



HAL
open science

CACNA2D4, une sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendant, associée à la survenue de l'hyperthermie d'effort

Alioune Fall

► **To cite this version:**

Alioune Fall. CACNA2D4, une sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendant, associée à la survenue de l'hyperthermie d'effort. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2024. Français. NNT : 2024GRALV020 . tel-04748415

HAL Id: tel-04748415

<https://theses.hal.science/tel-04748415v1>

Submitted on 22 Oct 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant Spécialité :

Biologie cellulaire

Unité de recherche : Grenoble Institut des Neurosciences

CACNA2D4, une sous unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants, associée à la survenue de l'hyperthermie d'effort.

CACNA2D4, a regulatory subunit of voltage-gated calcium channels, involved in exertional heat stroke

Présentée par :

Alioune FALL

Direction de thèse :

Julien FAURE
Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Rapporteurs :

Guy LENAERS
DIRECTEUR DE RECHERCHES, CNRS Bretagne et Pays de la Loire
Sylvie DUCREUX
MAITRESSE DE CONFERENCES, Université Claude Bernard Lyon 1

Thèse soutenue publiquement le **10 juillet 2024**, devant le jury composé de :

Julien FAURE,
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes
Hervé DUBOCHAUD,
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes
Guy LENAERS,
DIRECTEUR DE RECHERCHES, CNRS Bretagne et Pays de la Loire
Sylvie DUCREUX,
MAITRESSE DE CONFERENCES, Université Claude Bernard Lyon 1
Bruno ALLARD,
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Claude Bernard Lyon 1

Directeur de thèse

Président

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Invités :

Nathalie ROUX-BUISSON
DOCTEURE EN SCIENCES, Université Grenoble Alpes



Préambule

J'ai réalisé ce travail de thèse sous la co-direction de Julien FAURE et Nathalie ROUX-BUISSON. L'ensemble du travail a été réalisé au sein de l'équipe Inserm U1216-4 Equipe 4 C-MyPath dirigée par Isabelle MARTY qui a développé une expertise dans l'étude du complexe de libération du calcium en situations normales et pathologiques (myopathies congénitales structurales), afin de mettre en évidence des thérapies permettant sa restauration fonctionnelle.

Ce travail a donné lieu aux communications scientifiques suivantes :

Communications orales :

Journée de la Société Française de Myologie (JSFM), Toulouse 2022

MyoNeurAlpes, Saint-Etienne, 2023

Communications affichées :

Gordon conference, Muscle EC-coupling, USA, 2023

Ottawa Neuro Muscular Disease Conference, Ottawa, CANADA, 2023

Biophysical Society, Philadelphia, USA, 2024

Articles en préparation :

A. Fall, J. de la Rosa, J. Brocard, C. Charpentier, B. Allard, I. Marty, N. Roux-Buisson, A. Lee, J. Fauré. *CACNA2D4*, a regulatory subunit of calcium voltage-gated channels, involved in exertional heat stroke (en rédaction)

M. Fourgeaud, A. FALL, E. Malfatti, M. Cossée, D. Renard, J. Brocard, A.S. Nicot, M. Larrieux, B. Allard, C. Thèze, K. Mamchaoui, I. Marty, J. Fauré, J. Rendu. RNA-seq analysis reveals a novel *CACNA1S* splice variant: a case report with functional findings (en rédaction)

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres de mon jury de thèse : le Dr. Sylvie DUCREUX et le Dr. Guy LENAERS d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, les Professeurs Hervé DUBOUCHAUD et Bruno ALLARD d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer ce travail.

Je remercie mes encadrants, le Professeur Julien FAURE et le Dr. Nathalie ROUX-BUISSON de m'avoir fait confiance, et de m'avoir confié ce projet et permis de mener à bien mon travail. Je tiens aussi à remercier le Dr. Isabelle MARTY de m'avoir accueilli au sein de son équipe, la meilleure du GIN. Je remercie aussi tous mes collègues de l'équipe 4 pour ce cadre de travail sain et propice à l'épanouissement scientifique. Je remercie tout particulièrement Clara Charpentier qui a participé à ce travail durant son Master 2 et qui prend le relais de ce projet si intéressant ainsi que Julie BROCARD qui a participé à ma formation.

Je remercie toutes les personnes qui ont collaboré avec nous dans le cadre de ce projet, les membres de l'équipe de l'Université du Texas, le Dr. Juan de la Rosa Vasquez et le Dr. Amy Lee.

Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse : Béatrice BLOT, Mireille ALBRIEUX et Bruno ALLARD pour leurs précieux conseils.

Ce travail, je le dédie à ma mère, Khady MBOW, qui m'a inculqué cette envie d'aller toujours plus loin et m'a toujours soutenu et motivé à suivre mes rêves. À mon père, Cheikh FALL, qui est mon modèle dans la vie et m'inspire tellement.

Faisant partie d'une fratrie de 8 âmes, je ne vous nommerai pas tous, mais chacun d'entre vous a été là à sa façon. Mais je tiens à remercier mon grand frère Alassane FALL et sa femme qui m'ont aidé dans les moments difficiles. Mon petit frère Mamadou FALL et sa femme pour les bons petits plats du week-end et pour m'avoir m'accueilli quand j'avais besoin de décompresser.

Voici, ce chapitre se ferme pour un autre tout aussi palpitant. Cela a été une aventure humaine très riche en enseignements et très épanouissante.

Pourquoi le gène *CACNA2D4* n'est-il jamais stressé ?

Parce qu'il sait toujours garder son calcium sous contrôle !

Liste des abréviations

CACNA2D4 - Canal calcique voltage-dépendant de type alpha-2/delta sous-unité 4

4CmC - 4-chloro-m-crésol

ASPH - Aspartate Beta-Hydroxylase

CACNA1S - Sous-unité alpha-1S du canal calcique voltage-dépendant de type L

CACHE – Chemosensory like domain

C-terminal - Carboxy-terminal

CICR – Calcium Induce Calcium Release

CRC – Calcium Release Complex

DHPR - Dihydropyridine Receptor

ECC – Excitation Contraction Coupling

EOM - Extra-Ocular Muscles

HA – Human influenza hemagglutinin

HE - Hyperthermie d'Effort

HnRNP - Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein

FOX1/2 - Forkhead Box Proteins 1/2

FL - Full Length

GAA - Acide Alpha-Glucosidase

GPI – GlycosylPhosphatidylinositol

GK – Guanylate Kinase

HM - Hyperthermie Maligne

KO - Knock-Out

KI – Knock-In

MIDAS – Metal Ion dependant Adhesion site

N-terminal - Amino-terminal

PCR - Polymerase Chain Reaction

PolII - Polymerase II

RACE - Rapid Amplification of cDNA Ends

RNA-seq - RNA sequencing

ROS - Espèces réactives de l'Oxygène

RTqPCR - Quantitative Reverse Transcription PCR

RYR1 - Récepteur de la Ryanodine 1

STAC3 - SH3 and cysteine-rich domain-containing protein

VICR – Voltage Induced Calcium Release

vWA – Von Willebrand factor A

Résumé

L'hyperthermie d'effort (HE) est une maladie potentiellement mortelle définie par une hyperthermie sévère, avec une température corporelle supérieure à 40°C, associée à un dysfonctionnement neurologique soudain, observée chez des individus sains exposés à un exercice physique intensif. L'HE partage de nombreuses similitudes cliniques et biologiques avec l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM), une maladie pharmacogénétique déclenchée par des agents halogénés volatils principalement associée à des mutations du gène *RYRI*, et plus rarement des gènes *CACNAIS* et *STAC3*. Plusieurs données sont en faveur de l'existence d'une base génétique prédisposant à l'HE, mais à ce jour les preuves d'une cause génétique restent incertaines. Les mutations de *RYRI* ont été associées à l'HE avec une prévalence beaucoup plus faible que dans l'HM, ce qui suggère l'implication d'autres gènes. Nous rapportons ici l'étude génétique d'une cohorte de soldats ayant présenté un épisode d'HE chez lesquels les mutations de *RYRI* avaient été précédemment exclues. L'analyse du séquençage de l'exome entier a conduit à l'identification de variants du gène *CACNA2D4* chez quatre patients non apparentés. *CACNA2D4* code l'isoforme $\alpha 2\delta$ -4 de la classe $\alpha 2\delta$ de la sous-unité régulatrice des canaux voltage-dépendants de la famille Cav. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'implication de *CACNA2D4* dans l'apparition d'une hyperthermie d'effort avec une caractérisation fonctionnelle *in vitro* et *in vivo*. Nous montrons ici qu'un nouveau transcrit *CACNA2D4* est exprimé dans le muscle squelettique de la souris. Des études *in vitro* démontrent que les quatre variants génétiques de *CACNA2D4* trouvés chez les patients ayant vécu une crise d'HE modifient la fonctionnalité de la protéine, altérant notamment sa localisation membranaire. Le variant p.(Ser299Arg) localisé dans le domaine MIDAS de $\alpha 2\delta$ -4 a un impact sur l'interaction directe de la protéine avec la sous-unité Cav1.1 du DHPR dans un système reconstitué, ainsi que sur ses propriétés de canal. Le modèle murin avec un knock-in pour le variant p.(Ser299Arg) (KI-S306R) est viable et fertile. Soumis à un protocole d'exercice intense, les animaux KI-S306R présentent une augmentation significative des taux sanguins de CPK, reflétant une rhabdomyolyse accrue, par rapport à leurs compagnons de portée sauvage (WT). De plus, les souris femelles KI-S306R présentent une élévation significative de la température corporelle centrale par rapport aux WT, reproduisant une crise de type HE. Nous avons également observé une altération de l'homéostasie calcique musculaire dans les myotubes de souris KI-S306R. Dans l'ensemble, ce travail a permis d'une part de mettre en évidence l'existence d'un transcrit musculaire du gène *CACNA2D4*, nouvellement caractérisé, et d'autre part de montrer l'association entre des variants du gène *CACNA2D4* et la survenue d'une crise d'hyperthermie d'effort.

Abstract

Exertional Heat Stroke (EHS) is a life-threatening disease defined by a severe hyperthermia, with a body temperature above 40°C, associated with a sudden neurological dysfunction, observed in healthy individuals exposed to intensive physical exercise. EHS shares many clinical and biological similarities with Malignant Hyperthermia (MH), a pharmaco-genetic disease triggered by volatile halogenated agents mostly associated with mutations in the *RYR1* gene, and more rarely in the *CACNA1S* and *STAC3* genes. Several evidence support the existence of inherited genetic mutations that predispose some patients to EHS, but to date, the genetic basis of EHS remains poorly documented. Mutations in *RYR1* have been associated with EHS with a much lower prevalence than in MH, which suggests the involvement of other genes. We report here the genetic study of a cohort of soldiers presenting with an EHS episode in whom mutations in *RYR1* were previously excluded. Whole Exome Sequencing analysis led to the identification of variants in the *CACNA2D4* gene in four unrelated patients. *CACNA2D4* encodes the $\alpha 2\delta$ -4 isoform of the $\alpha 2\delta$ class of regulatory subunit of voltage-gated channels of the Cav family. This work aimed to investigate the implication of *CACNA2D4* in the onset of exertional heat stroke with functional characterization going from *in vitro* to *in vivo* studies. We show here that a *CACNA2D4* transcript is expressed in mouse skeletal muscle. *In vitro* studies demonstrate that the four genetic variants of *CACNA2D4* found in EHS patients modify the functionality of the protein altering its membrane localization. The p.(Ser299Arg) variant localized in the MIDAS domain of $\alpha 2\delta$ -4 impacts the direct interaction of the protein with the $\alpha 1$ subunit of DHPR in a reconstituted system, as well as its channel properties. The mouse model with a knock-in for the p.(Ser299Arg) (KI-S306R) mutation is viable and fertile. When submitted to intense exercise protocol, a significant increase in blood CPK levels, reflecting enhanced rhabdomyolysis, was observed in KI-S306R animals compared to Wild Type littermates. In addition, female KI-S306R mice experienced EHS-like crisis associated with a significant elevation in core body temperature compared to Wild Type. We observed also an alteration in muscular calcium homeostasis in KI-S306 mice myotubes. Altogether, our data point to the *CACNA2D4* gene as probably involved in skeletal muscle function and as a major gene mutated in EHS.

Table des matières

Préambule	1
Remerciements	2
Liste des abréviations	4
Résumé	6
Abstract	7
Table des matières	9
Chapitre 1 : Introduction	16
I. Le muscle squelettique : structure et fonctions	17
II. Physiologie des relâchements calciques dans le muscle squelettique	19
A. L'homéostasie calcique dans le muscle	19
B. Couplage Excitation – Contraction	22
C. Les acteurs du CRC.....	24
1. Les récepteurs aux dihydropyridines	25
a) Les canaux calciques voltage-dépendants	25
b) Fonctions des Cav1.x.....	26
c) Structure des canaux calciques voltage-dépendants de type L.....	29
1) Sous-unité $\alpha 1$ ou Cav1.x.....	29
2) Sous-unité β	34
3) Les sous-unité γ	35
4) Les sous-unité $\alpha 2\delta$	35
➤ CACNA2D1	39
➤ CACNA2D2	40
➤ CACNA2D3	40
➤ CACNA2D4	41
2. Le récepteur de la ryanodine 1 (RyR1).....	53

a)	Structure	53
b)	Modulateurs	54
c)	Pathologies	59
d)	Les protéines modulatrices de RyR1	55
III.	Les pathologies du Complexe de Relâchement du Calcium.....	59
A.	Les myopathies.....	59
B.	Les pathologies déclenchées	64
1.	La thermorégulation.....	64
2.	Les pathologies en lien avec un défaut de la thermorégulation	70
3.	L'hyperthermie maligne peranesthésique	73
a)	Historique et définition.....	73
b)	Epidémiologie.....	74
c)	Signes cliniques et complications.....	74
d)	Prise en charge et prévention.....	75
e)	Diagnostic.....	75
f)	Physiopathologie	76
g)	Génétique.....	79
4.	L'hyperthermie d'effort	83
a)	Historique : De l'antiquité à aujourd'hui, à la quête d'une définition	83
b)	Définition.....	86
c)	Epidémiologie.....	87
d)	Signes cliniques et complications.....	90
e)	Evaluation et prise en charge.....	92
f)	Physiopathologie de l'hyperthermie d'effort	93

g) Génétique.....	102
IV. Contexte et objectifs de la thèse	106
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	110
I. Modèles murins	111
II. Culture cellulaire, transfection et transduction	111
A. HEK 293T	112
B. COS7	112
C. Cellules satellites murines.....	113
III. Biologie moléculaire	113
A. Etude de l'expression musculaire de <i>CACNA2D4</i>	113
1. RT (q)PCR	113
2. RACE-PCR	114
B. Obtention des plasmides <i>CACNA2D4</i> et mutagenèse.....	115
IV. Etudes biochimiques	118
A. Préparation des tissus	118
1. Homogénats de tissus murins.....	118
2. Fractionnement subcellulaire du muscle squelettique murin.....	118
B. Western blot	119
C. Biotinylation de surface	119
D. Co-Immuno-précipitation	120
V. Techniques d'imagerie.....	121
A. Immunofluorescence	121
1. Réexpression ectopique sur COS7 pour l'étude de la localisation de $\alpha\delta$ -4 wild-type et mutés	121
2. Etude de la colocalisation Cav1.1 – $\alpha\delta$ -4 sur myotubes de souris transduits	121

B. Imagerie calcique	122
VI. Caractérisation du modèle murin.....	124
A. Protocole de course	124
B. Protocole test de sensibilité à la chaleur	126
C. Protocole test de sensibilité à l'isoflurane (anesthésique halogéné)	126
D. Electrophysiologie (En collaboration)	127
VII. Statistique.....	128
VIII. Bio-informatique.....	128
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	131
Projet principal : CACNA2D4, dans la survenue de l'hyperthermie d'effort (HE).....	132
Partie 1 : Implication de CACNA2D4 dans l'Hyperthermie d'effort.....	132
I. Caractérisation fonctionnelle <i>in vitro</i> des mutations sur CACNA2D4	133
A. Etude d'expression protéique.....	134
B. Etude de localisation	135
C. Etude de l'impact des mutations sur l'interaction entre $\alpha 2\delta$ -4 et Cav1.1	140
D. Etude de l'impact fonctionnel sur le canal Cav1.1 du DHPR.....	142
1. Etude de l'adressage à la surface de Cav1.1	142
2. Etude en patch-clamp de l'impact de la mutation p.(Ser2299Arg) sur le canal DHPR	144
a) Sensibilité au voltage.....	144
b) Etude des mouvements de charges	146
c) Etude de la sensibilité au pH du DHPR	146
E. Discussion	147
II. Phénotype clinique et cellulaire du modèle murin Knock-In CACNA2D4^{WT/S306R}	

