, Maomi Li, Harry Hou, Burkhard Kneitz, Winfried Edelmann, et Michael P. Lisanti. 2001. « Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae, Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex, and T-Tubule Abnormalities ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (24): 21425-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100828200>.

Galbiati, Ferruccio, Babak Razani, et Michael P Lisanti. 2001. « Caveolae and Caveolin-3 in Muscular Dystrophy ». *Trends in Molecular Medicine* 7 (10): 435-41. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02105-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02105-0).

Gambin, Yann, Nicholas Ariotti, Kerrie-Ann McMahon, Michele Bastiani, Emma Sierrecki, Oleksiy Kovtun, Mark E. Polinkovsky, et al. 2013. « Single-Molecule Analysis Reveals Self Assembly and Nanoscale Segregation of Two Distinct Cavin Subcomplexes on Caveolae ». *ELife* 3 (janvier): e01434. <https://doi.org/10.7554/eLife.01434>.

Gao, L., D. Balshaw, L. Xu, A. Tripathy, C. Xin, et G. Meissner. 2000. « Evidence for a Role of the Luminal M3-M4 Loop in Skeletal Muscle Ca(2+) Release Channel (Ryanodine Receptor) Activity and Conductance ». *Biophysical Journal* 79 (2): 828-40. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76339-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76339-9).

## REFERENCES

- Garbino, Alejandro, Ralph J. van Oort, Sayali S. Dixit, Andrew P. Landstrom, Michael J. Ackerman, et Xander H. T. Wehrens. 2009. « Molecular evolution of the junctophilin gene family ». *Physiological Genomics* 37 (3): 175-86. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00017.2009>.
- García-Cardena, Guillermo, Pavel Martasek, Bettie Sue Siler Masters, Phillip M. Skidd, Jacques Couet, Shengwen Li, Michael P. Lisanti, et William C. Sessa. 1997. « Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF THE NOS CAVEOLIN BINDING DOMAIN IN VIVO ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (41): 25437-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25437>.
- Gazzerro, E., A. Bonetto, et C. Minetti. 2011. « Caveolinopathies: Translational Implications of Caveolin-3 in Skeletal and Cardiac Muscle Disorders ». *Handbook of Clinical Neurology* 101: 135-42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045031-5.00010-4>.
- Gazzerro, Elisabetta, Federica Sotgia, Claudio Bruno, Michael P. Lisanti, et Carlo Minetti. 2010. « Caveolinopathies: From the Biology of Caveolin-3 to Human Diseases ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 18 (2): 137-45. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.103>.
- Giannini, G., A. Conti, S. Mammarella, M. Scrobogna, et V. Sorrentino. 1995. « The Ryanodine Receptor/Calcium Channel Genes Are Widely and Differentially Expressed in Murine Brain and Peripheral Tissues ». *The Journal of Cell Biology* 128 (5): 893-904. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.5.893>.
- Giannini, G., et V. Sorrentino. 1995. « Molecular Structure and Tissue Distribution of Ryanodine Receptors Calcium Channels ». *Medicinal Research Reviews* 15 (4): 313-23. <https://doi.org/10.1002/med.2610150405>.
- Glennay, J. R., et D. Soppet. 1992. « Sequence and Expression of Caveolin, a Protein Component of Caveolae Plasma Membrane Domains Phosphorylated on Tyrosine in Rous Sarcoma Virus-Transformed Fibroblasts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10517-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10517>.
- Golani, Gonen, Nicholas Ariotti, Robert G. Parton, et Michael M. Kozlov. 2019. « Membrane Curvature and Tension Control the Formation and Collapse of Caveolar Superstructures ». *Developmental Cell* 48 (4): 523-538.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.005>.
- Gonzalez, Eva, Aaron Nagiel, Alison J. Lin, David E. Golan, et Thomas Michel. 2004. « Small Interfering RNA-Mediated Down-Regulation of Caveolin-1 Differentially Modulates Signaling Pathways in Endothelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (39): 40659-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407051200>.
- González Rodríguez, Estela, Romain Lefebvre, Dóra Bodnár, Claude Legrand, Peter Szentesi, János Vincze, Karine Poulard, et al. 2014. « Phosphoinositide Substrates of Myotubularin Affect Voltage-Activated Ca<sup>2+</sup> Release in Skeletal Muscle ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 466 (5): 973-85. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1346-5>.
- Gustincich, S., P. Vatta, S. Goruppi, M. Wolf, S. Saccone, G. Della Valle, M. Baggiolini, et C. Schneider. 1999. « The Human Serum Deprivation Response Gene (SDPR) Maps to 2q32-Q33 and Codes for a Phosphatidylserine-Binding Protein ». *Genomics* 57 (1): 120-29. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5733>.
- H -
- Hall, Thomas E., Nick Martel, Nicholas Ariotti, Zherui Xiong, Harriet P. Lo, Charles Ferguson, James Rae, Ye-Wheen Lim, et Robert G. Parton. 2020. « In vivo cell biological screening identifies an endocytic capture mechanism for T-tubule formation ». *Nature Communications* 11 (juillet). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17486-w>.

## REFERENCES

- Han, Bing, Courtney A. Copeland, Yumeko Kawano, Erika Berman Rosenzweig, Eric D. Austin, Layla Shahmirzadi, Sha Tang, Krishnan Raghunathan, Wendy K. Chung, et Anne K. Kenworthy. 2016. « Characterization of a Caveolin-1 Mutation Associated with Both Pulmonary Arterial Hypertension and Congenital Generalized Lipodystrophy ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 17 (12): 1297-1312. <https://doi.org/10.1111/tra.12452>.
- Hansen, Carsten G., Nicholas A. Bright, Gillian Howard, et Benjamin J. Nichols. 2009. « SDPR Induces Membrane Curvature and Functions in the Formation of Caveolae ». *Nature Cell Biology* 11 (7): 807-14. <https://doi.org/10.1038/ncb1887>.
- Hansen, Carsten Gram, Gillian Howard, et Benjamin J. Nichols. 2011. « Pacsin 2 Is Recruited to Caveolae and Functions in Caveolar Biogenesis ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 16): 2777-85. <https://doi.org/10.1242/jcs.084319>.
- Hansen, Carsten Gram, Elena Shvets, Gillian Howard, Kirsi Riento, et Benjamin James Nichols. 2013. « Deletion of cavin genes reveals tissue-specific mechanisms for morphogenesis of endothelial caveolae ». *Nature Communications* 4 (mai): 1831. <https://doi.org/10.1038/ncomms2808>.
- Hanson, Jean, et Hugh E. Huxley. 1953. « Structural Basis of the Cross-Striations in Muscle ». *Nature* 172 (4377): 530-32. <https://doi.org/10.1038/172530b0>.
- Hayashi, K., S. Matsuda, K. Machida, T. Yamamoto, Y. Fukuda, Y. Nimura, T. Hayakawa, et M. Hamaguchi. 2001. « Invasion Activating Caveolin-1 Mutation in Human Scirrhous Breast Cancers ». *Cancer Research* 61 (6): 2361-64.
- Hayashi, Yukiko K., Chie Matsuda, Megumu Ogawa, Kanako Goto, Kayo Tominaga, Satomi Mitsuhashi, Young-Eun Park, et al. 2009. « Human PTRF Mutations Cause Secondary Deficiency of Caveolins Resulting in Muscular Dystrophy with Generalized Lipodystrophy ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2623-33. <https://doi.org/10.1172/JCI38660>.
- Hayer, Arnold, Miriam Stoeber, Christin Bissig, et Ari Helenius. 2010. « Biogenesis of Caveolae: Stepwise Assembly of Large Caveolin and Cavin Complexes ». *Traffic* 11 (3): 361-82. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.01023.x>.
- Henley, John R., Eugene W.A. Krueger, Barbara J. Oswald, et Mark A. McNiven. 1998. « Dynamin-mediated Internalization of Caveolae ». *The Journal of Cell Biology* 141 (1): 85-99.
- Hernández-Deviez, Delia J., Sally Martin, Steven H. Laval, Harriet P. Lo, Sandra T. Cooper, Kathryn N. North, Kate Bushby, et Robert G. Parton. 2006. « Aberrant Dysferlin Trafficking in Cells Lacking Caveolin or Expressing Dystrophy Mutants of Caveolin-3 ». *Human Molecular Genetics* 15 (1): 129-42. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi434>.
- Herrmann, R., V. Straub, M. Blank, C. Kutzick, N. Franke, E. N. Jacob, H. G. Lenard, S. Kröger, et T. Voit. 2000. « Dissociation of the Dystroglycan Complex in Caveolin-3-Deficient Limb Girdle Muscular Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 9 (15): 2335-40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.hmg.a018926>.
- Hetmanski, Joseph H. R., Henry de Belly, Ignacio Busnelli, Thomas Waring, Roshna V. Nair, Vanesa Sokleva, Oana Dobre, et al. 2019. « Membrane Tension Orchestrates Rear Retraction in Matrix-Directed Cell Migration ». *Developmental Cell* 51 (4): 460-475.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.09.006>.
- Heuser, J. E., et M. W. Kirschner. 1980. « Filament Organization Revealed in Platinum Replicas of Freeze-Dried Cytoskeletons ». *The Journal of Cell Biology* 86 (1): 212-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.86.1.212>.
- Heuser, J E, T S Reese, M J Dennis, Y Jan, L Jan, et L Evans. 1979. « Synaptic Vesicle Exocytosis Captured by Quick Freezing and Correlated with Quantal Transmitter Release. » *Journal of Cell Biology* 81 (2): 275-300. <https://doi.org/10.1083/jcb.81.2.275>.