A.	Développement du modèle murin Knock-In <i>CACNA2D4</i> ^{WT/S306R}	155
B.	Mise en évidence d'un phénotype d'hyperthermie d'effort.....	158
1.	Tolérance à l'exercice	159
2.	Etude des modifications de la température rectale : survenue d'une hyperthermie 160	
3.	Etude du taux plasmatique de créatine phosphokinase (CPK)	162
C.	Sensibilité à l'isoflurane (anesthésique halogéné)	164
D.	Sensibilité à la chaleur	165
E.	Etude de l'impact du variant p.(Ser306Arg) du gène <i>CACNA2D4</i> au niveau musculaire squelettique	167
1.	Etude de l'expression de Stac3, Cav1.1 et RyR1 chez les souris <i>CACNA2D4</i> ^{WT/S306R}	167
2.	Etude des relâchements de calcium sur myotubes	168
3.	Electrophysiologie sur fibres isolées à pH physiologique	171
F.	Discussion	175
Partie 2 : Identification et caractérisation d'une isoforme musculaire <i>CACNA2D4</i> .		182
I.	Mise en évidence d'une isoforme musculaire <i>CACNA2D4</i>.....	183
A.	RT-(q)-PCR.....	184
B.	5'/3' RACE-PCR et clonage	185
II.	Caractérisation fonctionnelle de l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$-4 M	191
A.	Localisation subcellulaire.....	191
B.	Etude de l'interaction Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 M (<i>CACNA2D4</i> M).....	194
C.	Régulation de Cav1.1 par l'isoforme $\alpha 2\delta$ -4 M	196
III.	Etude de l'expression de la protéine $\alpha 2\delta$-4 dans le muscle squelettique.....	199
A.	Western blot	199

B. Spectrométrie de masse.....	205
IV. Discussion.....	208
Projets annexes : CACNIAS et STAC3 dans l'homéostasie calcique.....	214
Partie 1 : Caractérisation fonctionnelle d'un nouveau variant d'épissage sur CACNAIS	214
I. Contexte de l'étude.....	215
II. Résultats et discussion	216
A. Etude de l'adressage à la surface de Cav1.1 sur des cellules musculaires immortalisées de la patiente	216
B. Discussion	218
Partie 2 : Myopathie congénitale en lien avec des variants STAC3 chez un patient non- amérindien	220
I. Contexte de l'étude.....	221
II. Résultats et discussion	222
A. Etude de l'impact des mutations sur l'expression de la protéine <i>STAC3</i>	222
B. Etude de l'impact sur les relâchements de calcium	223
C. Discussion	225
Chapitre 4 : Conclusion et perspectives	228
Annexes	237
Références bibliographiques	247

Chapitre 1 : Introduction

Introduction

L'hyperthermie est une élévation de la température du corps au-dessus de sa valeur normale, soit 37 °C chez l'humain (Bendahan et al., 2001). Ainsi, elle peut être le symptôme d'une pathologie sous-jacente comme par exemple une fièvre suite à une infection virale ou bactérienne. Mais cela peut être aussi une pathologie à part entière. Ainsi, les pathologies hyperthermiques, abordées dans ce manuscrit, sont un groupe de maladies en lien avec un défaut de la thermorégulation dû à une dérégulation métabolique impliquant les voies métaboliques du calcium notamment dans le muscle squelettique.

I. Le muscle squelettique : structure et fonctions

C'est un organe aux fonctions diverses. Il permet le maintien de la posture avec un tonus musculaire constant, mais assure aussi la locomotion, le mouvement de la cage thoracique dans la respiration et est capable d'interagir avec son environnement grâce aux myokines (Argilés et al., 2016 ; Cadot and Gomes, 2023 ; Mukund and Subramaniam, 2020). Il joue également un rôle important dans la thermorégulation et le métabolisme (Periasamy et al., 2017 ; Wendt, 2007). Il est impliqué dans la pathogenèse des hyperthermies dites déclenchées, dont l'hyperthermie maligne per-anesthésique.

Le muscle squelettique est un tissu hautement organisé sur plusieurs niveaux, entouré par un tissu conjonctif appelé épimysium. L'unité cellulaire est la fibre musculaire ou myofibre qui est multinucléée avec des noyaux organisés en domaines hautement régulés. Elle peut faire 1 cm de longueur pour 100 µm de diamètre. Ces fibres musculaires sont regroupées en fascicules entourés par le péri-mysium et l'ensemble de ces fascicules forme le tissu musculaire (Frontera and Ochala, 2015).

Les myofibres contiennent plusieurs myofibrilles avec une unité fonctionnelle qui est le sarcomère (Mukund and Subramaniam, 2020) (**Figure 1**).

Le sarcomère se compose de filaments de myosine, épais, de filaments d'actine dits fins et d'autres composants structuraux. Le filament épais est composé de têtes et de queues de myosine, de protéine C liant la myosine (MyBP-C) et de titine jouant un rôle dans la structure et l'élasticité du sarcomère. Ces protéines interagissent entre elles et avec les filaments fins lors de la contraction musculaire. Sur les têtes de myosine, on a la présence de la myosine ATPase,

Introduction

une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP en ADP (adénosine diphosphate) et phosphate, fournissant l'énergie nécessaire pour le cycle de liaison et de déplacement des têtes de myosine le long des filaments d'actine. Cette réaction est essentielle pour la contraction musculaire (Sponga et al., 2021; Z. Wang et al., 2021).

Les filaments fins sont composés d'actine et sont réticulés par l' α -actinine, formant des doublets espacés de 6 nm. Ils sont composés principalement de la protéine actine. Chaque molécule d'actine est une sous-unité globulaire (G-actine) qui se polymérise pour former des filaments (F-actine). Ces filaments sont assemblés en une double hélice qui peut se lier à d'autres protéines pour former des structures plus complexes. La tropomyosine est une protéine filamentueuse qui s'enroule autour de la double hélice d'actine. Elle recouvre les sites de liaison de la myosine sur l'actine, empêchant ainsi l'interaction entre l'actine et la myosine en l'absence de calcium. La troponine est une protéine complexe composée de trois sous-unités : troponine T (TnT), troponine I (TnI), et troponine C (TnC). TnT se lie à la tropomyosine, TnI inhibe l'interaction entre l'actine et la myosine, et TnC se lie au calcium. Lorsque le calcium se lie à TnC, il induit un changement de conformation qui déplace la tropomyosine, exposant les sites de liaison de l'actine pour la myosine (Sponga et al., 2021; Z. Wang et al., 2021).

La structure du sarcomère est délimitée par la ligne Z également appelée la strie Z. Elle sert de site d'ancrage pour les filaments fins d'actine grâce à l' α -actinine et permet aussi de les maintenir aligner aux filaments de myosine. Différents rôles lui sont affiliés, le maintien de l'intégrité des sarcomères, la transmission des forces au sarcolemme ou encore la régulation de la longueur des filaments d'actine avec la protéine nébuline. De nombreuses protéines entrent dans sa composition dont la filamine C, la myopalladine, la myotiline et la téléthonine qui ancrent les filaments fins d'actine (**Figure 1**) (Sponga et al., 2021; Z. Wang et al., 2021).

La contraction fait suite à la libération d'ions calcium dans le cytosol de la cellule musculaire grâce à un processus appelé Couplage Excitation-Contraction (ECC) (Marty and Fauré, 2016).

Introduction

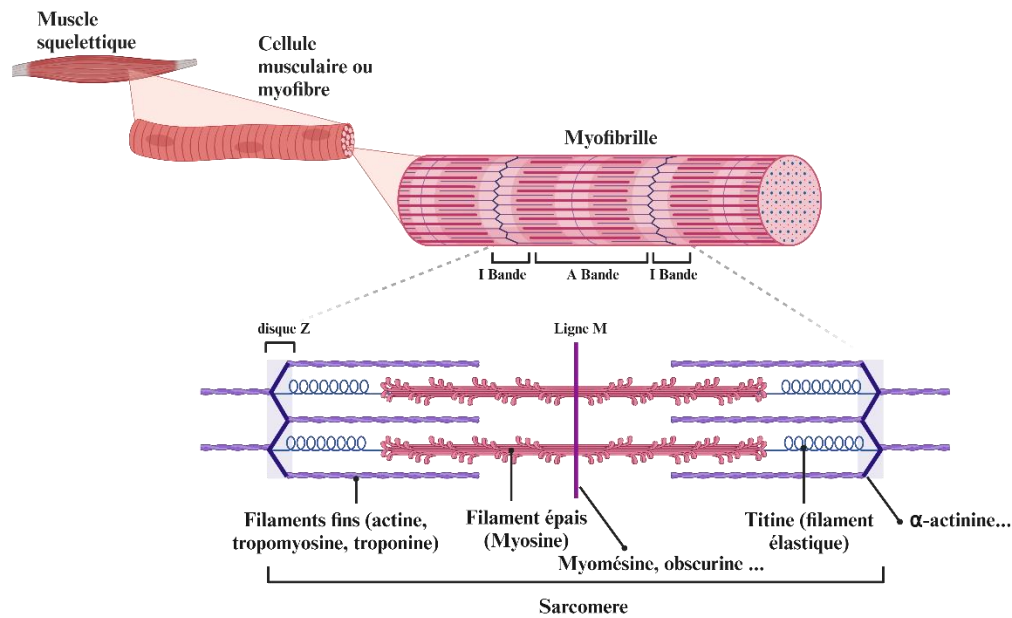


Figure 1 : Structure du muscle squelettique. Il se compose de faisceaux de myofibres qui sont une association de myofibrilles dont l'unité contractile est le sarcomère. Ce dernier est fait de myofilaments fins d'actine et épais de têtes et queues de myosine rattachées à la strie Z par la titine.

II. Physiologie des relâchements calciques dans le muscle squelettique

A. L'homéostasie calcique dans le muscle

La régulation de l'homéostasie calcique dans les cellules musculaires squelettiques est un système finement réglé impliquant des interactions complexes entre le stockage des ions calcium dans le réticulum sarcoplasmique (RS), la libération, l'absorption et la détection du calcium. Ce système garantit que la contraction et la relaxation musculaires se déroulent de manière fluide, efficace et réactive par rapport aux besoins de l'organisme. Comprendre ces mécanismes offre des perspectives sur la physiologie musculaire et sur les cibles thérapeutiques potentielles pour les maladies liées aux muscles.

Structure du réticulum sarcoplasmique (RS) :

Introduction

Le RS peut être divisé en deux types morphologiques selon sa localisation par rapport aux sarcomères :

Le RS longitudinal, situé autour des unités contractiles, participe à la contraction et à la relaxation. Il est riche en canaux calciques activés par des ligands, appelés récepteurs de l'Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3R), qui libèrent le Ca^{2+} principalement pour réguler des voies de signalisation distinctes de la contraction des sarcomères. La Ca^{2+} ATPase du RS (SERCA) est également abondante dans cette région, pompant le Ca^{2+} du cytoplasme vers le RS contre un important gradient de concentration, consommant ainsi de hauts niveaux d'ATP (Salanova et al., 2002).

Le RS jonctionnel (jRS), situé en étroite proximité des invaginations sarcolemmales appelées tubules transversaux (TT) ou tubules T, régleme la initiation de la contraction. Le jRS correspond à une citerne terminale unique qui s'étend parallèlement et en proximité étroite des TT. Dans les fibres musculaires squelettiques, deux citernes terminales s'associent avec un TT, formant des membranes structurées multicomplexes appelées triades. Cette structure assure une proximité étroite entre le canal calcique de type L voltage-dépendant Cav1.1, également connu sous le nom de récepteur Dihydropyridine (DHPR), présent dans le TT, et les canaux calciques RyR1 de la membrane du jRS. Cav1.1 et RyR1 interagissent physiquement, formant un complexe maintenu par des protéines accessoires comme la triadine, (telle que la triadine95), la junctophiline (JPH), la junctine et d'autres (Fourest-Lieuvin et al., 2012; Golini et al., 2011).

Pour maintenir la composition du jRS, les myocytes striés ont développé un circuit complexe de transport des protéines. La calséquestrine (CSQ), par exemple, est une protéine liant le Ca^{2+} qui agit comme un tampon de Ca^{2+} dans la lumière du RS. Cette protéine est synthétisée dans les citernes périnucléaires du RS et distribuée au jRS par la suite. La triadine et la junctine, suivent une voie de synthèse similaire. Le même modèle de synthèse de protéines périnucléaires dans le RE rugueux suivi d'un trafic vers le jRS a été observé dans les cellules musculaires squelettiques, suggérant que les myocytes striés possèdent une organisation structurelle dans laquelle les fonctions du RE rugueux sont concentrées dans la portion périnucléaire du système membranaire du réticulum (Rossi et al., 2008).

Introduction

Homéostasie du Ca^{2+}

L'homéostasie des ions calcium (Ca^{2+}) dans les cellules musculaires striées est un processus crucial qui implique la libération et le stockage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique (RS).

La libération de Ca^{2+} des réserves du RS vers le cytosol se produit spontanément en raison du fort gradient de concentration entre les deux compartiments. Ce processus nécessite l'ouverture des canaux récepteurs de la ryanodine (RyR) ou des récepteurs de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3R). Ces canaux diffèrent dans leurs stimuli d'activation, leur cinétique de libération de Ca^{2+} et la distribution de leurs isoformes. Dans le cœur, RyR2 est l'isoforme prédominante et est activée par l'entrée de Ca^{2+} par *via* le Cav1.2, un mécanisme appelé libération de Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} (CICR pour Calcium Induced Calcium Release). Dans le muscle squelettique, l'isoforme prédominante est RyR1, qui est activée par des interactions protéine-protéine avec Cav1.1 situé dans les tubules transverses. Quelle que soit l'isoforme, les événements de libération de Ca^{2+} d'un cluster de RyR sont appelés "étincelles" (sparks). D'autre part, la libération de Ca^{2+} médiée par IP3R est directement stimulée par l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), un messenger secondaire soluble dérivé de la phosphatidylinositol située à la membrane plasmique. Les événements de libération de Ca^{2+} d'un cluster d'IP3R sont appelés "bouffées" (puffs). Chaque événement de libération de Ca^{2+} produit une déplétion locale de Ca^{2+} dans la lumière du RS (Berridge, 2006; Cheng et al., 1996).

La recapture du calcium et la reconstitution des stocks calciques réticulaires nécessitent une dépense d'énergie car ils se produisent contre le gradient de concentration. La SERCA est le principal transporteur impliqué dans ce processus, pompant deux ions Ca^{2+} dans la lumière du RS au prix de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Ce transport dépend de la capacité de tampon du Ca^{2+} dans la lumière du RS, qui repose sur deux protéines liant le Ca^{2+} : la calséquestrine (CSQ) et la calréticuline. Ces deux protéines sont essentielles pour fixer la concentration de Ca^{2+} libre intraluminale ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$) et impactent directement les fonctions des RyR, IP3R et SERCA (Stammers et al., 2015; Wray and Burdyga, 2010).

La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$ ne régleme pas seulement les mécanismes de libération et de remplissage du Ca^{2+} , mais aussi l'entrée de Ca^{2+} activée par le stock calcique (SOCE) (Store-Operated Ca^{2+} Entry). Ce mécanisme consiste en un influx de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire en réponse

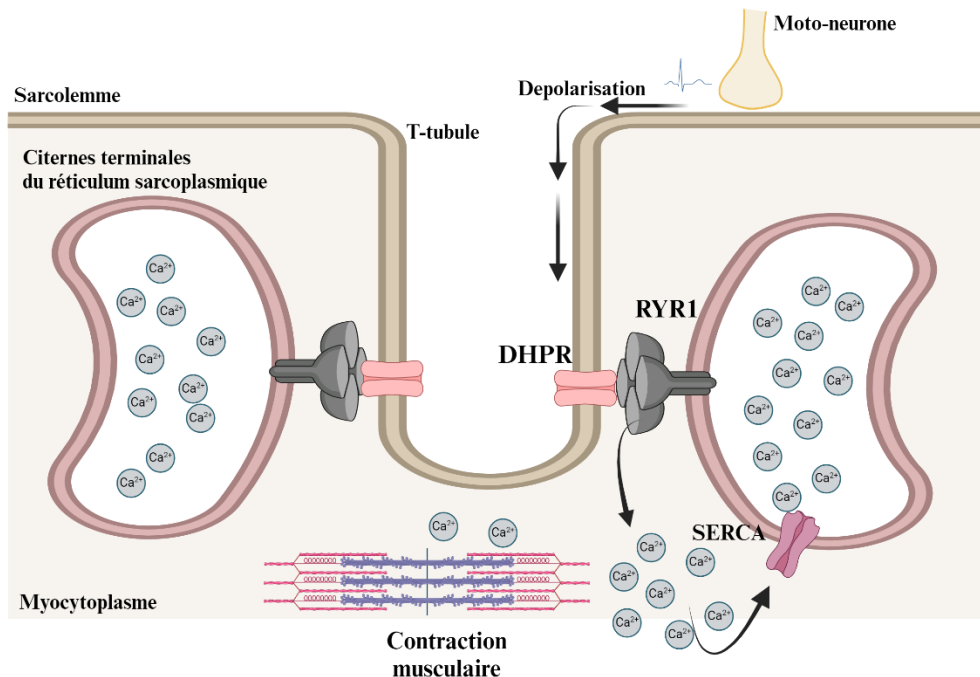
Introduction

à une déplétion du Ca^{2+} dans la lumière du RS. La baisse du Ca^{2+} dans le RS induit la formation de tétramères de la protéine STIM1 (stromal interaction molecule 1) à la surface du RS. Ces oligomères activent directement les canaux de Ca^{2+} activés par le stock (SOC), également connus sous le nom de canaux de Ca^{2+} activés par la libération de Ca^{2+} (CRAC), dans la membrane plasmique. Le canal SOC le mieux décrit est la protéine ORAI, qui, une fois activée, conduit à l'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol pour son transport subséquent dans la lumière du RS (Avila-Medina et al., 2018; Elliott, 2001).