## REFERENCES

- Heuser, John. 2000a. « Membrane Traffic in Anaglyph Stereo ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1 (1): 35-37. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010106.x>.
- . 2000b. « The Production of 'Cell Cortices' for Light and Electron Microscopy ». *Traffic* 1 (7): 545-52. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010704.x>.
- Hidalgo, C., M. E. Gonzalez, et R. Lagos. 1983. « Characterization of the Ca<sup>2+</sup>- or Mg<sup>2+</sup>-ATPase of Transverse Tubule Membranes Isolated from Rabbit Skeletal Muscle ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (22): 13937-45.
- Hill, Michelle M., Michele Bastiani, Robert Luetterforst, Matthew Kirkham, Annika Kirkham, Susan J. Nixon, Piers Walser, et al. 2008. « PTRF-cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function ». *Cell* 132 (1): 113-24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.042>.
- Hirama, Takashi, Raibatak Das, Yanbo Yang, Charles Ferguson, Amy Won, Christopher M. Yip, Jason G. Kay, Sergio Grinstein, Robert G. Parton, et Gregory D. Fairn. 2017. « Phosphatidylserine Dictates the Assembly and Dynamics of Caveolae in the Plasma Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (34): 14292-307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.791400>.
- Hnia, Karim, Helene Tronchère, Kinga K. Tomczak, Leonela Amoasii, Patrick Schultz, Alan H. Beggs, Bernard Payrastre, Jean Louis Mandel, et Jocelyn Laporte. 2011. « Myotubularin Controls Desmin Intermediate Filament Architecture and Mitochondrial Dynamics in Human and Mouse Skeletal Muscle ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (1): 70-85. <https://doi.org/10.1172/JCI44021>.
- Hoyle, G. 1969. « Comparative Aspects of Muscle ». *Annual Review of Physiology* 31 (1): 43-82. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.31.030169.000355>.
- Hu, Hongli, Zhao Wang, Risheng Wei, Guizhen Fan, Qiongling Wang, Kaiming Zhang, et Chang-Cheng Yin. 2015. « The Molecular Architecture of Dihydropyridine Receptor/L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Complex ». *Scientific Reports* 5 (1): 8370. <https://doi.org/10.1038/srep08370>.
- Huang, Haixia, Chilman Bae, Frederick Sachs, et Thomas M. Suchyna. 2013. « Caveolae Regulation of Mechanosensitive Channel Function in Myotubes ». Édité par Michael Koval. *PLoS ONE* 8 (8): e72894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072894>.
- Hudson, Anna L., Simon C. Gandevia, et Jane E. Butler. 2019. « A Principle of Neuromechanical Matching for Motor Unit Recruitment in Human Movement ». *Exercise and Sport Sciences Reviews* 47 (3): 157-68. <https://doi.org/10.1249/JES.000000000000191>.
- Huxley, H. E. 1964. « Evidence for Continuity Between the Central Elements of the Triads and Extracellular Space in Frog Sartorius Muscle ». *Nature* 202 (4937): 1067-71. <https://doi.org/10.1038/2021067b0>.

- | -

- Ishikawa, Harunori. 1968. « Formation of Elaborate Networks of T-System Tubules in Cultured Skeletal Muscle with Special Reference to the T-System Formation ». *The Journal of Cell Biology* 38 (1): 51-66. <https://doi.org/10.1083/jcb.38.1.51>.
- Izumi, Y., S. i Hirai, Y. Tamai, A. Fujise-Matsuoka, Y. Nishimura, et S. Ohno. 1997. « A Protein Kinase Cdelta-Binding Protein SRBC Whose Expression Is Induced by Serum Starvation ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (11): 7381-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.7381>.

## - J -

- Jansa, P. 1998. « Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes ». *The EMBO Journal* 17 (10): 2855-64. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2855>.
- Jansen, J. K., et T. Fladby. 1990. « The Perinatal Reorganization of the Innervation of Skeletal Muscle in Mammals ». *Progress in Neurobiology* 34 (1): 39-90. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(90\)90025-c](https://doi.org/10.1016/0301-0082(90)90025-c).
- Jiwlawat, Nunnapas, Eileen Lynch, Jeremy Jeffrey, Jonathan M. Van Dyke, et Masatoshi Suzuki. 2018. « Current Progress and Challenges for Skeletal Muscle Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells Using Transgene-Free Approaches ». Review Article. *Stem Cells International*. Hindawi. 11 avril 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6241681>.
- Johnson, M. A., J. Polgar, D. Weightman, et D. Appleton. 1973. « Data on the Distribution of Fibre Types in Thirty-Six Human Muscles. An Autopsy Study ». *Journal of the Neurological Sciences* 18 (1): 111-29. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(73\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-510x(73)90023-3).
- Jones, Ross A., Carl Harrison, Samantha L. Eaton, Maica Llavero Hurtado, Laura C. Graham, Leena Alkhamash, Oladayo A. Oladiran, et al. 2017. « Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction ». *Cell Reports* 21 (9): 2348-56. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.008>.
- Joshi, Bharat, Michele Bastiani, Scott S. Strugnell, Cecile Boscher, Robert G. Parton, et Ivan R. Nabi. 2012. « Phosphocaveolin-1 Is a Mechanotransducer That Induces Caveola Biogenesis via Egr1 Transcriptional Regulation ». *The Journal of Cell Biology* 199 (3): 425-35. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207089>.
- Joshi, Bharat, Scott S. Strugnell, Jacky G. Goetz, Liliana D. Kojic, Michael E. Cox, Obi L. Griffith, Simon K. Chan, et al. 2008. « Phosphorylated Caveolin-1 Regulates Rho/ROCK-Dependent Focal Adhesion Dynamics and Tumor Cell Migration and Invasion ». *Cancer Research* 68 (20): 8210-20. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0343>.
- Jung, WooRam, Emma Sieracki, Michele Bastiani, Ailis O'Carroll, Kirill Alexandrov, James Rae, Wayne Johnston, et al. 2018. « Cell-Free Formation and Interactome Analysis of Caveolae ». *The Journal of Cell Biology* 217 (6): 2141-65. <https://doi.org/10.1083/jcb.201707004>.

## - K -

- Kaspar, B. K. 2009. « Gene Therapy: Direct Viral Delivery ». In *Encyclopedia of Neuroscience*, édité par Larry R. Squire, 633-39. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00012-7>.
- Kassan, Adam, Uyen Pham, Quynhmy Nguyen, Melissa E. Reichelt, Eunbyul Cho, Piyush M. Patel, David M. Roth, Brian P. Head, et Hemal H. Patel. 2016. « Caveolin-3 Plays a Critical Role in Autophagy after Ischemia-Reperfusion ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 311 (6): C854-65. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00147.2016>.
- Katz, B., et R. Miledi. 1967. « A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses ». *The Journal of Physiology* 192 (2): 407-36.
- Kelly, A. M. 1980. « T Tubules in Neonatal Rat Soleus and Extensor Digitorum Longus Muscles ». *Developmental Biology* 80 (2): 501-5. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90423-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90423-6).
- Kikuchi, Toshio, Naoki Oka, Akimasa Koga, Hiroshi Miyazaki, Haruya Ohmura, et Tsutomu Imaizumi. 2005. « Behavior of Caveolae and Caveolin-3 during the Development of Myocyte Hypertrophy ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 45 (3): 204-10. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000152029.53997.57>.

## REFERENCES

- Kim, C. A., Marc Delépine, Emilie Boutet, Haquima El Mourabit, Soazig Le Lay, Muriel Meier, Mona Nemani, et al. 2008. « Association of a Homozygous Nonsense Caveolin-1 Mutation with Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93 (4): 1129-34. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1328>.
- Kirkham, M., S. J. Nixon, M. T. Howes, L. Abi-Rached, D. E. Wakeham, M. Hanzal-Bayer, C. Ferguson, et al. 2008. « Evolutionary Analysis and Molecular Dissection of Caveola Biogenesis ». *Journal of Cell Science* 121 (12): 2075-86. <https://doi.org/10.1242/jcs.024588>.
- Kirkham, Matthew, et Robert G. Parton. 2005. « Clathrin-Independent Endocytosis: New Insights into Caveolae and Non-Caveolar Lipid Raft Carriers ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1745 (3): 273-86. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.06.002>.
- Klinge, Lars, John Harris, Caroline Sewry, Richard Charlton, Louise Anderson, Steve Laval, Yen-Hui Chiu, et al. 2010. « Dysferlin Associates with the Developing T-Tubule System in Rodent and Human Skeletal Muscle ». *Muscle & Nerve* 41 (2): 166-73. <https://doi.org/10.1002/mus.21166>.
- Klinge, Lars, Steve Laval, Sharon Keers, Faye Haldane, Volker Straub, Rita Barresi, et Kate Bushby. 2007. « From T-Tubule to Sarcolemma: Damage-Induced Dysferlin Translocation in Early Myogenesis ». *The FASEB Journal* 21 (8): 1768-76. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7659com>.
- Koga, Akimasa, Naoki Oka, Toshio Kikuchi, Hiroshi Miyazaki, Seiya Kato, et Tsutomu Imaizumi. 2003. « Adenovirus-Mediated Overexpression of Caveolin-3 Inhibits Rat Cardiomyocyte Hypertrophy ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 42 (2): 213-19. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000082926.08268.5D>.
- Komazaki, S., M. Nishi, K. Kangawa, et H. Takeshima. 1999. « Immunolocalization of Mitsugumin29 in Developing Skeletal Muscle and Effects of the Protein Expressed in Amphibian Embryonic Cells ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 215 (2): 87-95. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199906\)215:2<87::AID-DVDY1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199906)215:2<87::AID-DVDY1>3.0.CO;2-Y).
- Komazaki, Shinji, Koichi Ito, Hiroshi Takeshima, et Hiroaki Nakamura. 2002. « Deficiency of Triad Formation in Developing Skeletal Muscle Cells Lacking Junctophilin Type 1 ». *FEBS Letters* 524 (1-3): 225-29. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03042-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03042-9).
- Kovtun, Oleksiy, Vikas A. Tillu, Nicholas Ariotti, Robert G. Parton, et Brett M. Collins. 2015. « Cavin family proteins and the assembly of caveolae ». *Journal of Cell Science* 128 (7): 1269-78. <https://doi.org/10.1242/jcs.167866>.
- Kovtun, Oleksiy, Vikas A. Tillu, WooRam Jung, Natalya Leneva, Nicholas Ariotti, Natasha Chaudhary, Ramya A. Mandyam, et al. 2014. « Structural Insights into the Organization of the Cavin Membrane Coat Complex ». *Developmental Cell* 31 (4): 405-19. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.002>.
- Kubisch, Christian, Benedikt G. H. Schoser, Monika von Düring, Regina C. Betz, Hans-Hilmar Goebel, Susanne Zahn, Antje Ehrbrecht, et al. 2003. « Homozygous Mutations in Caveolin-3 Cause a Severe Form of Rippling Muscle Disease ». *Annals of Neurology* 53 (4): 512-20. <https://doi.org/10.1002/ana.10501>.
- Kuhlencordt, Peter J., Robert Gyurko, Fred Han, Marielle Scherrer-Crosbie, Thomas H. Aretz, Roger Hajjar, Michael H. Picard, et Paul L. Huang. 2001. « Accelerated Atherosclerosis, Aortic Aneurysm Formation, and Ischemic Heart Disease in Apolipoprotein E/Endothelial Nitric Oxide Synthase Double-Knockout Mice ». *Circulation* 104 (4): 448-54. <https://doi.org/10.1161/hc2901.091399>.
- Kwon, Hayeong, Jaewoong Lee, Kyuho Jeong, Donghwan Jang, et Yunbae Pak. 2015. « Fatty Acylated Caveolin-2 Is a Substrate of Insulin Receptor Tyrosine Kinase for Insulin Receptor Substrate-1-Directed Signaling Activation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (5): 1022-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.002>.

## - L -

- Lacroix-Triki, Magali, Felipe Correa Geyer, et Jorge Sergio Reis-Filho. 2010. « Caveolin-1 P132L Mutation in Human Cancers: 1 CAVeat to Be Voiced ». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 12 (5): 562-65. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.100093>.
- Lanner, Johanna T., Dimitra K. Georgiou, Aditya D. Joshi, et Susan L. Hamilton. 2010. « Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>.
- Laporte, J., L. J. Hu, C. Kretz, J. L. Mandel, P. Kioschis, J. F. Coy, S. M. Klauck, A. Poustka, et N. Dahl. 1996. « A Gene Mutated in X-Linked Myotubular Myopathy Defines a New Putative Tyrosine Phosphatase Family Conserved in Yeast ». *Nature Genetics* 13 (2): 175-82. <https://doi.org/10.1038/ng0696-175>.
- Laporte, Jocelyn, Florence Bedez, Alessandra Bolino, et Jean-Louis Mandel. 2003. « Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases ». *Human Molecular Genetics* 12 (suppl\_2): R285-92. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg273>.
- Lee, E. 2002. « Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle ». *Science* 297 (5584): 1193-96. <https://doi.org/10.1126/science.1071362>.
- Lee, Eunkyung, Melissa Marcucci, Laurie Daniell, Marc Pypaert, Ora A. Weisz, Gian-Carlo Ochoa, Khashayar Farsad, Markus R. Wenk, et Pietro De Camilli. 2002. « Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle ». *Science* 297 (5584): 1193-96. <https://doi.org/10.1126/science.1071362>.
- Legay, Claire, et Lin Mei. 2017. « Moving Forward with the Neuromuscular Junction ». *Journal of Neurochemistry* 142 Suppl 2 (août): 59-63. <https://doi.org/10.1111/jnc.14028>.
- Li, Lei, Wen-Cheng Xiong, et Lin Mei. 2017. « Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders ». *Annual Review of Physiology*, décembre. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>.
- Liu, Libin, Dennis Brown, Mary McKee, Nathan K. LeBrasseur, Dan Yang, Kenneth H. Albrecht, Katya Ravid, et Paul F. Pilch. 2008. « Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia and glucose intolerance ». *Cell metabolism* 8 (4): 310-17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.008>.
- Liu, Libin, Carsten G. Hansen, Brian J. Honeyman, Benjamin J. Nichols, et Paul F. Pilch. 2014. « Cavin-3 Knockout Mice Show that Cavin-3 Is Not Essential for Caveolae Formation, for Maintenance of Body Composition, or for Glucose Tolerance ». *PLoS ONE* 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102935>.
- Lo, Harriet P., Ye-Wheen Lim, Zherui Xiong, Nick Martel, Charles Ferguson, Nicholas R. Ariotti, Jean Giacomotto, et al. 2021. « Muscle-Specific Cavin4 Interacts with Bin1 to Promote T-Tubule Formation and Stability in Developing Skeletal Muscle ». *BioRxiv*, janvier, 2021.01.13.426456. <https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426456>.
- Lo, Harriet P., Susan J. Nixon, Thomas E. Hall, Belinda S. Cowling, Charles Ferguson, Garry P. Morgan, Nicole L. Schieber, et al. 2015. « The Caveolin-Cavin System Plays a Conserved and Critical Role in Mechanoprotection of Skeletal Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 210 (5): 833-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501046>.
- Lorenzoni, Paulo J., Rosana H. Scola, Natassia Vieira, Mariz Vainzof, Ana L. M. Carsten, et Lineu C. Werneck. 2007. « A Novel Missense Mutation in the Caveolin-3 Gene in Rippling Muscle Disease ». *Muscle & Nerve* 36 (2): 258-60. <https://doi.org/10.1002/mus.20781>.

## - M -

- Marty, I. 2004. « Triadin: A Multi-Protein Family for Which Purpose? » *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 61 (15): 1850-53. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4196-7>.
- Maruyama, Koscak. 1997. « Connectin/Titin, Giant Elastic Protein of Muscle ». *The FASEB Journal* 11 (5): 341-45. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.5.9141500>.
- Matsuda, C., Y. K. Hayashi, M. Ogawa, M. Aoki, K. Murayama, I. Nishino, I. Nonaka, K. Arahata, et R. H. Brown. 2001. « The Sarcolemmal Proteins Dysferlin and Caveolin-3 Interact in Skeletal Muscle ». *Human Molecular Genetics* 10 (17): 1761-66. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.17.1761>.
- Mauro, Alexander. 1961. « SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9 (2): 493-95. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>.
- McComas, Alan J. 1978. « Neuromuscular Function and Disorders, by Alan J. McComas, 364 Pp, Illustrated, Butterworth, London and Washington, 1977 ». *Annals of Neurology* 4 (6): 586-586. <https://doi.org/10.1002/ana.410040636>.
- McMahon, Kerrie-Ann, Yeping Wu, Yann Gambin, Emma Sierecki, Vikas A. Tillu, Thomas Hall, Nick Martel, et al. 2019. « Identification of Intracellular Cavin Target Proteins Reveals Cavin-PP1alpha Interactions Regulate Apoptosis ». *Nature Communications* 10 (1): 3279. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11111-1>.
- McMahon, Kerrie-Ann, Hubert Zajicek, Wei-Ping Li, Michael J Peyton, John D Minna, V James Hernandez, Katherine Luby-Phelps, et Richard G W Anderson. 2009. « SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function ». *The EMBO Journal* 28 (8): 1001-15. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.46>.
- McNally, E. M., E. de Sá Moreira, D. J. Duggan, C. G. Bönnemann, M. P. Lisanti, H. G. Lidov, M. Vainzof, et al. 1998. « Caveolin-3 in Muscular Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 7 (5): 871-77. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.5.871>.
- Mei, Yingwu, Le Xu, Henning F. Kramer, Ginger H. Tomberlin, Claire Townsend, et Gerhard Meissner. 2013. « Stabilization of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Ion Channel-FKBP12 Complex by the 1,4-Benzothiazepine Derivative S107 ». *PLOS ONE* 8 (1): e54208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054208>.
- Meissner, Gerhard. 2017. « The structural basis of ryanodine receptor ion channel function ». *The Journal of General Physiology* 149 (12): 1065-89. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711878>.
- Merlini, L., I. Carbone, C. Capanni, P. Sabatelli, S. Tortorelli, F. Sotgia, M. P. Lisanti, C. Bruno, et C. Minetti. 2002. « Familial Isolated HyperCKaemia Associated with a New Mutation in the Caveolin-3 (CAV-3) Gene ». *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 73 (1): 65-67. <https://doi.org/10.1136/jnnp.73.1.65>.
- Metzger, Thomas, Vincent Gache, Mu Xu, Bruno Cadot, Eric S. Folker, Brian E. Richardson, Edgar R. Gomes, et Mary K. Baylies. 2012. « MAP and Kinesin-Dependent Nuclear Positioning Is Required for Skeletal Muscle Function ». *Nature* 484 (7392): 120-24. <https://doi.org/10.1038/nature10914>.
- Miike, T., I. Nonaka, Y. Ohtani, H. Tamari, et T. Ishitsu. 1984. « Behavior of Sarcotubular System Formation in Experimentally Induced Regeneration of Muscle Fibers ». *Journal of the Neurological Sciences* 65 (2): 193-200. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(84\)90083-2](https://doi.org/10.1016/0022-510x(84)90083-2).
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, P. Teng-Umnuay, M. G. Stenberg, B. J. Byrne, C. A. Thornton, et M. S. Swanson. 2000. « Recruitment of Human Muscleblind Proteins to (CUG)(n) Expansions Associated with Myotonic Dystrophy ». *The EMBO Journal* 19 (17): 4439-48. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4439>.