En résumé, l'homéostasie du Ca^{2+} dans les cellules musculaires striées est maintenue par un équilibre délicat entre la libération de Ca^{2+} depuis le RS, son extrusion hors de la cellule et son pompage actif de retour dans le RS, ainsi que par l'entrée de Ca^{2+} depuis l'extérieur de la cellule en réponse à la déplétion des réserves intracellulaires.

B. Couplage Excitation – Contraction

La membrane plasmique des myofibres fait des invaginations, appelées tubule-T. Ces tubules-T flanqués de part et d'autre de deux citernes terminales de réticulum sarcoplasmique (jRS), forment la triade (**Figure 2**).



Introduction

Figure 2 : Organisation de la triade et le couplage excitation – contraction. La triade est composée de l'invagination du sarcolemme formant le tubule transverse (T-tubule) qui est flanqué de part et d'autre de citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Au niveau de cette structure, se produit le processus de couplage excitation – contraction. C'est le mécanisme par lequel un signal électrique, avec l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau du motoneurone, entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique. Cela aboutit à la contraction musculaire. La dépolarisation active le canal calcique voltage-dépendant, DHPR, qui change de conformation et entraîne mécaniquement l'activation du canal RyR1 permettant la libération d'ions calcium du réticulum vers le myocytosol. Ce calcium permet le glissement des filaments d'actine et de myosine, c'est la contraction.

Au niveau de cette dernière, il existe des complexes multiprotéiques ou complexes de libération du calcium (CRC) qui sont les acteurs du couplage excitation-contraction. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la jonction neuromusculaire, entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique par un influx d'ions sodiques, avec l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.4, et la sortie de potassium. Cette dépolarisation entraîne l'activation d'un canal calcique voltage-dépendant, communément appelé DHPR (Récepteur à la Dihydropyridine), situé sur le sarcolemme au niveau du tubule-T. Ce DHPR, est lui-même couplé mécaniquement à un autre canal calcique situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique appelé RyR1 (Récepteur de la Ryanodine 1). Le changement de conformation du DHPR entraîne l'activation et l'ouverture de RyR1 aboutissant ainsi à une libération d'ions calcium du réticulum vers le cytosol (Marty and Fauré, 2016).

Ce processus dans le muscle squelettique, permettant de transformer un signal électrique en signal chimique avec la libération d'ions calcium vers le cytosol, est désigné sous le terme de « VICR » pour Voltage-Induced Calcium Release.

Ce calcium en se liant à la troponine C sur les filaments d'actine entraîne un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine exposant un site de liaison sur le filament d'actine pour la tête de myosine. Le glissement des têtes de myosine sur l'actine par hydrolyse d'ATP grâce à la myosine ATPase permet le raccourcissement du sarcomère et ainsi la contraction musculaire (Mukund and Subramaniam, 2020).

La relaxation du muscle se produit avec la recapture des ions calcium vers le réticulum sarcoplasmique grâce aux pompes SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum ATPase), processus nécessitant l'hydrolyse d'ATP générant ainsi de la thermogénèse. La contraction musculaire est ainsi un acteur de l'homéostasie thermique avec le calcium comme chef d'orchestre (**Figure 2**).

Introduction

L'étape de relaxation se compose de deux parties : (**La relâche**), la baisse du calcium entraîne la dissociation de la liaison actine-myosine avec le masquage de nouveau par la tropomyosine des sites de liaisons des têtes de myosine sur l'actine. (**La relaxation**), le retour à l'état initial des filaments d'actine et de myosine signe l'étape de relaxation du muscle (Periasamy et al., 2017).

C. Les acteurs du CRC

Le complexe de libération de calcium est un complexe protéique essentiel au fonctionnement des muscles squelettiques et au couplage excitation-contraction. Il se compose de plusieurs protéines, dont entre autres le canal calcique voltage-dépendant DHPR (Cav1.1), RyR1, la triadine, la junctine et la calséquestrine. Ces protéines forment un complexe qui s'étend à travers trois compartiments de la fibre musculaire, reliant l'environnement extracellulaire aux réserves de calcium du réticulum sarcoplasmique (**Figure 3**).

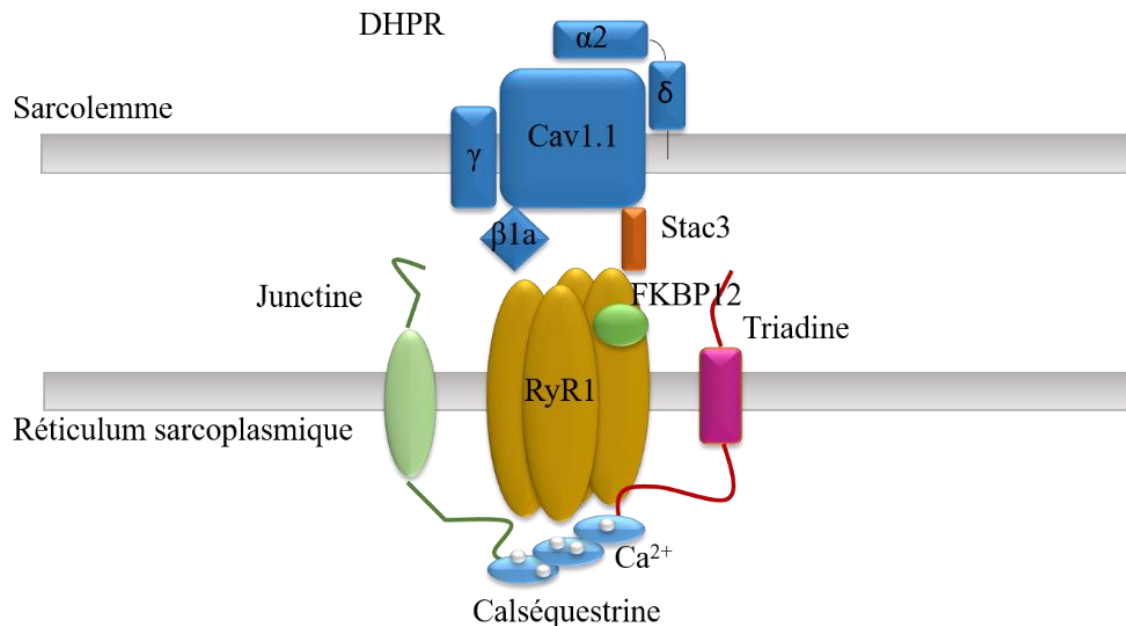


Figure 3 : Les acteurs du complexe de relâchement du calcium. Le complexe multiprotéique se compose de plusieurs protéines dont deux majeures, le DHPR et RyR1. De nombreuses protéines auxiliaires régulent ces deux canaux calciques. La triadine/junctine et Stac3 permettent entre autres le couplage physique des canaux, FKBP12 sert de stabilisateur à RyR1 et la calséquestrine au niveau intra-sarcoplasmique tamponne le calcium. Les sous-unités $\alpha2\delta1$ et $\beta1a$ régulent le canal DHPR Cav1.1. (Adaptée de Marty and Fauré, 2016)

Introduction

1. Les récepteurs aux dihydropyridines

a) Les canaux calciques voltage-dépendants

L'excitabilité cellulaire et la transmission synaptique sont liées aux canaux voltage-dépendants. Les canaux calciques voltage-dépendants permettent la traduction d'un changement de voltage à travers la membrane en libération d'ions calcium. Ils sont composés d'une sous-unité principale formant le canal, α ou Cav, associée ou pas à des sous-unités régulatrices en fonction du type de canal. Il se compose dans le muscle squelettique des sous-unités régulatrices $\beta 1a$, γ , $\alpha 2\delta-1$ et de la sous-unité canal $\alpha 1S$ ou Cav1.1 appartenant au sous-groupe des canaux de type L (**Figure 3**).

Sur la base de leurs propriétés biophysiques, ces canaux sont divisés en deux grands groupes, les canaux à haut seuil de voltage d'activation (HVA) et ceux à bas seuil d'activation (LVA). En tout, il y a 10 isoformes codées dans le génome des mammifères par les gènes *CACNAIx*. Ils sont subdivisés en fonction de la répartition tissulaire et/ou de la cinétique d'activation. Ainsi, les HVA sont composés des canaux de type L (Long lasting), à ouverture longue ou prolongée, de canaux de type T à ouverture transitoire (LVA), et de type N, P/Q et R. Dans les types L, on retrouve les Cav1.1 à Cav1.4 codés respectivement par *CACNAIS*, *CACNAIC*, *CACNAID* et *CACNAIF* aussi connus sous l'appellation $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ et $\alpha 1F$. Les P/Q, N et R forment respectivement le groupe des Cav2.1 à Cav2.3 encodés par *CACNAIA*, *CACNAIB* et *CACNAIE* respectivement aussi appelés $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ et $\alpha 1E$. Pour finir, on a les canaux de type T, les seuls fonctionnels sans sous-unités auxiliaires, Cav3.1 à Cav3.3 ou $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ et $\alpha 1I$, codés par *CACNAIG*, *CACNAIH* et *CACNAI* (**Tableau 1**) (Dolphin, 2016, 2018a; Neely and Hidalgo, 2014).

Ces canaux ont été caractérisés aussi au niveau pharmacologique. Ainsi, les types L sont bloqués par les 1,4-dihydropyridines incluant la Nifédipine. D'autres toxines, ω -conotoxine, ω -agatoxine et SNX-482, ont aussi été identifiées comme bloqueurs respectifs des canaux N, P/Q et R (Dolphin, 2016).

L'expression tissulaire de ces différents canaux a également été largement étudiée grâce à des modèles murins permettant aussi d'élucider leurs fonctions physiologiques. Cav1.1 est le seul exprimé dans le muscle squelettique et en faible proportion dans le cortex. Cav1.2 se retrouve

Introduction

dans le muscle cardiaque, les muscles lisses et le système nerveux. Cav1.3 a une localisation plus restreinte et joue un rôle majeur dans le nœud sino-atrial et est exprimé aussi dans le système auditif. Cav1.4 est particulièrement restreint dans le système visuel, dont la rétine.

Les canaux de type P/Q, N et R sont principalement exprimés dans le système nerveux central et périphérique notamment dans les neurones de Purkinje pour Cav2.1. Pour finir, les Cav3 sont largement distribués dans les neurones mais aussi certaines cellules excitables. Ainsi, ils sont prédominants dans le thalamus et jouent un rôle important dans l'activité pacemaker cardiaque et neuronale (**Tableau 1**) (Dolphin, 2016).

b) Fonctions des Cav1.x

Dans le muscle, ils participent au processus de Couplage excitation – contraction permettant de traduire un signal électrique en action mécanique qu'est la contraction musculaire. Ainsi, dans le muscle squelettique, Cav1.1 est couplé à RyR1 et dans le muscle cardiaque Cav1.2 à RyR2 (Dolphin, 2016).

Introduction

Tableau 1 : récapitulatif des canaux calciques voltage-dépendant

	Type	Gènes	Protéines	Expression tissulaire	Sous-unité $\alpha 2\delta$, β et γ	Pathologies associées				
HVA	Type L	<i>CACNA1S</i>	$\alpha 1S$ (Cav1.1)	Muscle squelettique	<i>CACNA2D1</i> ($\alpha 2\delta$ -1) <i>CACNA2D2</i> ($\alpha 2\delta$ -2) <i>CACNA2D3</i> ($\alpha 2\delta$ -3) <i>CACNA2D4</i> ($\alpha 2\delta$ -4) <i>CACNB1</i> ($\beta 1$) <i>CACNB2</i> ($\beta 2$) <i>CACNB3</i> ($\beta 3$) <i>CACNB4</i> ($\beta 4$) <i>CACNG1</i> ($\gamma 1$)	Paralysie périodique hypokaliémique, hyperthermie maligne				
		<i>CACNA1C</i>	$\alpha 1C$ (Cav1.2)	Cœur, muscle lisse, système nerveux		Le syndrome de Timothy, Autisme, les troubles bipolaires, la schizophrénie				
		<i>CACNA1D</i>	$\alpha 1D$ (Cav1.3)	Sinus nodal, système auditif, tissus endocrines		Arythmie, bradycardie, la surdité				
		<i>CACNA1F</i>	$\alpha 1F$ (Cav1.4)	Système visuel		Cécité nocturne stationnaire congénitale de type 2				
	Type P/Q	<i>CACNA1A</i>	$\alpha 1A$ (Cav2.1)	SNC/SNP						
	Type N	<i>CACNA1B</i>	$\alpha 1B$ (Cav2.2)							
	Type R	<i>CACNA1E</i>	$\alpha 1E$ (Cav2.3)							
	LVA	Type T	<i>CACNA1G</i>	$\alpha 1G$ (Cav3.1)				Neurones Cœur	Pas de sous-unités auxiliaires	
			<i>CACNA1H</i>	$\alpha 1H$ (Cav3.2)						
			<i>CACNA1I</i>	$\alpha 1I$ (Cav3.3)						

Introduction

Dans le muscle squelettique, Cav1.1 du DHPR, en étant associée au canal RyR1 permet la libération du calcium dans le cytosol grâce à deux paramètres, en tant que senseur du voltage et comme activateur de RyR1, c'est le VICR. A l'état de repos, le DHPR réprime le canal RyR1 et la survenue d'une dépolarisation membranaire au-dessus de -50 mV entraîne un changement de conformation du DHPR menant à l'activation mécanique de RyR1. L'implication du calcium entrant par le DHPR dans ce processus est très controversée (Allard, 2018; Gandini and Zamponi, 2022).

A l'inverse dans les cardiomyocytes du muscle cardiaque c'est l'entrée de calcium *via* Cav1.2 qui active RyR2, on parle de CICR (Calcium Induced Calcium Release). Ce processus permet la contraction musculaire dans le cœur. Cav1.3 est aussi exprimé dans les nœuds sino-atriaux et sino-ventriculaires et participe à la fonction de pacemaker. Chez la souris KO Cav1.3, on retrouve une bradycardie, une arythmie, un ralentissement de la fréquence du pacemaker dans le nœud sino-atrial et une dépolarisation diastolique prolongée. Chez l'homme les mutations pertes de fonction sur *CACNA1D* (Cav1.3) aboutissent à un phénotype similaire (Gandini and Zamponi, 2022; Mangoni et al., 2003; Zhang et al., 2002).

Au niveau central, c'est Cav1.2 qui est majoritairement présent. Il participe au processus de couplage excitation-transcription modulant ainsi des voies de signalisation calcium-dépendantes impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes comme l'axe Calmoduline kinase/CaMKII. Il joue ainsi un rôle dans la plasticité neuronale en participant aux mécanismes d'apprentissage, de mémorisation, mais aussi dans les addictions (Gandini and Zamponi, 2022; Ma et al., 2012).

Les canaux Cav1.3 sont associés aux structures présynaptiques spécialisées fournissant des signaux Ca^{2+} hautement localisés pour la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses des cellules sensorielles, telles que les cellules ciliées internes cochléaires. Ainsi, l'absence de Cav1.3 chez l'homme et la souris entraîne une surdité (Gandini and Zamponi, 2022).

Les canaux calciques de type L jouent aussi un rôle important dans les cellules endocrines, en particulier dans le pancréas et les glandes surrénales. Dans les cellules β -pancréatiques, Cav1.2

Introduction

aide à contrôler la libération d'insuline en phase rapide postprandiale. Les canaux calciques Cav1.3 jouent aussi un rôle clé dans la sécrétion d'aldostérone (Gandini and Zamponi, 2022).

Pour finir, dans la rétine, Cav1.4, est exprimé dans les cellules photoréceptrices, des cellules hautement spécialisées qui détectent la lumière. La libération prolongée de glutamate par leurs synapses est dépendante du Ca^{2+} et Cav1.4 constitue la source prédominante d'entrée en Ca^{2+} (Dolphin, 2018a; Zamponi and Snutch, 2013).

c) Les canaux calciques voltage-dépendants de type L

La structure complexe de ces canaux est basée sur celle du DHPR (450 kDa, masse avec les sous-unités auxiliaires) dans le muscle squelettique du lapin qui a été étudiée par Cryo-microscopie électronique avec une résolution de 3,6 Å permettant d'élucider l'ultrastructure (Wu et al., 2016).

Les canaux calciques de type L du muscle squelettique sont formés d'une sous-unité Cav1.1 ou $\alpha 1S$ formant le canal, associés avec un ratio 1 :1 :1 :1 à des sous-unités régulatrices $\beta 1a$, $\alpha 2\delta-1$ et γ . La sous-unité γ est trouvée exclusivement dans le muscle squelettique (**Figure 4**) (Neely and Hidalgo, 2014). Ces sous unités permettent de moduler les propriétés biophysiques du canal, les cinétiques d'activation et d'inactivation ainsi que son adressage à la surface.

1) Sous-unité $\alpha 1$ ou Cav1.x

Structure

La sous-unité $\alpha 1$ ou Cav1.x des canaux calciques voltage-dépendants de type L a un repliement hautement conservé et fournit des sites de liaison pour ses agonistes et antagonistes. Elle possède quatre répétitions homologues (I-IV) reliées par des boucles intra et extracellulaires. Chacune des régions est composée de six hélices transmembranaires nommées S1 à S6. Il comprend plusieurs domaines fonctionnels :

Le domaine de sensibilité au voltage (VSD) se trouve dans les segments S1 à S4. Le S4 contient des charges positives conservées répondant aux variations du potentiel membranaire. Ainsi, le segment S4 contient des acides aminés basiques, alignés de manière répétitive, Arginine ou Lysine qui sont présents tous les trois résidus. On parle de charges déclencheuses (« Gating

Introduction

charges »). Ces résidus servent de senseur au voltage et ainsi réagissent à la dépolarisation membranaire en changeant de conformation menant à l'état ouvert ou fermé du canal.

Le motif AID (α interacting domain), composé de 18 acides aminés au niveau de la boucle intracellulaire des régions répétées homologues I et II, sert de site d'interaction avec les sous-unités β (Wu et al., 2015).

Les domaines S5 - S6 et le segment pore-forming (P loop), situé entre eux, des quatre régions répétées forment le canal ionique (Catterall, 2011). Au niveau de ces segments, se trouve le filtre de sélectivité. Cette partie du canal détermine la sélectivité pour les ions calcium grâce à quatre résidus glutamate (Glu292/614/1014/1323 chez le lapin) localisés dans la chaîne latérale entre ces segments. La charge négative du glutamate permet l'interaction avec les ions Ca^{2+} et, combiné avec un rayon de la partie interne du canal inférieur à 1 Å, détermine la sélectivité pour cet ion (**Figure 4B**) (Wu et al., 2016).

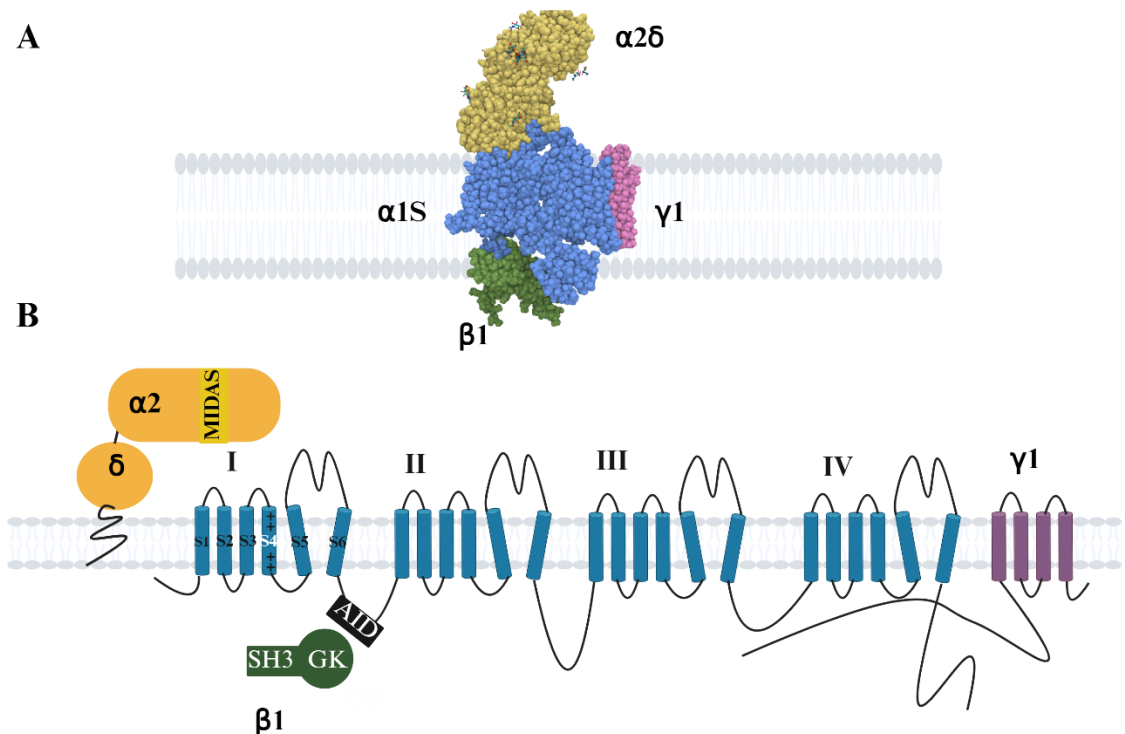


Figure 4 : Représentation schématique de la structure du DHPR. **A.** Structure Cryo-EM du canal DHPR de lapin de 3.6 Å avec les différentes sous-unités annotées (Wu et al., 2016). **B.** Représentation schématique de la sous-unité Cav1.1 qui se compose de quatre domaines répétés homologues (I – IV) chacun se composant de six hélices transmembranaires (S1-S6). Le segment S4 contient des charges positives servant de senseur au changement de

Introduction

voltage. Le motif AID dans la boucle intracellulaire IS6 permet l'interaction avec $\beta 1a$. L'interaction avec $\alpha 2\delta$ s'effectue entre le motif MIDAS et la boucle extracellulaire S1-S2.

Dans le muscle squelettique, chez l'homme, la sous-unité Cav1.1 codée par *CACNA1S* sur le Chr1q32.1 fait 72 940 bases pour 44 exons et une masse moléculaire de 212 kDa. Elle est la sous-unité canal associée au DHPR. Durant le couplage excitation-contraction, la transmission de la dépolarisation du canal DHPR vers le RyR1 est d'ordre mécanique. La nature de l'interaction entre les deux canaux a été beaucoup étudiée, mais reste encore floue. Les acides aminés 724 à 760 des boucles cytoplasmiques des domaines II-III de Cav1.1, la partie C-terminale de $\beta 1a$ ou encore Stac3 semblent jouer un rôle dans cette interaction (Dulhunty et al., 2017; Shishmarev et al., 2022; T et al., 1990; Wu et al., 2016).

Régulation fonctionnelle

Les protéines régulatrices

Le canal calcique de type L, autre que les sous-unités régulatrices qui le composent, est modulé par de nombreux seconds messagers. On peut citer trois acteurs majeurs : la calmoduline, les petites protéines G et la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA).

Premièrement, associée à la queue C-terminale de Cav1.x, la calmoduline régule l'inhibition du canal de façon calcium dépendante en fonctionnant comme un senseur du Ca^{2+} . On a ensuite, les petites protéines G à fonction GTPase, Kir/Gem, qui réduisent la densité de courant des Cav1.x en bloquant leur trafic à la surface par séquestration ou en formant un complexe avec la sous-unité β qui joue un rôle important dans l'adressage à la surface du canal. Pour finir, les Cav1.x sont modulés par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) par phosphorylation. La PKA peut potentialiser ou inhiber l'activité du canal en fonction du sous-type de canal spécifique et du site de phosphorylation. Dans les myocytes cardiaques, la phosphorylation par PKA de la sous-unité $\alpha 1C$, sur la sérine-1700, lève l'auto-inhibition du canal par le peptide C-terminal clivé de ce dernier (Brignell et al., 2015; Dolphin, 2016, 2018a; Gandini and Zamponi, 2022).

Introduction

Les protons

Les ions H^+ jouent un rôle crucial dans la régulation des canaux calciques voltage-dépendants de type L. Cela a des implications physiologiques importantes, notamment dans la modulation de l'excitabilité cellulaire pendant une activité neuronale intense et dans la promotion de la survie cellulaire lors de crises épileptiques et d'ischémie cérébrale ou cardiaque à court terme, mais aussi dans le muscle squelettique au cours d'une activité physique. Des études de réexpression du canal $\alpha 1C$ avec les sous-unités régulatrices $\beta 2a$ et $\alpha 2\delta$ dans l'œuf de xénope a permis d'identifier des sites de protonation avec une forte affinité pour les ions H^+ . Ce site est identifié comme étant les résidus glutamates du filtre de sélectivité. La protonation des résidus glutamates affecte la conductance des canaux calciques. Ainsi, les mutations des glutamates en glutamines (EIQ, EIIIQ, EIIQ et EIVQ) sur les différents domaines répétés entraînent une déprotonation du canal par réduction de l'affinité des ions H^+ pour ses résidus (Chen et al., 1996).

Cette régulation par les protons participe dans les cellules des muscles lisses à la régulation des événements de vasoconstriction et vasodilatation modulés par l'afflux extracellulaire de Ca^{2+} activé par l'alcalose et inhibé en état d'acidose. Le pH extracellulaire (pHo) modifie les paramètres de la régulation de l'ouverture des canaux calciques de type L dans les cellules musculaires lisses vasculaires de plusieurs manières. Tout d'abord, le pHo modifie de manière réversible le courant calcique (I_{Ca}) en fonction du pHo, avec une augmentation réversible à un pH alcalin et une réduction à un pH acide par rapport à un pH de 7,4. De plus, le pHo modifie la conductance des canaux calciques individuels. L'analyse des courants de canaux calciques entiers et individuels suggère que des valeurs de pHo plus acides déplacent la régulation dépendante du voltage (~ 15 mV par unité de pH) et réduisent la conductance des canaux calciques individuels (Klößner and Isenberg, 1994).

Physiopathologie

Leurs expressions tissulaires particulières et l'importance de leurs rôles physiologiques font que les mutations associées aux gènes codants pour ces sous-unités sont liées à plusieurs pathologies souvent tissus spécifiques.

Introduction

Dans le muscle squelettique, la paralysie périodique hypokaliémique (hypoPP) est une maladie génétique provoquant une faiblesse musculaire ou paralysie locale voire généralisée, affectant les canaux calciques ou sodiques des muscles. Elle implique des mutations sur *CACNA1S* et sera discutée dans le chapitre traitant des myopathies du complexe CRC.

Une autre pathologie liée à des mutations sur *CACNA1S* entraînant une altération du processus de couplage excitation-contraction, est l'hyperthermie maligne per anesthésique. Moins de 1% des mutations associées à cette pathologie sont en lien avec ce gène pour 70% de mutations trouvées sur *RYR1*. Les mutations autosomiques dominantes sur *CACNA1S* sont situées majoritairement dans la boucle cytoplasmique entre les domaines homologues III et IV (Beam et al., 2017).

Le syndrome de Timothy (TS) est une maladie génétique multi-systémique. Il est causé par des mutations du gène *CACNA1C* (Cav1.2) qui entraînent des problèmes cardiaques, de type arythmie ventriculaire, QT long et une tachycardie létale responsable de la mort. Il y a aussi des symptômes extracardiaques tels que des anomalies crânio-faciales, de la syndactylie, des difficultés d'apprentissage ou encore l'autisme. Les mutations sont situées sur le segment S6 du domaine répété homologue I notamment sur l'exon 8 entraînant un gain de fonction du canal abolissant l'inactivation par le voltage. Due à son expression dans le cerveau, des troubles neuropsychiatriques ont été associés à des mutations sur ce canal, dont les troubles bipolaires, la schizophrénie ou encore l'autisme (Zamponi et al., 2015).

Chez l'homme et la souris, des mutations pertes de fonctions sur *CACNA1D* (Cav1.3) entraînent un dysfonctionnement du nœud sino-atrial avec arythmie et bradycardie mais aussi de la surdité (Baig et al., 2011). Il y a aussi d'autres troubles associés comme l'hyperaldostéronisme avec des mutations gain de fonction (Zamponi et al., 2015).

Pour finir, la majorité des mutations de *CACNA1F* (Cav1.4) a été identifiée chez des patients atteints de cécité nocturne stationnaire congénitale de type 2. Les symptômes sont une faible acuité visuelle, une myopie, un nystagmus, un strabisme, une photophobie et une cécité nocturne (Zamponi et al., 2015).

Introduction

2) Sous-unité β

Les sous-unités β sont une famille composée de protéines cytoplasmiques $\beta 1$ à $\beta 4$ codées par les gènes *CACNB1* à *CACNB4* avec de nombreuses isoformes d'épissage donnant dix sous-types. Dans le muscle squelettique, l'épissage alternatif de *CACNB1* donne $\beta 1a$, 54 kDa, qui joue un rôle important dans la régulation du canal Cav1.1 du DHPR. La modélisation des sous-unités β a montré l'existence de deux domaines, un SH3 (Src homology 3) et un domaine guanylate kinase (GK). Ce dernier permet l'interaction avec la sous-unité Cav des canaux HVA via le domaine AID (α interacting domain). Cette interaction impose un repliement en hélice α à l'AID qui se prolonge dans le IS6 (Segment S6 domaine I) faisant de β une protéine chaperonne du canal (Neely and Hidalgo, 2014). Cette régulation du repliement prévient la sous-unité α de la dégradation protéasomale.

La sous-unité β participe à la régulation des propriétés biophysiques du canal, augmentant sa probabilité d'ouverture et la densité de courant. Mais aussi, il a été montré une augmentation de l'expression fonctionnelle du canal ou de son insertion à la membrane en présence de β . La première hypothèse avancée est que : 1) β facilite le trafic vers la surface de Cav en masquant un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique sans pour autant qu'un tel motif ait été identifié sur l'AID. 2) L'autre hypothèse évoquée, basée sur la dégradation rapide de Cav2.2 avec la mutation p.(Trp391Ala) sur l'AID abolissant l'interaction avec β , est la protection contre la dégradation par le protéasome grâce au repliement en hélice α induite par β (Dolphin, 2012).

La Sous-unité β interagit avec d'autres protéines ou seconds messagers. Ainsi, sa phosphorylation par la voie PI3K-AKT et l'association avec la CaMKII jouent un rôle dans l'augmentation de l'expression à la surface de la sous-unité Cav (Dolphin, 2012). Il a été aussi montré l'interaction des β avec les petites GTPases monomériques RGK (Rad, Rem, Rem2 et Gem/Kir) qui exercent un double effet inhibiteur, diminuant l'expression de surface ou réduisant la probabilité d'ouverture du canal (Buraei and Yang, 2015).

Récemment, un rôle au-delà de sa fonction dans la régulation du canal a été identifié pour β comme un modulateur de la transcription. Ainsi, des isoformes d'épissage de $\beta 3$ et $\beta 4$ ont été montrées avec une localisation nucléaire inhibant des facteurs de transcription comme Pax6 ou

Introduction

encore réduisant l'activité de silencer comme CHCB2/HP1 γ (Dolphin, 2012; Zhang et al., 2010).

En pathologie, les β sont impliqués dans diverses maladies. Des mutations sur *CACNB2* sont associées au syndrome de Brugada et à la cardiomyopathie hypertrophique, *CACNB4* à l'épilepsie ou encore à de l'ataxie épisodique (Vergnol et al., 2022).

3) Les sous-unité γ

Elle se compose de 4 hélices transmembranaires et une extrémité C et N-terminal cytoplasmique. C'est une famille de 8 membres, mais une seule isoforme, $\gamma 1$, a été retrouvée associée à un canal calcique voltage-dépendant de type L, Cav1.1, dans le muscle squelettique. Elle diminue la quantité de calcium entrant par le canal, mais elle n'est pas indispensable au couplage excitation-contraction (Neely and Hidalgo, 2014).

4) Les sous-unité $\alpha 2\delta$

Structure

C'est la plus grande sous-unité régulatrice associée aux canaux à haut voltage d'activation (HVA) avec une masse moléculaire entre 140 kDa et 175 kDa. C'est une famille de 4 protéines $\alpha 2\delta 1-4$ codées par les gènes *CACNA2D1-4*, mais avec de nombreuses isoformes d'épissage alternatif donnant plusieurs isotypes.

La dernière sous-unité à être caractérisée est $\alpha 2\delta-4$ qui partage 30% d'homologie avec $\alpha 2\delta-1/2$ et 61% avec $\alpha 2\delta-3$. La structure de ces sous-unités est basée sur l'étude de Cryo-EM de $\alpha 2\delta-1$ purifiée dans le muscle squelettique de lapin.