## REFERENCES

- Minetti, C., F. Sotgia, C. Bruno, P. Scartezzini, P. Broda, M. Bado, E. Masetti, et al. 1998. « Mutations in the Caveolin-3 Gene Cause Autosomal Dominant Limb-Girdle Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 18 (4): 365-68. <https://doi.org/10.1038/ng0498-365>.
- Minetti, Carlo, Massimo Bado, Paolo Broda, Federica Sotgia, Claudio Bruno, Ferruccio Galbiati, Daniela Volonte, et al. 2002. « Impairment of Caveolae Formation and T-System Disorganization in Human Muscular Dystrophy with Caveolin-3 Deficiency ». *The American Journal of Pathology* 160 (1): 265-70.
- Misgeld, Thomas, Terrance T. Kummer, Jeff W. Lichtman, et Joshua R. Sanes. 2005. « Agrin Promotes Synaptic Differentiation by Counteracting an Inhibitory Effect of Neurotransmitter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31): 11088-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504806102>.
- Mohun, Tim. 1992. « Muscle Differentiation ». *Current Opinion in Cell Biology* 4 (6): 923-28. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90119-W](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90119-W).
- Monier, S, R G Parton, F Vogel, J Behlke, A Henske, et T V Kurzchalia. 1995. « VIP21-Caveolin, a Membrane Protein Constituent of the Caveolar Coat, Oligomerizes in Vivo and in Vitro. ». *Molecular Biology of the Cell* 6 (7): 911-27. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.7.911>.
- Monier, Solange, Dennis J. Dietzen, W.Randall Hastings, Douglas M. Lublin, et Teymuraz V. Kurzchalia. 1996. « Oligomerization of VIP21-Caveolin in Vitro Is Stabilized by Long Chain Fatty Acylation or Cholesterol ». *FEBS Letters* 388 (2-3): 143-49. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00519-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00519-4).
- Mora, Rosalia, Vera L. Bonilha, Alan Marmorstein, Philipp E. Scherer, Dennis Brown, Michael P. Lisanti, et Enrique Rodriguez-Boulan. 1999. « Caveolin-2 Localizes to the Golgi Complex but Redistributes to Plasma Membrane, Caveolae, and Rafts When Co-Expressed with Caveolin-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (36): 25708-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25708>.
- Morén, Björn, Claudio Shah, Mark T. Howes, Nicole L. Schieber, Harvey T. McMahon, Robert G. Parton, Oliver Daumke, et Richard Lundmark. 2012. « EHD2 Regulates Caveolar Dynamics via ATP-Driven Targeting and Oligomerization ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (7): 1316-29. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0787>.
- Müller, Juliane S., Henriett Piko, Benedikt G. H. Schoser, Beate Schlotter-Weigel, Peter Reilich, Stefanie Gürster, Christine Born, et al. 2006. « Novel Splice Site Mutation in the Caveolin-3 Gene Leading to Autosomal Recessive Limb Girdle Muscular Dystrophy ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 16 (7): 432-36. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.04.006>.
- Murata, M., J. Peränen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia, et K. Simons. 1995. « VIP21/Caveolin Is a Cholesterol-Binding Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (22): 10339-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10339>.

## - N -

- Nassar, Zeyad D., et Marie-Odile Parat. 2015. « Cavin Family: New Players in the Biology of Caveolae ». *International Review of Cell and Molecular Biology* 320: 235-305. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.009>.
- Ngo, Shyuan T., Peter G. Noakes, et William D. Phillips. 2007. « Neural Agrin: A Synaptic Stabiliser ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (5): 863-67. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.10.012>.
- Nicot, Anne-Sophie, Anne Toussaint, Valérie Tosch, Christine Kretz, Carina Wallgren-Pettersson, Erik Iwarsson, Helen Kingston, et al. 2007. « Mutations in Amphiphysin 2 (BIN1) Disrupt Interaction with Dynamin 2 and Cause Autosomal Recessive Centronuclear Myopathy ». *Nature Genetics* 39 (9): 1134-39. <https://doi.org/10.1038/ng2086>.

## REFERENCES

Nishi, M., S. Komazaki, N. Kurebayashi, Y. Ogawa, T. Noda, M. Iino, et H. Takeshima. 1999. « Abnormal Features in Skeletal Muscle from Mice Lacking Mitsugumin29 ». *The Journal of Cell Biology* 147 (7): 1473-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.7.1473>.

Norkin, Leonard C., Howard A. Anderson, Scott A. Wolfson, et Ariella Oppenheim. 2002. « Caveolar Endocytosis of Simian Virus 40 Is Followed by Brefeldin A-Sensitive Transport to the Endoplasmic Reticulum, Where the Virus Disassembles ». *Journal of Virology* 76 (10): 5156-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.10.5156-5166.2002>.

### - O -

Ogata, Takehiro, Daisuke Naito, Naohiko Nakanishi, Yukiko K. Hayashi, Takuya Taniguchi, Kotaro Miyagawa, Tetsuro Hamaoka, et al. 2014. « MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by  $\alpha$ 1-adrenergic receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (10): 3811-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315359111>.

Ogata, Takehiro, Tomomi Ueyama, Koji Isodono, Masashi Tagawa, Naofumi Takehara, Tsuneaki Kawashima, Koichiro Harada, et al. 2008. « MURC, a Muscle-Restricted Coiled-Coil Protein That Modulates the Rho/ROCK Pathway, Induces Cardiac Dysfunction and Conduction Disturbance ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (10): 3424-36. <https://doi.org/10.1128/MCB.02186-07>.

Ohsawa, Yutaka, Haruhiro Toko, Masashi Katsura, Kazue Morimoto, Haruki Yamada, Yaeko Ichikawa, Tatsufumi Murakami, Seitaro Ohkuma, Issei Komuro, et Yoshihide Sunada. 2004. « Overexpression of P104L Mutant Caveolin-3 in Mice Develops Hypertrophic Cardiomyopathy with Enhanced Contractility in Association with Increased Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity ». *Human Molecular Genetics* 13 (2): 151-57. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh014>.

Ortengren, Unn, Margareta Karlsson, Natascha Blazic, Maria Blomqvist, Fredrik H. Nystrom, Johanna Gustavsson, Pam Fredman, et Peter Stralfors. 2004. « Lipids and Glycosphingolipids in Caveolae and Surrounding Plasma Membrane of Primary Rat Adipocytes ». *European Journal of Biochemistry* 271 (10): 2028-36. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04117.x>.

Oshikawa, Jin, Koji Otsu, Yoshiyuki Toya, Takashi Tsunematsu, Raleigh Hankins, Jun-ichi Kawabe, Susumu Minamisawa, Satoshi Umemura, Yasuko Hagiwara, et Yoshihiro Ishikawa. 2004. « Insulin Resistance in Skeletal Muscles of Caveolin-3-Null Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (34): 12670-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402053101>.

### - P -

Palade, G. E., et R. R. Bruns. 1968. « STRUCTURAL MODULATIONS OF PLASMALEMMAL VESICLES ». *Journal of Cell Biology* 37 (3): 633-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.37.3.633>.

Palade, Gorge E. 1953. « Fine structure of blood capillaries ». *Journal of Applied Physics* 24: 1424.

Paolini, Cecilia, Feliciano Protasi, et Clara Franzini-Armstrong. 2004. « The Relative Position of RyR Feet and DHPR Tetrads in Skeletal Muscle ». *Journal of Molecular Biology* 342 (1): 145-53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.035>.

Parton, Robert G. 2018. « Caveolae: Structure, Function, and Relationship to Disease ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (octobre): 111-36. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062737>.

Parton, Robert G., Kerrie-Ann McMahon, et Yeping Wu. 2020. « Caveolae: Formation, Dynamics, and Function ». *Current Opinion in Cell Biology, Membrane Trafficking*, 65 (août): 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.001>.

## REFERENCES

- Parton, Robert G., et Miguel A. del Pozo. 2013. « Caveolae as Plasma Membrane Sensors, Protectors and Organizers ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (2): 98-112. <https://doi.org/10.1038/nrm3512>.
- Parton, Robert G., et Kai Simons. 2007. « The Multiple Faces of Caveolae ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (3): 185-94. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>.
- Parton, Robert G., Michael Way, Natasha Zorzi, et Espen Stang. 1997. « Caveolin-3 Associates with Developing T-tubules during Muscle Differentiation ». *The Journal of Cell Biology* 136 (1): 137-54.
- Paula, F. de, M. Vainzof, A. L. Bernardino, E. McNally, L. M. Kunkel, et M. Zatz. 2001. « Mutations in the Caveolin-3 Gene: When Are They Pathogenic? ». *American Journal of Medical Genetics* 99 (4): 303-7. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(2001\)9999:9999<::aid-ajmg1168>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1096-8628(2001)9999:9999<::aid-ajmg1168>3.0.co;2-o).
- Pearce, J. M. 2000. « Gowers' Sign ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 68 (2): 149. <https://doi.org/10.1136/jnnp.68.2.149>.
- Pediconi, M. F., P. Donoso, C. Hidalgo, et F. J. Barrantes. 1987. « Lipid Composition of Purified Transverse Tubule Membranes Isolated from Amphibian Skeletal Muscle ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 921 (2): 398-404. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(87\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(87)90042-7).
- Pelkmans, Lucas, Thomas Bürli, Marino Zerial, et Ari Helenius. 2004. « Caveolin-Stabilized Membrane Domains as Multifunctional Transport and Sorting Devices in Endocytic Membrane Traffic ». *Cell* 118 (6): 767-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.003>.
- Pelkmans, Lucas, Jürgen Kartenbeck, et Ari Helenius. 2001. « Caveolar Endocytosis of Simian Virus 40 Reveals a New Two-Step Vesicular-Transport Pathway to the ER ». *Nature Cell Biology* 3 (5): 473-83. <https://doi.org/10.1038/35074539>.
- Pelkmans, Lucas, Daniel Püntener, et Ari Helenius. 2002. « Local Actin Polymerization and Dynamin Recruitment in SV40-Induced Internalization of Caveolae ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5567): 535-39. <https://doi.org/10.1126/science.1069784>.
- Pelkmans, Lucas, et Marino Zerial. 2005. « Kinase-Regulated Quantal Assemblies and Kiss-and-Run Recycling of Caveolae ». *Nature* 436 (7047): 128-33. <https://doi.org/10.1038/nature03866>.
- Peterson, B. Z., C. D. DeMaria, J. P. Adelman, et D. T. Yue. 1999. « Calmodulin Is the Ca<sup>2+</sup> Sensor for Ca<sup>2+</sup> -Dependent Inactivation of L-Type Calcium Channels ». *Neuron* 22 (3): 549-58. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80709-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80709-6).
- Pinilla, Socorro María Rodríguez, Emiliano Honrado, David Hardisson, Javier Benítez, et José Palacios. 2006. « Caveolin-1 Expression Is Associated with a Basal-like Phenotype in Sporadic and Hereditary Breast Cancer ». *Breast Cancer Research and Treatment* 99 (1): 85-90. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9184-1>.
- Plomann, M., R. Lange, G. Vopper, H. Cremer, U. A. Heinlein, S. Scheff, S. A. Baldwin, et al. 1998. « PACSIN, a Brain Protein That Is Upregulated upon Differentiation into Neuronal Cells ». *European Journal of Biochemistry* 256 (1): 201-11. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2560201.x>.
- Posey, Avery D., Kaitlin E. Swanson, Manuel G. Alvarez, Swathi Krishnan, Judy E. Earley, Hamid Band, Peter Pytel, Elizabeth M. McNally, et Alexis R. Demonbreun. 2014. « EHD1 mediates vesicle trafficking required for normal muscle growth and tubule development ». *Developmental biology* 387 (2): 179-90. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.004>.
- Protasi, Feliciano, Clara Franzini-Armstrong, et Paul D. Allen. 1998. « Role of Ryanodine Receptors in the Assembly of Calcium Release Units in Skeletal Muscle ». *The Journal of Cell Biology* 140 (4): 831-42.

## - R -

- Razani, B., J. A. Engelman, X. B. Wang, W. Schubert, X. L. Zhang, C. B. Marks, F. Macaluso, et al. 2001. « Caveolin-1 Null Mice Are Viable but Show Evidence of Hyperproliferative and Vascular Abnormalities ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 38121-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105408200>.
- Razani, Babak, Terry P. Combs, Xiao Bo Wang, Philippe G. Frank, David S. Park, Robert G. Russell, Maomi Li, et al. 2002. « Caveolin-1-Deficient Mice Are Lean, Resistant to Diet-Induced Obesity, and Show Hypertriglyceridemia with Adipocyte Abnormalities ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (10): 8635-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110970200>.
- Razani, Babak, Xiao Bo Wang, Jeffery A. Engelman, Michela Battista, Guy Lagaud, Xiao Lan Zhang, Burkhard Kneitz, et al. 2002. « Caveolin-2-Deficient Mice Show Evidence of Severe Pulmonary Dysfunction without Disruption of Caveolae ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (7): 2329-44. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.7.2329-2344.2002>.
- Razani, Babak, Scott E. Woodman, et Michael P. Lisanti. 2002. « Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology ». *Pharmacological Reviews* 54 (3): 431-67. <https://doi.org/10.1124/pr.54.3.431>.
- Razzaq, A., I. M. Robinson, H. T. McMahon, J. N. Skepper, Y. Su, A. C. Zelhof, A. P. Jackson, N. J. Gay, et C. J. O'Kane. 2001. « Amphiphysin Is Necessary for Organization of the Excitation-Contraction Coupling Machinery of Muscles, but Not for Synaptic Vesicle Endocytosis in Drosophila ». *Genes & Development* 15 (22): 2967-79. <https://doi.org/10.1101/gad.207801>.
- Razzaq, Azam, Iain M. Robinson, Harvey T. McMahon, Jeremy N. Skepper, Ya Su, Andrew C. Zelhof, Antony P. Jackson, Nicholas J. Gay, et Cahir J. O'Kane. 2001. « Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in Drosophila ». *Genes & Development* 15 (22): 2967-79. <https://doi.org/10.1101/gad.207801>.
- Redfern, P. A. 1970. « Neuromuscular Transmission in New-Born Rats ». *The Journal of Physiology* 209 (3): 701-9. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009187>.
- Reijneveld, Jaap C., Ieke B. Ginjaar, Wendy S. Frankhuizen, et Nicolette C. Notermans. 2006. « CAV3 Gene Mutation Analysis in Patients with Idiopathic Hyper-CK-Emia ». *Muscle & Nerve* 34 (5): 656-58. <https://doi.org/10.1002/mus.20593>.
- Relaix, Frédéric, Didier Rocancourt, Ahmed Mansouri, et Margaret Buckingham. 2005. « A Pax3/Pax7-Dependent Population of Skeletal Muscle Progenitor Cells ». *Nature* 435 (7044): 948-53. <https://doi.org/10.1038/nature03594>.
- Ríos, Eduardo, Dirk Gillespie, et Clara Franzini-Armstrong. 2019. « The Binding Interactions That Maintain Excitation-Contraction Coupling Junctions in Skeletal Muscle ». *The Journal of General Physiology* 151 (4): 593-605. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812268>.
- Ritter, B., J. Modregger, M. Paulsson, et M. Plomann. 1999. « PACSIN 2, a Novel Member of the PACSIN Family of Cytoplasmic Adapter Proteins ». *FEBS Letters* 454 (3): 356-62. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00830-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00830-3).
- Robelin, J. 1990. « Différenciation, croissance et développement cellulaire du tissu musculaire ». *INRA Productions Animales* 3 (4): 253-63.
- Rodriguez, Gabriela, Tomomi Ueyama, Takehiro Ogata, Grazyna Czernuszewicz, Yanli Tan, Gerald W. Dorn, Roberta Bogaev, et al. 2011. « Molecular Genetic and Functional Characterization Implicate Muscle-Restricted Coiled-Coil Gene (MURC) as a Causal Gene for Familial Dilated Cardiomyopathy ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 4 (4): 349-58. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.959866>.

## REFERENCES

Roman, William, et Edgar R. Gomes. 2018. « Nuclear Positioning in Skeletal Muscle ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, SI: Nuclear positioning, 82 (octobre): 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.005>.

Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, et R. G. Anderson. 1992. « Caveolin, a Protein Component of Caveolae Membrane Coats ». *Cell* 68 (4): 673-82.

## - S -

Sanger, Joseph W., Jushuo Wang, Yingli Fan, Jennifer White, Lei Mi-Mi, Dipak K. Dube, Jean M. Sanger, et David Pruyne. 2017. « Assembly and Maintenance of Myofibrils in Striated Muscle ». In *The Actin Cytoskeleton*, édité par Brigitte M. Jockusch, 39-75. Handbook of Experimental Pharmacology. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_53](https://doi.org/10.1007/164_2016_53).

Sargiacomo, M., P. E. Scherer, Z. Tang, E. Kubler, K. S. Song, M. C. Sanders, et M. P. Lisanti. 1995. « Oligomeric Structure of Caveolin: Implications for Caveolae Membrane Organization. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (20): 9407-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9407>.

Sargiacomo, M, M Sudol, Z Tang, et Mp Lisanti. 1993. « Signal Transducing Molecules and Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked Proteins Form a Caveolin-Rich Insoluble Complex in MDCK Cells ». *Journal of Cell Biology* 122 (4): 789-807. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.4.789>.

Schaletzky, Julia, Stephen K. Dove, Benjamin Short, Oscar Lorenzo, Michael J. Clague, et Francis A. Barr. 2003. « Phosphatidylinositol-5-Phosphate Activation and Conserved Substrate Specificity of the Myotubularin Phosphatidylinositol 3-Phosphatases ». *Current Biology: CB* 13 (6): 504-9. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00132-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00132-5).

Scheiffele, P., P. Verkade, A. M. Fra, H. Virta, K. Simons, et E. Ikonen. 1998. « Caveolin-1 and -2 in the Exocytic Pathway of MDCK Cells ». *The Journal of Cell Biology* 140 (4): 795-806. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.4.795>.

Scherer, P. E., R. Y. Lewis, D. Volonte, J. A. Engelman, F. Galbiati, J. Couet, D. S. Kohtz, E. van Donselaar, P. Peters, et M. P. Lisanti. 1997. « Cell-Type and Tissue-Specific Expression of Caveolin-2. Caveolins 1 and 2 Co-Localize and Form a Stable Hetero-Oligomeric Complex in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (46): 29337-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.29337>.

Scherer, P. E., et M. P. Lisanti. 1997. « Association of Phosphofructokinase-M with Caveolin-3 in Differentiated Skeletal Myotubes. Dynamic Regulation by Extracellular Glucose and Intracellular Metabolites ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (33): 20698-705. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20698>.

Scherer, P. E., T. Okamoto, M. Chun, I. Nishimoto, H. F. Lodish, et M. P. Lisanti. 1996. « Identification, Sequence, and Expression of Caveolin-2 Defines a Caveolin Gene Family ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1): 131-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.131>.

Schiaffino, S., M. Cantini, et S. Sartore. 1977. « T-System Formation in Cultured Rat Skeletal Tissue ». *Tissue and Cell* 9 (3): 437-46. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(77\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0040-8166(77)90004-0).

Schiaffino, S., et C. Reggiani. 1994. « Myosin Isoforms in Mammalian Skeletal Muscle ». *Journal of Applied Physiology*, août. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493>.