L'isoforme $\alpha 2\delta-1$, identifiée dans le muscle squelettique, se compose de deux parties, $\alpha 2$ et $\delta 1$, codées par le même gène mais clivées en post-traduction à la position Ala960 mais toujours reliées par des ponts disulfures. C'est une protéine hautement N-glycosylée avec 16 sites identifiés (Qin et al., 2002; Wu et al., 2015).

Initialement définies comme des protéines transmembranaires de type 1, des études ont montré la présence d'une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol) avec une localisation membranaire dans les radeaux lipidiques (Detergent Résistant Membranes). Les sous-unités

Introduction

$\alpha\delta$ des canaux calciques sont ancrées à la membrane cellulaire par une modification post-traductionnelle, l'ajout d'une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol). Des études ont révélé que les sous-unités $\alpha\delta$ -1, $\alpha\delta$ -2 et $\alpha\delta$ -3 présentent toutes les caractéristiques attendues des protéines ancrées par une GPI. Elles sont des substrats pour la phospholipase C (PI-PLC) prokaryotique et la GPI-PLC trypanosomale, qui libèrent les protéines $\alpha\delta$ de la membrane. De plus, des mutations du site ω d'ancrage prévu de la GPI (CGGXS) réduisent la localisation des sous-unités $\alpha\delta$ sur la membrane plasmique. Cette étude a également montré que l'ancrage par GPI des sous-unités $\alpha\delta$ est nécessaire pour leur fonction d'amplification des courants calciques (Davies et al., 2010).

Les étapes de maturation de la sous-unité $\alpha\delta$ des canaux calciques voltage-dépendants, depuis sa forme primitive jusqu'à sa forme mature, comprennent plusieurs événements :

La sous-unité $\alpha\delta$ est initialement synthétisée avec une séquence signal qui dirige la protéine vers le réticulum endoplasmique pour la maturation. La protéine subit une glycosylation et la formation de ponts disulfure, des modifications post-traductionnelles essentielles pour la stabilité et la fonction de la protéine. La sous-unité $\alpha\delta$ subit ensuite un clivage protéolytique dans l'appareil de Golgi en deux parties, $\alpha 2$ et δ , qui restent associées pour former la sous-unité fonctionnelle mature (Douglas et al., 2006).

La partie $\alpha 2$ se compose d'un peptide signal (SP) en N-terminal, de domaines CACHE (Chemosensory-like domain) et d'un domaine de von willbrand facteur A (VWA). Ce dernier contient un motif MIDAS (Metal Ion Dependant Adhesion Site) impliqué dans les interactions protéine-protéine nécessitant un cation divalent Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Il se compose chez l'homme de résidus polaires conservés (Asp259, Ser261, Ser263, Thr331 et Asp363) pour les sous-unités $\alpha\delta$ -1 et $\alpha\delta$ -2, et pour $\alpha\delta$ -3 et $\alpha\delta$ -4 seulement des résidus Asp259, Ser261, Ser263. Ces résidus font face aux boucles extracellulaires entre les segments S1 et S2 des régions homologues I, II et III de α (Dolphin, 2012; Wu et al., 2015).

La partie δ comporte une région hydrophobe et un site- ω à ancre GPI (Glycosyl-phospho-inositol) (Davies et al., 2010 ; Dolphin, 2018a, 2012).

Introduction

Domaines fonctionnels

Le domaine CACHE est souvent associé à des récepteurs de la membrane cellulaire et est impliqué dans la liaison à de petites molécules, agissant comme un capteur de stimuli extracellulaires. Ce domaine est organisé en double domaine nommé dCache_1 (double domaine des canaux calciques et chémorécepteurs, famille 1), un domaine protéique conservé que l'on trouve dans diverses protéines de signalisation chez les bactéries et les archées. Il est connu pour se lier aux acides aminés et est présent dans un large éventail d'organismes, y compris les eucaryotes. Le domaine contient un motif, qui est discontinu mais préservé en structure 3D chez les eucaryotes. Le motif se compose des acides aminés YxxxRxWY en N-terminal du CACHE et Y(x~27-34)D en C-terminal.

Deux domaines dCache_1 ont été identifiés dans les protéines $\alpha 2\delta$ en se basant sur la cristallographie de $\alpha 2\delta$ -1. Le premier domaine dCache_1 est interrompu par le VWA (Gumerov et al., 2022; Page et al., 2023). Ce domaine est également impliqué dans la régulation de la réponse au stress cellulaire et dans l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Il est suggéré que le domaine CACHE lie les petites molécules avec l'aide d'une poche formée par sa structure en feuille bêta. En outre, il est impliqué dans la liaison de ligands endogènes aux canaux calciques, ce qui suggère un rôle dans la régulation de la signalisation cellulaire. Ils contiennent une poche de liaison universelle pour les acides aminés, qui dans le cas des sous-unités $\alpha 2\delta$ -1 et $\alpha 2\delta$ -2, peut également accueillir des médicaments gabapentinoïdes. (Anantharaman and Aravind, 2000; Dolphin, 2018b; Page et al., 2023).

L'implication des résidus du site MIDAS dans la modulation fonctionnelle des canaux Cav1.2 par la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 a été étudiée dans un système reconstitué dans des cellules HEK293 avec $\alpha 2\delta$ -1, Cav1.2 et $\beta 3$. Les résultats indiquent que les résidus Asp259, Ser261, Ser263 de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 sont cruciaux pour l'interaction physique avec la sous-unité Cav1.2 et pour la modulation fonctionnelle des courants de Cav1.2. Des expériences de co-immunoprécipitation mettent en évidence une diminution significative de l'interaction physique entre Cav1.2 et la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 lors de la mutation de ces résidus et de façon plus importante pour Asp259 et Ser261. De plus, des expériences de patch-clamp révèlent que les mutations de ces résidus altèrent la modulation des courants de Cav1.2 (Briot et al., 2018). Une

Introduction

autre étude montre que cette interaction passe par le résidu conservé Asp181 (chez le lapin) de la première boucle extracellulaire (IS1S2) de Cav1.2 (Bourdin et al., 2017). Le motif MIDAS dans la sous-unité $\alpha 2\delta$ joue un rôle crucial dans le trafic des canaux calciques vers la membrane plasmique. La mutation du motif MIDAS de $\alpha 2\delta$ -2 entraîne une réduction significative des courants sur Cav1.2, -2.1 et -2.2, ainsi qu'une rétention intracellulaire marquée des sous-unités Cav des HVA (Canti et al., 2005).

Les sous-unités $\alpha 2\delta$ des canaux calciques voltage-dépendants jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression et de la fonction des canaux calciques à haut seuil de voltage d'activation (HVA). La sous-unité augmente les densités de courant, accélère la cinétique d'activation et d'inactivation et produit un décalage hyperpolarisant dans l'inactivation voltage-dépendante. Les sous-unités $\alpha 2\delta$ sont également des cibles médicamenteuses importantes dans des domaines thérapeutiques tels que la douleur neuropathique avec les gabapentinoïdes (Neely and Hidalgo, 2014).

Partenaires au-delà du canal calcique

Il a été constaté que les sous-unités $\alpha 2\delta$ des canaux calciques voltage-dépendants ont des fonctions au-delà de leur rôle sur les canaux HVA. Ces sous-unités auxiliaires améliorent non seulement l'expression et la fonction des canaux calciques, mais ont également des interactions non canoniques avec diverses protéines et récepteurs. Ces interactions comprennent l'association avec les lipoprotéines (LP1), les thrombospondines, les α -neurexines, les protéines prions, les canaux potassiques à large conductance et les récepteurs N-méthyl-d-aspartate. De plus, les sous-unités ont été identifiées comme cible/récepteur pour les composés gabapentinoïdes, qui sont utilisés dans le traitement de l'épilepsie et de la douleur neuropathique. Les sous-unités jouent également un rôle dans l'anxiété, car leur activité affecte la connectivité de la zone cérébrale et l'équilibre du neurotransmetteur du glutamate. Dans l'ensemble, les sous-unités $\alpha 2\delta$ des canaux calciques voltage-dépendants ont diverses fonctions au-delà des canaux calciques et sont impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques (Dolphin, 2018b; Kadurin et al., 2022a).

Introduction

➤ *CACNA2D1*

C'est la première sous-unité qui a été purifiée avec le canal DHPR dans le muscle squelettique de lapin et caractérisée. Elle est composée de 39 exons avec certains (nommés A, B et C) qui sont alternatifs donnant lieu à plusieurs isoformes d'épissage exprimées de façon différentielle. Son expression semble être ubiquitaire dans les cellules excitables mais on la retrouve principalement dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses mais aussi au niveau du système nerveux central et périphérique. Chez la souris, cinq isoformes d'épissage ont ainsi été identifiées dans différents tissus dont le cœur, le muscle squelettique et les neurones DRG (Ganglion de la Racine Dorsale) (Lana et al., 2014; Zamponi et al., 2015).

Dans le muscle squelettique, il y a un consensus sur la sous-unité associée avec Cav1.1 qui est $\alpha 2\delta$ -1. Néanmoins, plusieurs études ont pu mettre en évidence la présence des transcrits de $\alpha 2\delta$ -2, $\alpha 2\delta$ -3 et $\alpha 2\delta$ -4 sans plus de caractérisation au niveau protéique (Murray et al., 2024; Nabhani et al., 2005).

La fonction de $\alpha 2\delta$ -1 dans le muscle squelettique est complexe et pas totalement comprise. Son impact sur la croissance des myotubes et la différenciation des myoblastes a été étudié mais reste débattu, car la recherche donne des résultats contradictoires. Certaines recherches indiquent que $\alpha 2\delta$ -1 n'est pas essentielle à la croissance des myotubes, tandis que d'autres études suggèrent que sa réduction entrave la migration et l'adhérence des myoblastes. Toutefois, les souris $\alpha 2\delta$ -1 knock-out présentent un muscle squelettique normal malgré des déficiences cardiaques, une réduction des courants calciques cardiaques et diminution de la contractilité myocardique (Dolphin, 2012; Gach et al., 2008; García et al., 2008). L'utilisation d'ARN interférents (siRNA) sur des myoblastes pour diminuer l'expression de $\alpha 2\delta$ -1 augmente le taux d'activation du courant calcique et la cinétique du courant sans affecter la structure du canal DHPR ni sa localisation et n'altère pas le couplage excitation-contraction (Dolphin, 2012).

Au niveau central, elle participe à la synaptogenèse des neurones excitateurs et joue un rôle important dans de nombreuses situations pathophysiologiques. Elle est exprimée de manière différentielle dans les motoneurones de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (SLA). De plus, *CACNA2D1* est régulé à la hausse dans le ganglion de la racine dorsale (DRG)

Introduction

à la suite d'une lésion nerveuse, contribuant à la douleur neuropathique chronique. La régulation à la hausse de *CACNA2D1* est associée à une hyper-acétylation des histones et à une diminution de l'enrichissement en histone désacétylase-2 (HDAC2) au niveau du promoteur *CACNA2D1* dans le DRG. HDAC2 fonctionne comme un répresseur transcriptionnel de la douleur neuropathique en supprimant l'expression de $\alpha 2\delta$ -1. Ces résultats suggèrent que l'expression neuronale de *CACNA2D1* est impliquée dans la pathogenèse de la SLA et de la douleur chronique. Les domaines dCache_1 de $\alpha 2\delta$ -1 sont des récepteurs aux gabapentinoïdes. Ces derniers sont utilisés dans le traitement des douleurs chroniques neuropathiques (Mamoor, 2022; Zhang et al., 2022).

➤ *CACNA2D2*

CACNA2D2 est composé de 39 exons et code pour la protéine $\alpha 2\delta$ -2 qui fait 118 kDa chez l'homme. Deux régions d'épissage alternatif ont été identifiées dans les exons 23 et 38 donnant les isotypes $\alpha 2\delta$ -2a, b et c (Barclay and Rees, 2000; Klugbauer et al., 2003).

CACNA2D2 est principalement localisé dans le cerveau, en particulier dans les régions associées à la transmission synaptique. Son expression est importante dans des zones telles que le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet au niveau des cellules de Purkinje (Barclay and Rees, 2000).

Il influence la cinétique des canaux et a un impact sur le trafic et l'expression membranaire des canaux calciques, affectant ainsi l'excitabilité neuronale, la libération de neurotransmetteurs et la plasticité synaptique (Dolphin, 2012). Il participe aussi à la synaptogenèse des fibres cérébelleuses grimpantes. Chez les souris Knock-out *CACNA2D2*, on a une altération de la synaptogenèse, de la localisation des fibres grimpantes et des potentiels postsynaptiques excitateurs permettant d'expliquer un phénotype d'ataxie (Beeson et al., 2020). Des mutations sur *CACNA2D2* ont aussi été associées à l'épilepsie ou à l'atrophie cérébelleuse chez l'homme (Punetha et al., 2019).

➤ *CACNA2D3*

CACNA2D3 code pour la protéine $\alpha 2\delta$ -3 de 175 kDa. Son expression est exclusivement cérébrale. Il joue un rôle dans divers processus neurophysiologiques, dont la plasticité

Introduction

neuronale en favorisant le trafic et la localisation présynaptique des canaux calciques (Klugbauer et al., 1999; Zhang et al., 2023).

Des études ont montré que l'absence d' $\alpha 2\delta$ -3 entraîne un traitement auditif altéré, des réponses de sursaut acoustique réduites et des réponses déformées du tronc cérébral auditif. De plus, $\alpha 2\delta$ -3 a été associée à une sensibilité réduite à la douleur, à la chaleur et a été identifiée chez des enfants présentant des troubles du spectre autistique (Pirone et al., 2014).

➤ *CACNA2D4*

Structure

C'est la dernière sous-unité de la famille des $\alpha 2\delta$ qui a été clonée et caractérisée. Cette première étude a permis par RACE-PCR à partir d'ADNc de cerveau humain de déterminer la structure de cette isoforme et de différents variants d'épissage. Le pourcentage d'identité entre les sous-unités $\alpha 2\delta$ -4 et les sous-unités humaines $\alpha 2\delta$ -1, $\alpha 2\delta$ -2 et $\alpha 2\delta$ -3 est de 30%, 32% et 61% respectivement. Ces pourcentages d'identité ont été déterminés par comparaison des séquences d'acides aminés des différentes sous-unités (Qin et al., 2002).

Ainsi, dans cette première caractérisation, *CACNA2D4* est défini comme étant composé de 36 exons invariants (exons 2 à 37) et de quatre exons alternatifs (exons 1, 1B, 37L et 38) s'étendant sur environ 130 kb du chromosome humain 12p13.3. Les exons 1 et 1B possèdent tous deux un codon de départ en phase. La séquence N-terminale encodée par l'exon 1 contient un peptide signal putatif, tandis que celle encodée par l'exon 1B ne le contient pas. Ainsi, cette première caractérisation a permis de mettre en évidence la présence de quatre variants d'épissage ($\alpha 2\delta$ -4a, b, c et d). La sous-unité $\alpha 2\delta$ -4a est codée par les exons 1 à 38, tandis que l' $\alpha 2\delta$ -4b est codée avec les exons alternatifs 1B et 2 à 38. Deux autres variants d'épissage putatif sont $\alpha 2\delta$ -4c (exons 1 à 37L) et $\alpha 2\delta$ -4d (exons 1B et 2 à 37L). D'après les informations fournies par l'étude, l'expression de chaque isoforme d'épissage de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -4 varie dans différents tissus humains : (Qin et al., 2002)

- L'isoforme $\alpha 2\delta$ -4a, contenant un peptide signal putatif, est exprimée dans le cervelet et le cortex cérébral, ainsi que dans le cœur humain, bien que la mise en évidence de la protéine ne soit pas concluante dans ce dernier.

Introduction

- L'isoforme $\alpha 2\delta$ -4d, codée avec l'exon 1B, est faiblement exprimée dans les amygdales.
- Les deux isoformes $\alpha 2\delta$ -4c et $\alpha 2\delta$ -4b ont montré une expression dans la glande pituitaire, la glande surrénale et les tissus cérébraux, avec des niveaux relativement élevés dans la glande pituitaire et la glande surrénale.

Depuis cette première caractérisation, de nouvelles isoformes d'épissage ont été mises en évidence, rapportant le nombre à douze. Ainsi, les parties les plus variables sont l'exon 28, de l'exon 30 à 38, l'exon 16 et l'exon 1. Ainsi, plusieurs de ces isoformes d'épissage n'ont plus de peptide signal, ont un domaine Cache tronqué ou encore manque la séquence codante pour la partie δ (Bechtel et al., 2007; Gerhard et al., 2004). La distribution tissulaire des différentes isoformes montre l'absence de l'exon16 est absent de la rétine et l'hypophyse, mais est l'isoforme prédominante exprimée dans le cervelet, l'hippocampe, le cortex occipital et le cortex somatosensoriel ou encore dans l'hypothalamus (Bacchi et al., 2015). En résumé, les isoformes d'épissage de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -4 présentent des schémas d'expression spécifiques dans différents tissus humains, suggérant des rôles distincts dans la régulation de l'activité des canaux calciques en fonction du tissu.