Schrauwen, Isabelle, Szabolcs Szelinger, Ashley L. Siniard, Ahmet Kurdoglu, Jason J. Corneveaux, Ivana Malenica, Ryan Richholt, et al. 2015. « A Frame-Shift Mutation in CAV1 Is Associated with a Severe Neonatal Progeroid and Lipodystrophy Syndrome ». *PloS One* 10 (7): e0131797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131797>.

## REFERENCES

- Schubert, William, Federica Sotgia, Alex W. Cohen, Franco Capozza, Gloria Bonuccelli, Claudio Bruno, Carlo Minetti, Eduardo Bonilla, Salvatore DiMauro, et Michael P. Lisanti. 2007. « Caveolin-1(-/-) and Caveolin-2(-/-)-Deficient Mice Both Display Numerous Skeletal Muscle Abnormalities, with Tubular Aggregate Formation ». *The American Journal of Pathology* 170 (1): 316-33. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060687>.
- Seemann, Eric, Minxuan Sun, Sarah Krueger, Jessica Tröger, Wenya Hou, Natja Haag, Susann Schüler, et al. 2017. « Deciphering Caveolar Functions by Syndapin III KO-Mediated Impairment of Caveolar Invagination ». *ELife* 6 (décembre). <https://doi.org/10.7554/eLife.29854>.
- Senju, Yosuke, Yuzuru Itoh, Kazunori Takano, Sayaka Hamada, et Shiro Suetsugu. 2011. « Essential Role of PACSIN2/Syndapin-II in Caveolae Membrane Sculpting ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 12): 2032-40. <https://doi.org/10.1242/jcs.086264>.
- Sens, Pierre, et Matthew S. Turner. 2006. « Budded Membrane Microdomains as Tension Regulators ». *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 73 (3 Pt 1): 031918. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.73.031918>.
- Shah, Claudio, Balachandra G. Hegde, Björn Morén, Elmar Behrmann, Thorsten Mielke, Gregor Moenke, Christian M. T. Spahn, Richard Lundmark, Oliver Daumke, et Ralf Langen. 2014. « Structural Insights into Membrane Interaction and Caveolar Targeting of Dynamin-like EHD2 ». *Structure (London, England: 1993)* 22 (3): 409-20. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.12.015>.
- Silvestri, Nicholas J., et Gil I. Wolfe. 2019. « HyperCKemia, Evaluation for elevated creatine kinase is required skill for neurologists ». *Practical Neurology*, n° July/August 2019. <https://practicalneurology.com/articles/2019-aug-july/hyperckemia/pdf>.
- Sine, Steven M. 2012. « End-Plate Acetylcholine Receptor: Structure, Mechanism, Pharmacology, and Disease ». *Physiological Reviews* 92 (3): 1189-1234. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2011>.
- Sinha, Bidisha, Darius Köster, Richard Ruez, Pauline Gonnord, Michele Bastiani, Daniel Abankwa, Radu V. Stan, et al. 2011. « Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae ». *Cell* 144 (3): 402-13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>.
- Slater, Clarke R. 2017. « The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102183>.
- Smith, J. S., R. Coronado, et G. Meissner. 1985. « Sarcoplasmic Reticulum Contains Adenine Nucleotide-Activated Calcium Channels ». *Nature* 316 (6027): 446-49. <https://doi.org/10.1038/316446a0>.
- Smythe, Gayle M., Joshua C. Eby, Marie-Helene Disatnik, et Thomas A. Rando. 2003. « A Caveolin-3 Mutant That Causes Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 1C Disrupts Src Localization and Activity and Induces Apoptosis in Skeletal Myotubes ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 23): 4739-49. <https://doi.org/10.1242/jcs.00806>.
- Smythe, Gayle M., et Thomas A. Rando. 2006. « Altered Caveolin-3 Expression Disrupts PI(3) Kinase Signaling Leading to Death of Cultured Muscle Cells ». *Experimental Cell Research* 312 (15): 2816-25. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.05.010>.
- Sochacki, Kem A., Gleb Shtengel, Schuyler B. van Engelenburg, Harald F. Hess, et Justin W. Taraska. 2014. « Correlative super-resolution fluorescence and metal replica transmission electron microscopy ». *Nature methods* 11 (3): 305-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2816>.
- Song, K. S., P. E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D. S. Kohtz, et M. P. Lisanti. 1996. « Expression of Caveolin-3 in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Cells. Caveolin-3 Is a Component of the Sarcolemma and Co-Fractionates with Dystrophin and Dystrophin-Associated

## REFERENCES

- Glycoproteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (25): 15160-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.15160>.
- Sotgia, F., J. K. Lee, K. Das, M. Bedford, T. C. Petrucci, P. Macioce, M. Sargiacomo, et al. 2000. « Caveolin-3 Directly Interacts with the C-Terminal Tail of Beta -Dystroglycan. Identification of a Central WW-like Domain within Caveolin Family Members ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 38048-58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005321200>.
- Stammers, Andrew N., Shanel E. Susser, Naomi C. Hamm, Michael W. Hlynsky, Dustin E. Kimber, D. Scott Kehler, et Todd A. Duhamel. 2015. « The Regulation of Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Calcium-ATPases (SERCA) ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 93 (10): 843-54. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0463>.
- Starr, Daniel A., et Heidi N. Fridolfsson. 2010. « Interactions between Nuclei and the Cytoskeleton Are Mediated by SUN-KASH Nuclear-Envelope Bridges ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26: 421-44. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104037>.
- Sugie, Kazuma, Kumiko Murayama, Satoru Noguchi, Nobuyuki Murakami, Mika Mochizuki, Yukiko K. Hayashi, Ikuya Nonaka, et Ichizo Nishino. 2004. « Two Novel CAV3 Gene Mutations in Japanese Families ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 14 (12): 810-14. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.08.008>.
- Sunada, Y., H. Ohi, A. Hase, H. Ohi, T. Hosono, S. Arata, S. Higuchi, K. Matsumura, et T. Shimizu. 2001. « Transgenic Mice Expressing Mutant Caveolin-3 Show Severe Myopathy Associated with Increased NNOS Activity ». *Human Molecular Genetics* 10 (3): 173-78. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.3.173>.

## - T -

- Tagawa, Akiko, Anna Mezzacasa, Arnold Hayer, Andrea Longatti, Lucas Pelkmans, et Ari Helenius. 2005. « Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell ». *The Journal of Cell Biology* 170 (5): 769-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506103>.
- Tagawa, Masashi, Tomomi Ueyama, Takehiro Ogata, Naofumi Takehara, Norio Nakajima, Koji Isodono, Satoshi Asada, Tomosaburo Takahashi, Hiroaki Matsubara, et Hidemasa Oh. 2008. « MURC, a Muscle-Restricted Coiled-Coil Protein, Is Involved in the Regulation of Skeletal Myogenesis ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 295 (2): C490-498. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00188.2008>.
- Tajbakhsh, S. 2009. « Skeletal Muscle Stem Cells in Developmental versus Regenerative Myogenesis ». *Journal of Internal Medicine* 266 (4): 372-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02158.x>.
- Takei, K., V. I. Slepnev, V. Haucke, et P. De Camilli. 1999. « Functional Partnership between Amphiphysin and Dynamin in Clathrin-Mediated Endocytosis ». *Nature Cell Biology* 1 (1): 33-39. <https://doi.org/10.1038/9004>.
- Takekura, H., B. E. Flucher, et C. Franzini-Armstrong. 2001. « Sequential Docking, Molecular Differentiation, and Positioning of T-Tubule/SR Junctions in Developing Mouse Skeletal Muscle ». *Developmental Biology* 239 (2): 204-14. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0437>.
- Takeshima, H., M. Iino, H. Takekura, M. Nishi, J. Kuno, O. Minowa, H. Takano, et T. Noda. 1994. « Excitation-Contraction Uncoupling and Muscular Degeneration in Mice Lacking Functional Skeletal Muscle Ryanodine-Receptor Gene ». *Nature* 369 (6481): 556-59. <https://doi.org/10.1038/369556a0>.
- Takeshima, H., S. Komazaki, M. Nishi, M. Iino, et K. Kangawa. 2000. « Junctophilins: A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins ». *Molecular Cell* 6 (1): 11-22. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00003-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00003-4).