L'étude cryo-EM de l' $\alpha 2\delta$ -1 chez le lapin sert de base à la compréhension des domaines fonctionnels de la protéine. En utilisant l'analyse bio-informatique, en particulier Bencling, la prédiction des domaines fonctionnels dans $\alpha 2\delta$ -4 peut être déterminée par des comparaisons d'homologie avec $\alpha 2\delta$ -1. Cette analyse révèle que la forme canonique humaine de $\alpha 2\delta$ -4 se compose de trois parties : $\alpha 2$ (Ala20 — Glu991), δ -4 (Ala992 — Glu991) et ainsi qu'un peptide signal (Met1 — Pro19). Les segments $\alpha 2$ et δ -4 susmentionnés, qui sont dérivés du gène *CACNA2D4*, sont clivés et liés entre eux par un pont disulfure (Cys447 - Cys1097) (**Figure 5**).

La partie $\alpha 2$ contient un domaine du facteur A de von Willbrand (vWA) (Asp291-Leu473), qui englobe le motif MIDAS (Asp297, Ser299 et Ser301), et deux domaines dCache_1 situés en aval du vWA. Un premier domaine (dCache_1 : Tyr259 - Leu580) qui est donc discontinué par le vWA et un deuxième domaine (dCache_1 : Cys890 - Val915) (Katharina Agnes Wycisk et al., 2006).

Introduction

Sur la partie δ -4, il existe un domaine d'hélice α transmembranaire (Ser1116 - Leu1136), ainsi qu'un site ω d'ancrage GPI prédit composé de petits résidus polaires (Cys1109, Gly1110, Gly1111, Ala1112 et Ser1113). La version humaine de cette protéine présente une similitude de 83 % avec la version murine, avec la conservation des domaines susmentionnés (**Figure 5**).

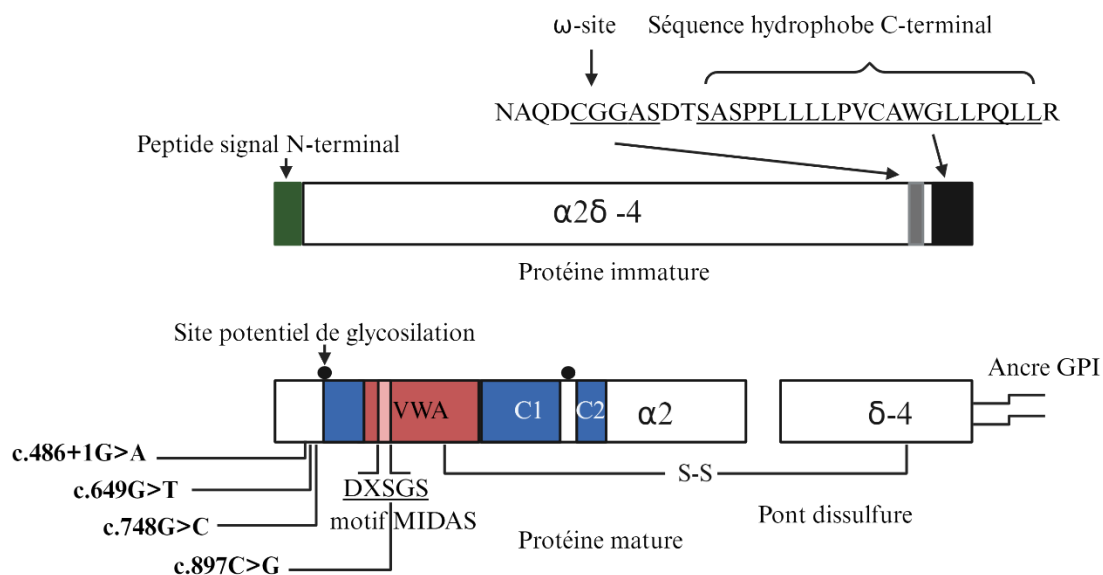


Figure 5 : Structure des domaines de la protéine $\alpha 2\delta$ -4. Au-dessus, la représentation schématique de la structure de la protéine immature non clivée avec les différents domaines nécessaires à sa maturation : le peptide signal en N-terminal, le site ω d'ancrage GPI et la séquence hydrophobe en C-terminal. En dessous, la protéine mature avec une ancre GPI en C-terminal, les deux parties $\alpha 2$ et δ -4 clivées et reliées par un pont disulfure, les domaines fonctionnels dCache_1 (C1 et C2), du facteur A de von Willbrand (VWA) avec le motif MIDAS (Metal Ion Dependant Adhesion Site). En point noir les sites de N-glycosylation potentiels.

Expression tissulaire et physiologie

Dans le système nerveux central

La distribution tissulaire de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 reste encore un sujet d'étude en permanente évolution. La sous-unité $\alpha 2\delta$ -4 est initialement rapportée comme ayant une distribution très restreinte dans certains tissus endocriniens, et absente du cerveau. Cependant, une autre étude a montré une distribution plus ubiquitaire des transcrits *CACNA2D4* (Dolphin, 2013; Qin et al., 2002).

Introduction

L'étude de la distribution tissulaire de $\alpha 2\delta$ -4 met en évidence une expression dans la rétine, l'hypophyse, mais aussi dans le cervelet, l'hippocampe, le cortex occipital et le cortex somatosensoriel (Bacchi et al., 2015).

Des niveaux élevés de $\alpha 2\delta$ -4 sont observés dans les cellules photoréceptrices de la rétine. Elle joue un rôle crucial dans le maintien d'une synaptogenèse et d'une physiologie correcte des cônes et des bâtonnets. Des études ont également révélé une régulation de l'expression membranaire fonctionnelle des canaux Cav1.4 et de la transmission synaptique des bâtonnets.

Ainsi, le phénotype des souris Knock-Out (KO) *CACNA2D4*, par décalage du cadre de lecture dans l'exon 2, est la présence de défauts au niveau des synapses des photorécepteurs. Ces défauts incluent des anomalies structurales et fonctionnelles au niveau des bâtonnets et des cônes rétinien. Plus précisément, l'absence de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 entraîne une diminution de la densité des canaux Cav1.4 dans les terminaisons présynaptiques des photorécepteurs, ainsi que des défauts dans l'organisation synaptique. Ces altérations ont un impact sur la transmission synaptique et peuvent contribuer aux troubles de la vision observés chez les patients atteints de mutations sur le gène *CACNA2D4* (Bacchi et al., 2015; Kerov et al., 2018a).

Son rôle rétinien dans la synaptogenèse va aussi au-delà du canal calcique voltage-dépendant en régulant notamment la localisation du canal chlorure activé par le calcium, *TMEM16A* aussi appelé *ANO1*. Chez les souris mutantes portant un codon stop prématuré dans l'exon 26 pour la sous-unité $\alpha 2\delta 4$ du canal calcique, le canal chlorure n'est plus présent dans les terminaisons synaptiques des photorécepteurs, mais est délocalisé au niveau du corps cellulaire dans la couche nucléaire externe (Caputo et al., 2015). Ce canal *ANO1* joue aussi un rôle dans l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique en régulant négativement la libération du calcium par les canaux IP3R du réticulum endoplasmique. Ce rôle est lié à sa localisation intracellulaire dans la membrane du réticulum (Dayal et al., 2019; Yuan et al., 2022).

Dans le muscle squelettique

Les données sur la distribution tissulaire de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique sont contradictoires d'une étude à l'autre.

Introduction

Dans l'étude qui a permis le clonage et la caractérisation de *CACNA2D4*, le Northern blot sur des tissus humains a montré la présence d'ARNm de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -4 dans le muscle squelettique sans pour autant que la présence de la protéine soit investiguée (Qin et al., 2002).

Dans une seconde étude, Nabhani et al., 2005 ont examiné l'existence d'un transcrit $\alpha 2\delta$ -4 dans le muscle squelettique en travaillant sur des fibres isolées du soléus, muscle à majorité composé de fibres lentes de type I, de souris âgées de 30 jours et des myotubes de 6 jours. Les résultats n'ont pas montré de transcrits $\alpha 2\delta$ -4 dans les myotubes ou les fibres musculaires isolées du soléus. Cependant, le transcrit a été détecté dans le cerveau des mêmes animaux utilisés pour l'isolement des fibres musculaires.

Une troisième étude portant sur l'identification des mutations en lien avec la dystrophie des cônes réiniens, montre une expression ubiquitaire avec un transcrit trouvé sur différents tissus incluant le muscle squelettique (Katharina A. Wycisk et al., 2006).

Chez la souris KO *CACNA2DI*, générée pour étudier l'impact sur la fonction cardiaque, l'épileptogénèse et la nociception. L'étude par western blot de l'expression des différentes sous-unités $\alpha 2\delta$ dans le cerveau, le cœur et le muscle squelettique a montré qu'il n'y avait pas de phénomène de compensation dans l'expression des $\alpha 2\delta$. Mais l'étude a aussi montré, sur les western blots anti- $\alpha 2\delta$ -4, la présence de deux bandes aux poids moléculaires vers 100 kDa et 150 kDa dans le cerveau, pas de bandes dans le cœur et une bande vers 100 kDa dans le muscle squelettique (Fuller-Bicer et al., 2009).

Autres tissus

La sous-unité $\alpha 2\delta$ -4 est exprimée dans divers tissus humains, notamment dans l'intestin grêle, la glande surrénale, ainsi que certains types de cellules endocrines. Des études ont également montré une expression de cette sous-unité dans les cellules de Paneth de l'intestin grêle, les érythroblastes du foie fœtal et les cellules de la zone réticulaire de la glande surrénale. Ces résultats indiquent une expression différenciée de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -4 dans divers tissus humains (Qin et al., 2002).

Introduction

Régulation de l'expression de CACNA2D4

Des études montrent que l'expression dans le muscle squelettique chez la souris et l'homme pourrait être modulée par l'exercice physique et/ou le stress thermique. Ainsi, une étude chez la souris sur les modifications épigénétiques observées suite à une course forcée à des températures de 37,5°C, montre une expression accrue de gènes impliqués dans la structure musculaire, la régulation du calcium, la réponse au stress et la myogenèse. Parmi les gènes surexprimés on retrouve *CACNA2D4* (Murray et al., 2024).

Dans le cadre d'une autre étude, les participants atteints de polyarthrite rhumatoïde ont effectué des séances supervisées de marche sur tapis roulant trois fois par semaine pendant 10 semaines. Dans le contexte de l'étude, la voie de signalisation nNOS (oxyde nitrique synthase), impliquée dans la régulation de la fatigue musculaire et de la performance physique dans les cellules musculaires squelettiques, a été identifiée comme une voie canonique associée à des améliorations de la maladie après 10 semaines d'exercice. Parmi les gènes positivement régulés, il y a *CACNA1A*, *CACNA1C*, *CACNA1I* et *CACNA2D4*, dont l'expression est significativement augmentée (Andonian et al., 2021). Un lien entre le stress physique et l'expression de la sous-unité *CACNA2D4* semble donc se dessiner mais de plus amples investigations seront nécessaires pour mieux élucider les implications.

L'étude du transcriptome par RNA-seq sur le quadriceps d'un modèle murin *GAA^{-/-}* (Acide Alpha-Glucosidase) de la maladie de Pompe, une maladie métabolique héréditaire caractérisée par une accumulation de glycogène dans les muscles, des complications cardiaques, une atrophie musculaire progressive et une insuffisance respiratoire, a montré une régulation positive significative des sous-unités calciques de type L (*CACNG7*, *CACNA1C* et *CACNA2D4*) (J. Wang et al., 2021).

L'étude de l'impact d'un knock-out conditionnel du facteur de transcription *Pitx2*, impliqué dans le développement des muscles extra-oculaires (EOM), montre chez la souris KO une altération des voies de signalisation liées à la contraction musculaire telles que les protéines structurales comme la myoméline 2 et les canaux ioniques avec régulation négative de *CACNA2D4* (Zhou et al., 2012).

Introduction

Il a été montré dans certains cas physiopathologiques que l'expression de *CACNA2D4* était régulée. Le facteur de transcription Egr1 joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression de la sous-unité $\alpha 2\delta 4$ du canal calcique et d'autres sous-unités de canaux calciques dans l'épileptogénèse. Une étude démontre que Egr1 régule l'expression de la sous-unité $\alpha 2\delta 4$, qui est augmentée après un état de statut épileptique induit par la pilocarpine (van Loo et al., 2019).

Dans certaines conditions de carcinogénèse, *CACNA2D4* a été identifié comme étant un facteur de pronostique. Il semble jouer un rôle dans plusieurs types de cancer, notamment le cancer du foie, de l'ovaire, de la prostate, du pancréas, du poumon, du côlon, de l'estomac, du mélanome uvéal et de l'adénocarcinome de l'œsophage. Des études ont montré que l'expression accrue de *CACNA2D4* était associée à des résultats de survie améliorés chez les patients atteints de ces types de cancer. De plus, des recherches ont suggéré que *CACNA2D4* pourrait jouer un rôle dans la régulation de la sensibilité à la chimiothérapie dans le traitement de certains cancers, tels que le cancer de l'estomac et le carcinome épidermoïde de l'œsophage (Cutcliffe et al., 2021).

Physiopathologie

L'analyse des articles répertoriés sur NCBI, Google scholar et Mastermind contenant les mots clés *CACNA2D4*, *CA2D4*, Alpha2delta-4 ou $\alpha 2\delta 4$ a permis de recenser 16 papiers majeurs. Ainsi, la majorité des études concernent l'implication de *CACNA2D4* dans une pathologie rétinienne qui est la dystrophie des cônes et bâtonnets (**Tableau 2**).

Cette condition se caractérise par une dysfonction rétinienne distinctive, comprenant une acuité visuelle légèrement réduite, une photophobie et des réponses anormales à l'électrorétinogramme (ERG). Ainsi, chez les patients avec cette condition, de nombreuses mutations ont été identifiées.

La protéine $\alpha 2\delta 4$ joue un rôle crucial dans l'organisation et la fonction des synapses des photorécepteurs. Elle régule le développement et la fonction exocytotique mature des synapses des photorécepteurs. Son absence entraîne des défauts structuraux et fonctionnels au niveau des synapses des bâtonnets et des cônes rétiniens, notamment un manque de rubans et d'autres caractéristiques synaptiques.

Introduction

Tableau 2 : les sous-unités auxiliaires $\alpha 2\delta$

Gènes	Protéines	Expression tissulaire	Pathologies associées
<i>CACNA2D1</i>	$\alpha 2\delta$ -1	Muscle squelettique, lisse et cardiaque, SNC, SNP et tissus endocrines	Dysfonctionnement cardiaque, douleur neuropathique
<i>CACNA2D2</i>	$\alpha 2\delta$ -2	SNC spécialement dans le cervelet	Ataxie cérébrale, Epilepsie
<i>CACNA2D3</i>	$\alpha 2\delta$ -3	SNC et SNP	Autisme, régulation centrale de la douleur, surdité
<i>CACNA2D4</i>	$\alpha 2\delta$ -4	Rétine, tissus endocrines	Cécité nocturne, dystrophie rétinienne, rétinite pigmentaire

Introduction

De plus, l'absence de $\alpha 2\delta-4$ entraîne une diminution progressive des canaux Cav1.4, essentiels à la transmission synaptique. Ces résultats suggèrent que $\alpha 2\delta-4$ joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des synapses des bâtonnets et des cônes, dont la perturbation pourrait contribuer aux troubles de la vision observés chez les patients avec des mutations sur le gène *CACNA2D4* (Kerov et al., 2018b). Les mutations suivantes ont été mises en évidence chez des sujets avec une dystrophie rétinienne :

CACNA2D4 c.2406C>A, p.(Tyr802X) , ce qui est susceptible de conduire à une protéine tronquée manquant du domaine dCache_1 C-terminal et la partie δ , qui sont normalement situés en aval de cette position dans la séquence protéique (Katharina Agnes Wycisk et al., 2006).

La délétion homozygote des exons 17 – 26 a été identifiée chez deux patients. Ces mutations entraînent un phénotype impliquant principalement les voies des cônes, avec une implication minimale ou nulle du système des bâtonnets (Ba-Abbad et al., 2016).

Cette même délétion des exons 17 - 26 du gène *CACNA2D4* a été identifiée chez des patients atteints de troubles bipolaires tardifs, ainsi que chez des patients atteints de troubles du spectre autistique (ASD) et de troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (ADHD). Cette délétion a été associée à des troubles psychiatriques, en particulier au trouble bipolaire, et pourrait jouer un rôle dans la susceptibilité à ces maladies (Van Den Bossche et al., 2012).