## REFERENCES

- Tanaka, Shota, Yasushi Fujio, et Hiroyuki Nakayama. 2018. « Caveolae-Specific CaMKII Signaling in the Regulation of Voltage-Dependent Calcium Channel and Cardiac Hypertrophy ». *Frontiers in Physiology* 9 (août). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01081>.
- Tang, Z., P. E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D. S. Kohtz, I. Nishimoto, H. F. Lodish, et M. P. Lisanti. 1996. « Molecular Cloning of Caveolin-3, a Novel Member of the Caveolin Gene Family Expressed Predominantly in Muscle ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (4): 2255-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.4.2255>.
- Thompson, Wesley. 1983. « Synapse Elimination in Neonatal Rat Muscle Is Sensitive to Pattern of Muscle Use ». *Nature* 302 (5909): 614-16. <https://doi.org/10.1038/302614a0>.
- Tidball, James G. 2011. « Mechanisms of Muscle Injury, Repair, and Regeneration ». *Comprehensive Physiology* 1 (4): 2029-62. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100092>.
- Tillu, Vikas A., Oleksiy Kovtun, Kerrie-Ann McMahon, Brett M. Collins, et Robert G. Parton. 2015. « A phosphoinositide-binding cluster in cavin1 acts as a molecular sensor for cavin1 degradation ». *Molecular Biology of the Cell* 26 (20): 3561-69. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-06-0359>.
- Tillu, Vikas A, Ye-Wheen Lim, Oleksiy Kovtun, Sergey Mureev, Charles Ferguson, Michele Bastiani, Kerrie-Ann McMahon, et al. 2018. « A Variable Undecad Repeat Domain in Cavin1 Regulates Caveola Formation and Stability ». *EMBO Reports* 19 (9). <https://doi.org/10.15252/embr.201845775>.
- Tonegawa, Kota, Wataru Otsuka, Shohei Kumagai, Sachi Matsunami, Nao Hayamizu, Shota Tanaka, Kazumasa Moriwaki, et al. 2017. « Caveolae-Specific Activation Loop between CaMKII and L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Aggravates Cardiac Hypertrophy in A1-Adrenergic Stimulation ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 312 (3): H501-14. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00601.2016>.
- Torrino, Stéphanie, Wei-Wei Shen, Cédric M. Blouin, Satish Kailasam Mani, Christine Viaris de Lesegno, Pierre Bost, Alexandre Grassart, et al. 2018. « EHD2 Is a Mechanotransducer Connecting Caveolae Dynamics with Gene Transcription ». *The Journal of Cell Biology*, octobre. <https://doi.org/10.1083/jcb.201801122>.
- Toussaint, Anne, Belinda Simone Cowling, Karim Hnia, Michel Mohr, Anders Oldfors, Yannick Schwab, Uluc Yis, et al. 2011. « Defects in Amphiphysin 2 (BIN1) and Triads in Several Forms of Centronuclear Myopathies ». *Acta Neuropathologica* 121 (2): 253-66. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0754-2>.
- Traverso, Monica, Elisabetta Gazzero, Stefania Assereto, Federica Sotgia, Roberta Biancheri, Silvia Stringara, Laura Giberti, et al. 2008. « Caveolin-3 T78M and T78K Missense Mutations Lead to Different Phenotypes in Vivo and in Vitro ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 88 (3): 275-83. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700713>.
- Trochet, Delphine, Bernard Prudhon, Maud Beuvin, Cécile Peccate, Stéphanie Lorain, Laura Julien, Sofia Benkhelifa-Ziyyat, et al. 2018. « Allele-Specific Silencing Therapy for Dynamin 2-Related Dominant Centronuclear Myopathy ». *EMBO Molecular Medicine* 10 (2): 239-53. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707988>.
- Tsujita, Kazuya, Toshiki Itoh, Takeshi Ijuin, Akitsugu Yamamoto, Assia Shisheva, Jocelyn Laporte, et Tadaomi Takenawa. 2004. « Myotubularin Regulates the Function of the Late Endosome through the Gram Domain-Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (14): 13817-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312294200>.

- U -

Ueyama, H., H. Horinouchi, K. Obayashi, M. Hashinaga, T. Okazaki, et T. Kumamoto. 2007. « Novel Homozygous Mutation of the Caveolin-3 Gene in Rippling Muscle Disease with Extraocular Muscle Paresis ». *Neuromuscular Disorders: NMD* 17 (7): 558-61. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.03.009>.

## REFERENCES

Ursu, D, S Sebillé, B Dietze, D Freise, V Flockerzi, et W Melzer. 2001. « Excitation–contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit  $\gamma 1$  ». *The Journal of Physiology* 533 (Pt 2): 367-77. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0367a.x>.

### - V -

Van den Bergh, P. Y. K., J. M. Gérard, J. A. Elosegi, M. U. Manto, C. Kubisch, et B. G. H. Schoser. 2004. « Novel Missense Mutation in the Caveolin-3 Gene in a Belgian Family with Rippling Muscle Disease ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 75 (9): 1349-51. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.028217>.

Van der Kloot, W, et J Molgó. 1994. « Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. » *Physiological Reviews* 74 (4): 899-991. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.4.899>.

Vassilopoulos, Stéphane. 2020. « Unconventional Roles for Membrane Traffic Proteins in Response to Muscle Membrane Stress ». *Current Opinion in Cell Biology* 65 (août): 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.007>.

Vassilopoulos, Stéphane, Dominique Thevenon, Sophia Smida Rezgui, Julie Brocard, Agnès Chapel, Alain Lacampagne, Joël Lunardi, Michel Dewaard, et Isabelle Marty. 2005. « Triadins Are Not Triad-Specific Proteins: Two New Skeletal Muscle Triadins Possibly Involved in the Architecture of Sarcoplasmic Reticulum ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28601-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501484200>.

Veratti, E. 1902. « Ricerche sulla fine struttura della fibra muscolare striata ». In *Memorie del R. Istituto lombardo di scienze e lettere, Classe di scienze matematiche e naturali*, Libraio del R. Istituto lombardo di scienze e lettere, 19:87-133. 3.

Villa, A., P. Podini, M. C. Panzeri, H. D. Söling, P. Volpe, et J. Meldolesi. 1993. « The Endoplasmic-Sarcoplasmic Reticulum of Smooth Muscle: Immunocytochemistry of Vas Deferens Fibers Reveals Specialized Subcompartments Differently Equipped for the Control of  $Ca^{2+}$  Homeostasis ». *The Journal of Cell Biology* 121 (5): 1041-51. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.5.1041>.

Volonte, Daniela, Youhua Liu, et Ferruccio Galbiati. 2005. « The Modulation of Caveolin-1 Expression Controls Satellite Cell Activation during Muscle Repair ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2): 237-39. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2215fje>.

Volonte, Daniela, Charles F. McTiernan, Marek Drab, Michael Kasper, et Ferruccio Galbiati. 2008. « Caveolin-1 and Caveolin-3 Form Heterooligomeric Complexes in Atrial Cardiac Myocytes That Are Required for Doxorubicin-Induced Apoptosis ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294 (1): H392-401. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01039.2007>.

Vorgerd, M., K. Ricker, F. Ziemssen, W. Kress, H. H. Goebel, W. A. Nix, C. Kubisch, B. G. Schoser, et W. Mortier. 2001. « A Sporadic Case of Rippling Muscle Disease Caused by a de Novo Caveolin-3 Mutation ». *Neurology* 57 (12): 2273-77. <https://doi.org/10.1212/wnl.57.12.2273>.

### - W -

Walser, Piers J., Nicholas Ariotti, Mark Howes, Charles Ferguson, Richard Webb, Dominik Schwudke, Natalya Leneva, et al. 2012. « Constitutive Formation of Caveolae in a Bacterium ». *Cell* 150 (4): 752-63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.042>.

Wanaski, Stephen P., Benjamin K. Ng, et Michael Glaser. 2003. « Caveolin Scaffolding Region and the Membrane Binding Region of SRC Form Lateral Membrane Domains ». *Biochemistry* 42 (1): 42-56. <https://doi.org/10.1021/bi012097n>.

## REFERENCES

- Wang, Ming-Chuan, Giles Velarde, Robert C. Ford, Nicholas S. Berrow, Annette C. Dolphin, et Ashraf Kitmitto. 2002. « 3D Structure of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor ». *Journal of Molecular Biology* 323 (1): 85-98. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00890-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00890-2).
- Way, M., et R. G. Parton. 1995. « M-Caveolin, a Muscle-Specific Caveolin-Related Protein ». *FEBS Letters* 376 (1-2): 108-12.
- Westermann, M., Heiko Leutbecher, et Helmut W. Meyer. 1999. « Membrane structure of caveolae and isolated caveolin-rich vesicles ». *Histochemistry and Cell Biology* 111 (1): 71-81. <https://doi.org/10.1007/s004180050335>.
- White, Jennifer, Marietta V. Barro, Helen P. Makarenkova, Joseph W. Sanger, et Jean M. Sanger. 2014. « Localization of Sarcomeric Proteins during Myofibril Assembly in Cultured Mouse Primary Skeletal Myotubes ». *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 297 (9): 1571-84. <https://doi.org/10.1002/ar.22981>.
- Whiteley, Gareth, Richard F. Collins, et Ashraf Kitmitto. 2012. « Characterization of the Molecular Architecture of Human Caveolin-3 and Interaction with the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (48): 40302-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377085>.
- Williams, Terence M, et Michael P Lisanti. 2004. « The caveolin proteins ». *Genome Biology* 5 (3): 214.
- Wilson, Jacob M., Jeremy P. Loenneke, Edward Jo, Gabriel J. Wilson, Michael C. Zourdos, et Jeong-Su Kim. 2012. « The Effects of Endurance, Strength, and Power Training on Muscle Fiber Type Shifting ». *Journal of Strength and Conditioning Research* 26 (6): 1724-29. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318234eb6f>.
- Woodman, S. E., F. Sotgia, F. Galbiati, C. Minetti, et M. P. Lisanti. 2004. « Caveolinopathies: Mutations in Caveolin-3 Cause Four Distinct Autosomal Dominant Muscle Diseases ». *Neurology* 62 (4): 538-43.
- Woodman, Scott E., Anthony W. Ashton, William Schubert, Hyangkyu Lee, Terence M. Williams, Freddy A. Medina, Jeffrey B. Wyckoff, Terry P. Combs, et Michael P. Lisanti. 2003. « Caveolin-1 Knockout Mice Show an Impaired Angiogenic Response to Exogenous Stimuli ». *The American Journal of Pathology* 162 (6): 2059-68. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64337-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64337-4).
- Woodman, Scott E., David S. Park, Alex W. Cohen, Michelle W.-C. Cheung, Madhulika Chandra, Jamshid Shirani, Baiyu Tang, et al. 2002. « Caveolin-3 Knock-out Mice Develop a Progressive Cardiomyopathy and Show Hyperactivation of the P42/44 MAPK Cascade ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (41): 38988-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205511200>.