La régulation des flux des ions Ca^{2+} dans les photorécepteurs a été étudiée dans un modèle murin de dystrophie rétinienne portant un codon stop dans l'exon 26. La mutation a plusieurs effets sur la régulation du calcium dans les photorécepteurs de souris.

Tout d'abord, elle réduit les courants entrants à travers les canaux calciques voltage-dépendants (VGCC) Cav1.4 des bâtonnets de souris. Cela se traduit par une réduction de l'amplitude des courants entrants et un décalage vers la droite de leur activation par rapport aux bâtonnets normaux. De plus, la mutation entraîne une réduction significative du contenu en calcium des réserves internes, ce qui entraîne une régulation à la hausse de l'entrée calcique via des canaux cationiques non sélectifs (CSC) distincts des VGCC. Ces effets révèlent un impact de la mutation sur l'homéostasie du calcium et suggèrent une nouvelle stratégie potentielle pour

Introduction

contrer les mécanismes pathogènes impliqués dans la dégénérescence des bâtonnets (Vellani et al., 2022).

Toujours au niveau rétinien, des mutations sur *CACNA2D4* ont été identifiées chez une famille chinoise atteinte de rétinite pigmentaire. Deux nouvelles mutations hétérozygotes composées, c.G955A p.(Asp319Asn) et c.A1822C p.(Ile608Leu), ont été identifiées et associées à la phénotype clinique du patient (Cheng et al., 2021) (**Tableau 3**).

Introduction

Tableau 3 : Tableau génétique de mutations sur *CACNA2D4*

Mutation	Pathologie Associée	Description de l'Effet de la Mutation	Référence
CACNA2D4 c.2406C>A, p.Y802X	Dystrophie rétinienne	Protéine tronquée manquant des domaines Cache_1 C-terminal et la partie δ , affectant la fonction protéique.	Katharina Agnes Wycisk et al., 2006
Délétion homozygote des exons 17 – 26	Dystrophie rétinienne (voies des cônes)	Implique principalement les voies des cônes avec une implication minimale du système des bâtonnets.	Ba-Abbad et al., 2016
Délétion homozygote des exons 17 – 26	Troubles bipolaires, ASD, ADHD	Associée à des troubles psychiatriques et pourrait jouer un rôle dans la susceptibilité à ces maladies.	Van Den Bossche et al., 2012
Codon stop dans l'exon 26 (modèle murin)	Dystrophie rétinienne (modèle murin)	Réduit les courants entrants VGCC Cav1.4, baisse du contenu en calcium des réserves, impact sur l'homéostasie du calcium.	Vellani et al., 2022
c.G955A (p.D319N) et c.A1822C (p.I608L)	Rétinite pigmentaire	Mutations hétérozygotes composées associées au phénotype clinique de la rétinite pigmentaire.	Cheng et al., 2021

Introduction

Phénotype de la souris KO CACNA2D4

L'étude des phénotypes comportementaux de la souris KO *CACNA2D4*, portant un codon stop dans l'exon 2, montre un rôle important dans la régulation du comportement locomoteur et des fonctions affectives, et montre que son absence peut contribuer à des traits comportementaux associés à des troubles neuropsychiatriques et neurodéveloppementaux.

Ces souris présentent un ensemble de phénotypes comportementaux distinctifs. Voici une description de ces phénotypes (Klomp et al., 2022) :

Hyperactivité : Les souris KO ont montré une hyperactivité dans divers tests, se déplaçant sur des distances significativement plus grandes que les souris sauvages (WT) dans l'open field test (OFT).

Déficits en coordination motrice : Les souris KO ont présenté une coordination motrice altérée, comme l'indique leur temps de chute plus court dans le test de la rotarod, un test qui mesure l'équilibre, la coordination, et la planification motrice.

Comportement anxiolytique : Les souris KO ont passé plus de temps dans les espaces ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevée et dans la chambre éclairée du test de la boîte claire/obscur, ce qui suggère une diminution des comportements d'anxiété par rapport aux souris WT.

Phénotype antidépresseur : Dans le test de suspension caudale, les souris KO ont passé moins de temps immobiles que les souris WT, indiquant un comportement moins dépressif.

Vision normale en conditions de lumière du jour : Bien que les souris KO soient aveugles sous des conditions de faible luminosité à cause de la dystrophie des cônes et bâtonnets, elles ont une vision normale dans des conditions de lumière du jour, ce qui suggère que les déficits comportementaux observés ne sont pas dus à une déficience visuelle.

Aucune différence dans le poids corporel

Introduction

2. Le récepteur de la ryanodine 1 (RyR1)

a) Structure

La protéine RyR1 est un canal calcique situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires. Elle est constituée de 5038 acides aminés et partage environ 60 à 70% d'identité avec les isoformes RyR2 et RyR3. La protéine RyR1 forme un tétramère, dont la structure a été partiellement résolue par microscopie électronique cryogénique. Elle est composée de plusieurs domaines fonctionnels, notamment des domaines qui permettent l'interaction avec le récepteur à la dihydropyridine par un ratio stœchiométrique (tétramère RyR1/Cacna1S) entre 0,571 et 0,714 (Eckhardt et al., 2023). Elle interagit avec des protéines régulatrices du complexe de relâchement du calcium (CRC) telles que la calmoduline et la FKBP12. La majeure partie de la séquence de RyR1 est cytosolique et forme les "pieds" caractéristiques observés en microscopie électronique. Le domaine C-terminal de la protéine contient 6 hélices transmembranaires responsables de l'ancrage à la membrane du réticulum sarcoplasmique et forme le canal. Des études récentes ont permis de cristalliser des parties du canal et d'identifier leur structure à résolution atomique (Weiss and Koschak, 2014) (**Figure 6**).

Elle est composée des domaines N-terminal A et B (NTD-A et NTD-B), le domaine solénoïde NH2-terminal (Nsol), les domaines SPRY 1-3, le domaine solénoïde jonctionnel (Jsol), le domaine solénoïde de liaison (Bsol), le domaine solénoïde central (Csol), le domaine EF-hand (EF), la région divergente 1 (DR1), le domaine pseudo-sensoriel de tension (pVSD), le domaine transmembranaire (TMD), le domaine à doigt de Zn et le domaine C-terminal (CTD). Ces domaines sont impliqués dans la détection et la réponse aux signaux de calcium, la médiation de l'ouverture des canaux et l'interaction avec des protéines et des ligands régulateurs (Woll and Van Petegem, 2022).

Introduction

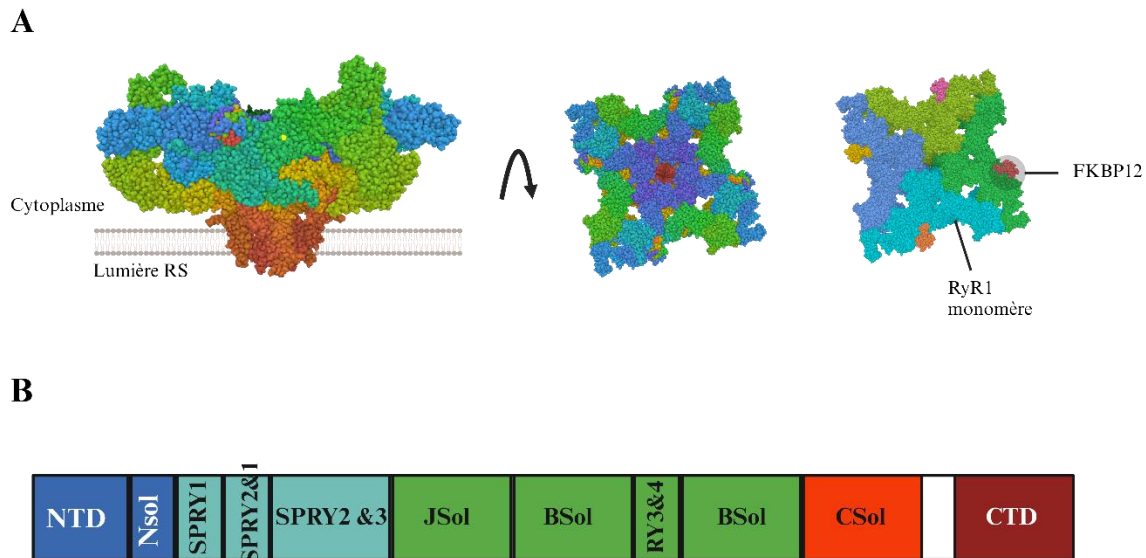


Figure 6 : Représentation des domaines de la protéine RyR1. **A.** Structure Cryo-EM de RyR1 humain sous forme tétramérique en état ouvert de 3.49 Å. Les domaines fonctionnels de chaque monomère sont en couleurs en adéquation avec la représentation schématique en dessous. **B.** Représentation schématique d'un monomère avec les différents domaines fonctionnels décrits ci-dessus.

b) Modulateurs non protéiques de RyR1

Les modulateurs qui influencent l'activité des récepteurs à la ryanodine (RyR) comprennent une variété de molécules et de protéines qui peuvent soit renforcer soit inhiber l'activité du canal. Certains de ces modulateurs sont des petites molécules telles que le 4-CmC (4-chloro-m-cresol), la caféine, le NO (oxyde nitrique), la ryanodine, le dantrolène ou encore l'isoflurane. Ce rôle est aussi dévolu aux ions calciques, au magnésium, les ions phosphate ou encore l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Ces modulateurs peuvent agir de manière complexe, parfois en fonction de la concentration de calcium cytosolique ou des niveaux de calcium dans la lumière du réticulum. Certains modulateurs peuvent avoir des effets différents en fonction de leur concentration, ce qui ajoute à la complexité de la régulation de l'activité des récepteurs à la ryanodine. L'augmentation au niveau sarcoplasmique du calcium a un effet activateur sur le canal RyR1, on parle de rétroaction positive ou CICR (Calcium Induce Calcium Release). Ce mécanisme est souvent associé au fonctionnement de RyR2 dans le muscle cardiaque. Une autre molécule à effet activateur, c'est l'ATP qui lors de la contraction musculaire permet une libération en continu de calcium en se fixant sur des sites spécifiques du canal. Pour ce qui est

Introduction

des inhibiteurs de RyR1, le magnésium joue un rôle important dans le maintien d'une concentration basale de calcium dans le sarcoplasme mais aussi pour éviter une suractivité du canal RyR1 responsable de pathologies comme l'hyperthermie maligne per-anesthésique (Woll and Van Petegem, 2022).

Les ligands calcium et ATP modulent l'activité du canal RyR1 de manière complexe. Le calcium (Ca^{2+}) agit sur le RyR1 à la fois comme activateur et comme inhibiteur, suivant sa concentration. À des concentrations basses (micromolaires), le calcium active le canal RyR1, augmentant sa probabilité d'ouverture (P_o) et donc la libération de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique vers le cytosol, ce qui est essentiel pour la contraction musculaire. À des concentrations plus élevées (millimolaires), le calcium inhibe le canal, réduisant ainsi sa probabilité d'ouverture. L'ATP est un puissant activateur du RyR1. Des concentrations millimolaires d'ATP augmentent l'activation dépendante du calcium du RyR1, se manifestant par une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal. L'ATP se lie à des sites spécifiques sur le RyR1, et des mutations dans ces sites de liaison peuvent affecter la capacité de l'ATP à activer le canal. Par exemple, la mutation de résidus qui interagissent avec l'anneau adénine de l'ATP peut réduire ou abolir la liaison de l'ATP au canal, tandis que la mutation de résidus qui interagissent avec la queue triphosphate de l'ATP peut affecter le degré d'activation (Yuan et al., 2021).

c) Les protéines modulatrices de RyR1

La protéine RyR1 interagit avec plusieurs protéines régulatrices qui jouent un rôle crucial dans la régulation de la libération de calcium et le fonctionnement du canal calcique. Parmi ces protéines, on trouve la calmoduline, la calséquestrine, la FKBP12, la triadine et la junctine.

La calmoduline

La calmoduline (CaM) est une petite protéine de liaison au calcium qui joue un rôle crucial dans la régulation du récepteur de la ryanodine 1 (RyR1) dans les muscles squelettiques. La CaM interagit avec le récepteur RyR1, par les domaines N-terminal (NTD) et SPRY1/3, dans le muscle squelettique de plusieurs manières. Des études ont montré que la CaM se lie à un site par sous-unité de RyR1 (4 par tétramère) et protège RyR1 du clivage protéolytique. De plus, la CaM a été démontrée pour moduler l'activité de RyR1 de manière complexe, avec des effets

Introduction

inhibiteurs à des concentrations de Ca^{2+} nanomolaires et des effets activateurs à des concentrations de Ca^{2+} micromolaires (Prosser et al., 2011). La liaison de CaM à RyR1 peut induire des changements de conformation dans le canal, ce qui peut affecter sa fonction. De plus, la liaison de la CaM à RyR1 peut être influencée par des facteurs tels que l'oxydation (Rodney et al., 2000).

FKBP12 (FK506-binding proteins 12)

FKBP (protéine de liaison au FK506) est une famille de protéines connues pour interagir avec le récepteur de la ryanodine (RyR1) et moduler son activité. Plus précisément, FKBP12, un membre de la famille FKBP, a été montré jouer un rôle crucial dans la stabilisation du complexe du canal RyR1. Cette interaction est importante pour réguler la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique et est impliquée dans divers troubles musculaires, y compris l'hyperthermie maligne et les dystrophies musculaires (Hernández-Ochoa et al., 2016). FKBP12 est une protéine qui a été montrée pour stabiliser l'état fermé de RyR1, empêchant ainsi les fuites de calcium du réticulum sarcoplasmique (Gong et al., 2021).

L'interaction FKBP12-RyR1 a été une cible de thérapies pharmacologiques. Des petites molécules appelées "Rycals" ont été développées pour stabiliser l'interaction FKBP12-RyR1, réduisant ainsi les fuites de calcium et améliorant la contractilité musculaire dans des études précliniques (Hernández-Ochoa et al., 2016).

Calséquestrine

La calséquestrine (CASQ) est une protéine majeure de tamponnage du calcium intracellulaire située dans le réticulum sarcoplasmique (RS). Il existe deux gènes codant pour la CASQ : la CASQ de type 1 (*CASQ1*) exprimée dans le muscle squelettique et la CASQ de type 2 (*CASQ2*) exprimée dans le muscle cardiaque et à des niveaux faibles dans le muscle squelettique à contraction lente. En plus de sa fonction de tamponnage du calcium, la CASQ forme des oligomères dans la lumière du RS et interagit avec les protéines d'ancrage du récepteur de la ryanodine (RyR), junctine et triadine, intégrées dans la membrane du RS. Ensemble, ces trois protéines semblent réguler l'activité des RyR. Les détails moléculaires sous-jacents à ces interactions n'ont pas encore été élucidés, que ce soit dans le muscle squelettique ou cardiaque.

Introduction

En outre, la *CASQ1* et la *CASQ2* semblent avoir des propriétés spécifiques à chaque isoforme dans le muscle squelettique et cardiaque, affectant l'activation des RyR. En résumé, la calséquestrine joue un rôle crucial dans le tamponnage du calcium intracellulaire et la régulation de l'activité des récepteurs de la ryanodine dans les muscles squelettique et cardiaque (Lanner et al., 2010). Des variants de *CASQ1* ont été identifiés chez des personnes atteintes d'hyperthermie maligne peranesthésique (HM) (Protasi et al., 2009).

Triadine/junctine

Triadine et junctine sont des protéines qui interagissent avec le récepteur de la ryanodine (RyR1) et jouent un rôle essentiel dans la régulation de la libération de calcium dans le muscle squelettique. Triadine et junctine s'insèrent tous deux dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) et ont de courts domaines cytoplasmiques qui interagissent avec le "piéd" cytoplasmique de RyR1. Dans la lumière du RS, leurs longs domaines C-terminaux se lient à la calséquestrine (*CASQ1*) et au domaine luminal de RyR1. Ces interactions influencent l'activité de RyR1 et modulent la libération de calcium pendant la contraction musculaire. Triadine et junctine ont été trouvées pour avoir un impact sur la structure du réticulum sarcoplasmique et l'organisation des microtubules, et elles peuvent former des polymères qui peuvent déformer la membrane du RS pour rapprocher RyR1 du DHPR. Des mutations ou des knock-out de triadine et junctine ont été associés à des myopathies, indiquant leurs rôles essentiels dans le maintien d'une fonction musculaire normale. La junctine et la triadine interagissent avec la calséquestrine maintenant le calcium à proximité du canal RyR1 (Dulhunty et al., 2017).