## - Y -

- Yamada, E. 1955. « The Fine Structure of the Gall Bladder Epithelium of the Mouse ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1 (5): 445-58. <https://doi.org/10.1083/jcb.1.5.445>.
- Yamaguchi, Naohiro, Le Xu, Daniel A. Pasek, Kelly E. Evans, et Gerhard Meissner. 2003. « Molecular Basis of Calmodulin Binding to Cardiac Muscle Ca(2+) Release Channel (Ryanodine Receptor) ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23480-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301125200>.
- Yamamoto, M., Y. Toya, C. Schwencke, M. P. Lisanti, M. G. Myers, et Y. Ishikawa. 1998. « Caveolin Is an Activator of Insulin Receptor Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26962-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26962>.
- Yang, D., Z. Pan, H. Takeshima, C. Wu, R. Y. Nagaraj, J. Ma, et H. Cheng. 2001. « RyR3 Amplifies RyR1-Mediated Ca(2+)-Induced Ca(2+) Release in Neonatal Mammalian Skeletal Muscle ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (43): 40210-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106944200>.

## REFERENCES

Yang, G., L. D. Truong, T. L. Timme, C. Ren, T. M. Wheeler, S. H. Park, Y. Nasu, et al. 1998. « Elevated Expression of Caveolin Is Associated with Prostate and Breast Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 4 (8): 1873-80.

Yao, Qing, Jing Chen, Hong Cao, James D. Orth, J. Michael McCaffery, Radu-Virgil Stan, et Mark A. McNiven. 2005. « Caveolin-1 Interacts Directly with Dynamain-2 ». *Journal of Molecular Biology* 348 (2): 491-501. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.003>.

Yeow, Ivana, Gillian Howard, Jessica Chadwick, Carolina Mendoza-Topaz, Carsten G. Hansen, Benjamin J. Nichols, et Elena Shvets. 2017. « EHD Proteins Cooperate to Generate Caveolar Clusters and to Maintain Caveolae during Repeated Mechanical Stress ». *Current Biology: CB* 27 (19): 2951-2962.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.047>.

Yuan, S. H., W. Arnold, et A. O. Jorgensen. 1991. « Biogenesis of Transverse Tubules and Triads: Immunolocalization of the 1,4-Dihydropyridine Receptor, TS28, and the Ryanodine Receptor in Rabbit Skeletal Muscle Developing in Situ ». *The Journal of Cell Biology* 112 (2): 289-301. <https://doi.org/10.1083/jcb.112.2.289>.

## - Z -

Zalk, Ran, Oliver B. Clarke, Amédée des Georges, Robert A. Grassucci, Steven Reiken, Filippo Mancina, Wayne A. Hendrickson, Joachim Frank, et Andrew R. Marks. 2015. « Structure of a Mammalian Ryanodine Receptor ». *Nature* 517 (7532): 44-49. <https://doi.org/10.1038/nature13950>.

Zalk, Ran, Stephan E. Lehnart, et Andrew R. Marks. 2007. « Modulation of the Ryanodine Receptor and Intracellular Calcium ». *Annual Review of Biochemistry* 76 (1): 367-85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.053105.094237>.

Zhang, L., J. Kelley, G. Schmeisser, Y. M. Kobayashi, et L. R. Jones. 1997. « Complex Formation between Junctin, Triadin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor. Proteins of the Cardiac Junctional Sarcoplasmic Reticulum Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (37): 23389-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23389>.

---

# ANNEXES

---



**Annexe 1 : Tampons de microscopie électronique**

<b>Mammalian Ringers ("extracellular" buffer)</b>	
155 mM NaCl	9.1 g/L
3 mM KCl	0.23 g/L
3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.36 g/L
5 mM HEPES	1.2 g/L
10 mM Glucose	1.8 g/L
2 mM CaCl <sub>2</sub>	2 mL of 1M stock
1 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mL of 1M stock
pH to 7.0-7.2 with NaOH	

<b>Ca<sup>2+</sup> free Ringers</b>	
155 mM NaCl	9.1 g/L
3 mM KCl	0.23 g/L
3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.36 g/L
5 mM HEPES	1.2 g/L
10 mM Glucose	1.8 g/L
3 mM EGTA	1.14 g/L
5 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mL of 1M stock
pH to 7.0-7.2 using NaOH	

<b>KHMgE ("intracellular" buffer)</b>	
70 mM KCl	5.2 g/L
30 mM HEPES	7.1 g/L
3 mM EGTA	1.14 g/L
5 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mL of 1M stock
pH to 7.0-7.2 using KOH	

**Annexe 2 : Liste des siARN utilisés**

<b>siARN humains</b>	
Cibles	Séquences
<i>siCav-3 (1)</i>	5'-CAGAUCUCGAGGCCCGAGAUCG-3'
<i>siCav-3 (2)</i>	5'-AAGCACAAUGGCCCUUCGCUC-3'
<i>siMURC</i>	5'-GGCUAAGGCAGUCAGGAG-3'
<i>siBin1 (1)</i>	5'-GUGCUGGUCGGCCUGGAG-3'
<i>siBin1 (2)</i>	5'-CCUGCUGUCGUGGUGGAG-3'
<b>siARN murins</b>	
Cibles	Séquences
<i>siCav-3</i>	5'-GGUCCUCUCAAUCCAC-3'
<i>siBin1</i>	5'-CGUGUAGGUUUCUAUGUCAAC-3'
<i>siMURC</i>	5'-GGCUGAGGCAGUCAGGAG-3'

**Annexe 3 : Liste des séquences des primers utilisés**

<b><i>PRIMERS MURINS</i></b>		
<b>CIBLE</b>	Forward	Reverse
<b>CAV-3</b>	ACTTGGTGAACCGCGACCCC	ACTTGGTGAACCGCGACCCC
<b>RPLP0</b>	CTCCAAGCAGATGCAGCAGA	ATAGCCTTGCGCATCATGGT
<b>HPRT1</b>	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT	AAACGTGATTCAAATCCCTGAAGTA



**Titre :** *Rôle des cavéoles dans la formation des tubules-T et dans la physiopathologie des cavéolinopathies*

**Mots clés :** Muscle squelettique – Cavéoles – Tubule-T – Microscopie Électronique – Microscopie Corrélatrice

**Résumé :** Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique particulièrement abondantes dans le muscle squelettique. Il a été proposé que la cavéoline 3 (Cav-3), principal composant des cavéoles musculaires, serait impliquée dans le processus de formation des tubules transverses (tubules-T). Les tubules-T sont des structures musculaires qui permettent de propager le potentiel d'action en profondeur dans la fibre musculaire. Pourtant à ce jour le mécanisme par lequel Cav-3 et les cavéoles participent à la formation de ces structures demeure inconnu. L'importance des cavéoles et de l'isoforme musculaire de la cavéoline est accentuée par la présence de défauts dans l'organisation et la fonction des cavéoles dans de nombreuses myopathies. En particulier les cavéolinopathies, une famille de maladies neuromusculaires autosomiques dominantes sont dues à des mutations dans le gène CAV-3. Cependant, les mécanismes physiopathologie de ces maladies sont à ce jour inconnus. L'objectif de mon projet était de comprendre le rôle des cavéoles dans la formation précoce des tubules-T. En mettant au point une technique de microscopie corrélatrice entre de la

fluorescence à super résolution et de la microscopie électronique sur répliques de métal j'ai pu examiner en détails les composants moléculaires des cavéoles et des tubules-T dans des myotubes humains et des myotubes murins extensivement différenciés. J'ai ainsi montré l'organisation des cavéoles en une nouvelle structure en anneaux. De plus, mes résultats montrent que les cavéoles s'organisent circulairement au sarcolemme sur des plateformes de Bin1 et cette structure semble optimiser la tubulation de la membrane afin d'initier la formation des tubules-T. Enfin, j'ai montré que dans le cas de défauts d'expression de Cav-3 ou dans les myotubes de patients cavéolinopathes une désorganisation des anneaux de cavéoles ainsi que des défauts de tubulation des membranes par Bin1. Mes travaux laissent à penser que les anneaux de cavéoles constituent le site d'initiation de l'élongation des tubules-T et apportent les bases d'une caractérisation précise de la biogénèse des tubules-T dans le muscle squelettique et dans la physiopathologie des cavéolinopathies.

**Title :** *Role of caveolae in T-tubules formation and in caveolinopathies' pathophysiology*

**Keywords :** Skeletal muscle – Caveolae – T-tubule – Electron Microscopy – Correlative Microscopy

**Abstract :** Caveolae are flask-shaped invaginations of the plasma membrane, particularly abundant in skeletal muscle. Caveolin 3, the main component of muscle caveolae, is thought to be involved in the formation of transversal tubules (T-tubules), the muscle structures that allow propagation of the action potential in the muscle fiber's depth. It has been suggested that caveolae fuse together and form a substrate for proteins, such as Bin1, capable of tubulating membrane lipids however the mechanisms at play remain obscure. The importance of caveolae and caveolins in skeletal muscle is underscored by the presence of defects in the function and organisation of caveolae in many myopathies. In particular in caveolinopathies, a family of autosomal dominant neuromuscular diseases due to mutations in the CAV-3 gene. However, the pathophysiological mechanisms of these diseases are still unclear. The objective of my project was to understand the role of caveolae in the early formation of T-tubules.

By developing a correlative microscopy technique combining super-resolution fluorescence and electron microscopy on metal replicas, I was able to examine in detail the molecular components of caveolae and T-tubules in human and murine myotubes. I showed that caveolae are organised in a new ring-like structure that we termed "caveolae daisies". I next showed that caveolae daisies organize themselves on Bin1 platforms at the sarcolemma and this structure seems to optimize membrane tubulation to initiate T-tubule formation. Lastly, I showed caveolae daisy defects, a disorganisation of caveolae rings as well as defects in Bin1-mediated membrane tubulation in both Cav-3 depleted myotubes using siRNA against Cav-3 or human caveolinopathy patient myotubes. My work suggests that caveolae daisies are the site of initiation of T-tubule elongation and provides the basis for a precise characterisation of T-tubule biogenesis in healthy skeletal muscle and in the pathophysiology of caveolinopathies.