Stac3

Le gène *STAC3* de 7 736 pb sur le chromosome 12q13.3 code pour la protéine adaptatrice Stac3. Les domaines fonctionnels de la protéine comprennent un domaine riche en cystéine C1 similaire à la protéine kinase C (PKC C1) et deux domaines d'homologie Src 3, SH3 (SH3_1 et SH3_2), situés à l'extrémité C-terminale, collectivement appelés les domaines SH3 en tandem. Ces domaines SH3 ont été identifiés comme étant cruciaux pour les interactions de la protéine avec la boucle entre les domaines répétés homologues II-III de Cav1.1 dans le muscle squelettique. Les résidus d'acides aminés glutamate-thréonine-leucine (ETL) de la région C1

Introduction

sont aussi essentiels dans cette interaction. La séquence C-terminale du Cav1.1 impliquée dans l'interaction avec Stac3 est un peptide de 30 acides aminés, également appelé peptide C3, situé entre les résidus 735 et 765 de la boucle II-III de Cav1.1 (Campiglio and Flucher, 2017; Shishmarev et al., 2022).

Stac3 joue un rôle direct dans le couplage conformationnel entre Cav1.1 et RyR1, ce qui est crucial pour le couplage excitation-contraction (EC) mais également dans la stabilité membranaire de Cav1.1. La conséquence d'une invalidation du gène *STAC3* est une diminution significative du couplage EC et de la libération de Ca^{2+} (Polster et al., 2016).

Stac3 est aussi impliqué dans la modulation des propriétés des courants calciques de type L (LTCC) générés par le canal calcique Cav1.1. L'altération de l'interaction entre Stac3 et Cav1.1 par la mutation des résidus ETL en AAA (Alanine) du domaine C1 entraîne une réduction significative de l'amplitude des courants calciques et une accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation des courants Cav1.1. Ces résultats suggèrent que Stac3 détermine les cinétiques lentes des courants calciques de Cav1.1 et inhibe spécifiquement l'inactivation dépendante du voltage (VDI) des courants calciques de Cav1.1 (Tuinte et al., 2022).

Des mutations du gène *STAC3* ont été associées à la myopathie des natifs amérindiens (NAM). La myopathie amérindienne est une maladie génétique autosomique récessive rare, précédemment observée chez les indiens Lumbee, caractérisée par une faiblesse musculaire congénitale, une hypotonie, un visage myopathique, un palais fendu, une petite taille, une scoliose et une susceptibilité à l'hyperthermie maligne. Les patients atteints de NAM présentent un risque relativement élevé d'hyperthermie maligne peranesthésique s'ils sont exposés à une anesthésie halogénée déclenchante, avec un taux de mortalité de 21% pendant la période néonatale et un taux de mortalité global de 36% principalement attribuable à l'hyperthermie maligne peranesthésique (Grzybowski et al., 2017; Telegrafi et al., 2017). La mutation associée à la myopathie amérindienne est une mutation homozygote c.851G>C (p.Trp284Ser) dans le domaine SH3_1 de Stac3 initialement identifiée chez les Lumbee (Zaharieva et al., 2018). Des cas impliquant des patients non amérindiens ont été signalés avec des mutations hétérozygotes composées dans le gène *STAC3* (c.862A>T et c.432+4A>T), (c.851G>C et c.763_766delCTCT) et (c.997-1G>T et c.851G>C) (Grzybowski et al., 2017; Telegrafi et al.,

Introduction

2017; Zaharieva et al., 2018). Ces mutations ont pour conséquence l'altération du couplage EC avec une réduction de la libération de Ca^{2+} par le canal RyR1.

d) Pathologies

Les mutations du gène *RYR1* sont associées à plusieurs implications dans les pathologies musculaires. Elles sont liées à deux classes de pathologies : celles déclenchées par des stimuli externes et les myopathies congénitales. Ces dernières comprennent la myopathie à cores (cores centraux (CCD), multiminicore (MmD)), la myopathie centronucléaire (CNM), la myopathie à bâtonnets et la disproportion congénitale des types de fibres (CFTD). Celles déclenchées par des stimuli externes concernent l'hyperthermie maligne ou encore la rhabdomyolyse d'effort. Les mécanismes pathophysiologiques associés à ces mutations comprennent des altérations de la fonction de RyR1, telles que les gains de fonction et les pertes de fonction, ainsi que des réductions de la quantité de RyR1 exprimée dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ces mutations peuvent également entraîner une altération du couplage excitation-contraction (ECC) et une dérégulation de la libération calcique, ce qui conduit à une faiblesse musculaire. En outre, les mutations de RyR1 peuvent également avoir un impact sur la fonction neuronale. (Weiss and Koschak, 2014).

III. Les pathologies du Complexe de Relâchement du Calcium

A. Les myopathies

Les myopathies du complexe de relâchement du calcium (CRC) dans le muscle squelettique sont liées à des défauts dans les voies de signalisation et la régulation du calcium intracellulaire, essentielles à la contraction et à la relaxation musculaire. Bien que l'on puisse identifier un grand nombre de conditions impliquant un défaut dans le métabolisme du calcium musculaire, voici une liste des principales myopathies directement liées aux altérations du complexe de relâchement du calcium (**Tableau 4**) :

- **Myopathies congénitales liées au récepteur de la ryanodine 1 (RyR1) :**

Myopathie centronucléaire (CNM) : La myopathie centronucléaire est une maladie musculaire héréditaire rare caractérisée par des noyaux placés en rangées dans la partie centrale des fibres musculaires. Elle se présente sous trois formes principales selon le mode d'hérédité

Introduction

et la présentation clinique : récessive liée à l'X, autosomique récessive et sporadique. Les patients atteints présentent une faiblesse musculaire distale des membres supérieurs et inférieurs. La maladie évolue lentement et peut être associée à une altération cognitive, une polyneuropathie axonale et une ophtalmoparésie. D'autres mutations sur les gènes *DNM2*, *BINI*, *RYR1* et *MTM1* ont été identifiées comme des causes possibles de la myopathie centronucléaire (Echaniz-Laguna et al., 2013).

Myopathie multiminicores (MmD) : La MmD, ou maladie multiminicore, est un type de myopathie centrale caractérisée par la présence de multiples petits cores au sein des fibres musculaires, qui sont des zones dépourvues d'activité oxydative. Elle est principalement causée par des mutations dans le gène de la sélénoprotéine (*SEPN1*), impliquée dans la régulation du stress oxydatif et nitrosatif dans les cellules musculaires, et est généralement transmise comme un trait autosomique récessif. Les cores dans la MmD sont plus petits et multiples, s'étendent le long d'une portion limitée de la fibre musculaire. Le spectre phénotypique de la MmD est assez diversifié, et elle peut être associée à une insuffisance respiratoire, une scoliose et une hyperlaxité articulaire distale chez les patients adultes.

Introduction

Tableau 4 : Les pathologies du complexe de relâchement du calcium

Myopathie	Gène(s) Impliqué(s)	Caractéristique Principale
Myopathie centronucléaire (CNM)	RYR1, DNM2, BIN1	Présence de noyaux centraux dans les fibres musculaires
Myopathie multi-minicores (MmD)	RYR1, SELENON	Petites zones désorganisées dans les fibres musculaires
Myopathie centrale core (CCD)	RYR1	Zones centrales non réactives à l'oxydase dans les fibres musculaires
Myopathie avec susceptibilité à l'hyperthermie maligne (MH)	RYR1, CACNA1S	Réaction potentiellement mortelle à certains anesthésiques
Myopathie tubulaire agrégée	STAC3, TRDN	Agglomérats tubulaires anormaux dans les fibres musculaires
Myopathie vacuolaire à dépôts de calsequestrine	CASQ1	Accumulation de calsequestrine dans les fibres musculaires, formant des vacuoles
Myopathie hypokaliémique périodique	CACNA1S, SCN4A	Paralysie ou faiblesse musculaire périodique, souvent déclenchée par le froid ou le repos après exercice

Introduction

De plus, les patients atteints de MmD peuvent être susceptibles à l'hyperthermie maligne, ce qui est d'une grande importance clinique (Papadimas et al., 2020).

Myopathie à cores centraux (CCD) : La maladie du noyau central (CCD) est une maladie musculaire caractérisée par une hypotonie congénitale, un développement moteur retardé dans l'enfance et une progression progressive vers une faiblesse des muscles proximaux des jambes. Elle est associée à des présentations histologiques telles que des "noyaux" sans activités oxydatives et phosphorylantes dans la partie centrale de la fibre musculaire.

De plus, des mutations dans d'autres gènes tels que *SEPNI* et *MTMI* peuvent également être associées au CCD. Les mécanismes pathophysiologiques des myopathies centronucléaires, y compris la CCD, sont complexes et impliquent des mutations dans divers gènes codant pour la myotubularine (*MTMI*), la dynamine (*DNM2*), l'amphiphysine 2 (*BINI*) et RyR1 (Marty and Fauré, 2016).

Myopathie avec susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique (MH) discutée plus amplement dans les chapitres suivants.

- **Myopathies associées aux défauts de la calséquestrine (*CASQ1*)** : Myopathie vacuolaire à dépôts de calséquestrine liée à la mutation spécifique p.(Asp244Gly) sur le gène codant pour la calséquestrine 1 (*CASQ1*). Cette mutation chez la souris, similaire à une mutation humaine liée à la même maladie, entraîne une myopathie progressive caractérisée par une activité réduite, une force musculaire diminuée et un faible poids corporel après un an. La mutation provoque une dissociation partielle du *CASQ1* du réticulum sarcoplasmique (RS) et son accumulation dans le réticulum endoplasmique (RE), réduisant la libération de Ca^{2+} du RS. Les souris âgées portant la mutation montrent un stress, une expansion du RE, une signalisation mTOR augmentée, une élimination inadéquate des protéines agrégées par les protéasomes, et une augmentation des agrégats protéiques et des lysosomes. L'étude suggère que la myopathie associée à la mutation est causée par une altération de la localisation du *CASQ1*, une libération réduite de Ca^{2+} du RS, le mauvais repliement/agrégation du *CASQ1* et le stress dans l'RE. L'augmentation non contrôlée de la synthèse des protéines et la diminution de la clairance des agrégats contribueraient à la progression de la maladie (Hanna et al., 2021).

Introduction

- **Myopathies liées aux canaux calciques voltage-dépendants (Cav1.1) :** Myopathie hypokaliémique périodique (hypoPP).

L'hypoPP est à 60 % liée à des mutations sur *CACNA1S* (Cav1.1) (hypoPP1) et 20 % à des mutations des canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.4 (hypoPP2). Chez les sujets HypoPP, les fibres musculaires montrent une dépolarisation prolongée paradoxale à l'état de repos due à un taux faible de potassium K^+ extracellulaire, entraînant l'inexcitabilité membranaire et l'inactivation des canaux sodiques. Les mutations sur *CACNA1S* sont majoritairement localisées sur le segment S4 des domaines II, III et IV avec substitution de la première ou seconde arginine par une histidine, sérine ou glycine. Cela entraîne la création d'un canal accessoire et une fuite d'ions cationiques inactivant les canaux sodiques. Sur des fibres provenant d'un modèle murin d'HypoPP1 porteur de la mutation p.(Arg528His) sur Cav1.1, il a été observé un faible courant cationique anormal entrant au potentiel de repos (Allard, 2018; Zamponi et al., 2015).

- **Myopathies liées à d'autres protéines du complexe de relâchement du calcium :**

Myopathies avec défauts dans les protéines associées au RyR1, telles que les protéines de liaison, la triadine et à la junctine, ou encore Stac3 qui peuvent affecter indirectement l'homéostasie et le métabolisme calcique. Ainsi, par exemple les gènes tels que *STIM1*, *ORAI1* et *STAC3* sont impliqués dans la myopathie tubulaire agrégée (MTA), une maladie neuromusculaire rare caractérisée par l'accumulation de structures tubulaires anormales dans les fibres musculaires. Elle se présente cliniquement par une faiblesse musculaire progressive, qui peut varier en termes de sévérité et de muscles affectés. La myopathie tubulaire agrégée peut être diagnostiquée à tout âge, de la naissance à l'âge adulte (Marty and Fauré, 2016).

Il est important de noter que les symptômes et les manifestations de ces myopathies peuvent varier considérablement en termes de gravité et en présentation clinique, même parmi les individus atteints de mutations dans le même gène. De plus, les mécanismes précis par lesquels ces mutations affectent le relâchement du calcium et conduisent à des myopathies ne sont pas toujours bien compris, et la recherche est en cours pour mieux comprendre ces troubles et pour développer des traitements efficaces.

Introduction

B. Les pathologies déclenchées

1. La thermorégulation

La thermorégulation est le processus par lequel les organismes maintiennent une température corporelle interne relativement constante. Elle est essentielle à la survie et implique des mécanismes complexes qui contrôlent la production de chaleur (thermogenèse) et les pertes de chaleur (thermolyse). Les humains et les autres mammifères sont endothermes, ce qui signifie qu'ils utilisent la thermorégulation pour maintenir une température interne constante même lorsque l'environnement extérieur change (Appenzeller, J. Lamotte, A. Coon, 2022). La thermorégulation permet le maintien d'un équilibre entre la thermolyse et la thermogenèse.

La thermolyse est l'ensemble des mécanismes permettant de dissiper la chaleur par rayonnement, conduction, convection et évaporation (**Figure 7**). La thermogenèse tient surtout de l'accélération du métabolisme cellulaire comme pendant un exercice physique ou la résultante de l'exposition à certaines molécules chimiques telles que l'alcool ou à des micro-organismes. Mais aussi cela peut être la conséquence de l'environnement dans lequel le corps se trouve comme durant les périodes de fortes chaleurs. Dans un contexte normal, de cet équilibre résulte la température centrale du corps, 37°C, mais en situation pathologique la rupture de cette balance mène aux hyperthermies dites déclenchées ou les maladies liées à la chaleur.

Le centre de thermorégulation hypothalamique, situé dans la zone pré-optique, gère la température centrale et sert de thermostat du corps. Les thermocenseurs, constitués en majeure partie par les canaux à potentiel récepteur transitoire (TRP), informent la zone pré-optique de l'hypothalamus, qui active ensuite les mécanismes de régulation pour augmenter ou diminuer la température corporelle et la ramener à la ligne de base qui est entre 36.7°C et 37.5°C. (Bouchama et al., 2022; Osilla et al., 2023).

La thermorégulation implique l'activation de canaux spécifiques dans la voie thermosensorielle. Les canaux TRP, tels que TRPV1, TRPM8 et TRPA1, sont connus pour être activés par les changements de température et donc jouent un rôle dans la détection des stimuli chauds et froids (Bouchama et al., 2022).

Introduction

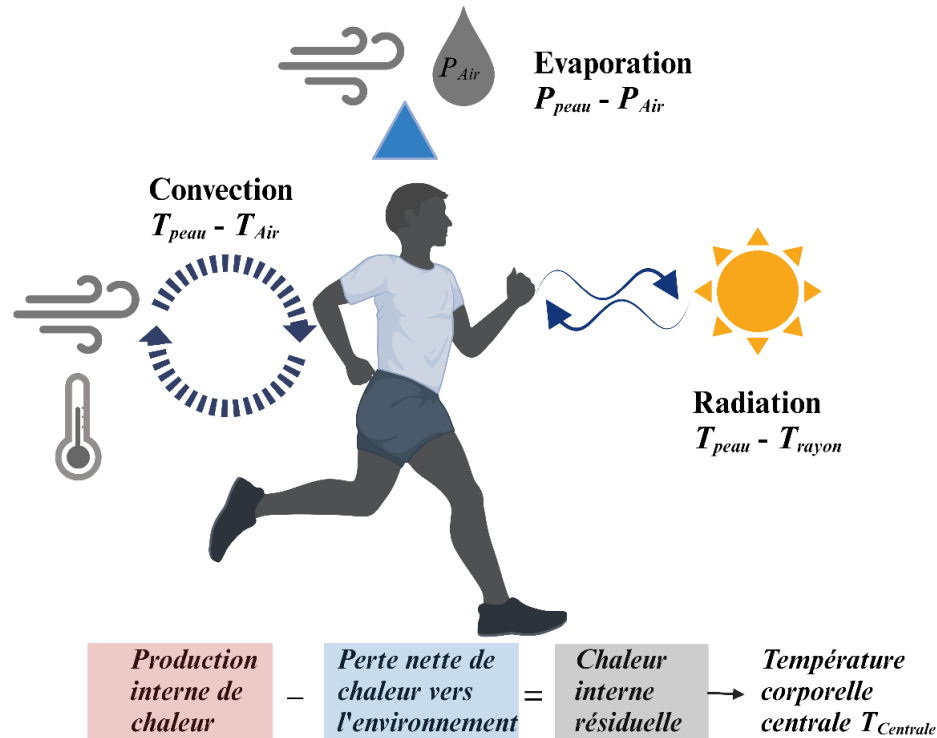


Figure 7 : Principes fondamentaux de la thermorégulation. La chaleur métabolique est transférée vers la circulation systémique puis vers la peau où elle est dissipée vers l'environnement par les mécanismes de conduction, convection, radiation et/ou l'évaporation. Les pertes par conduction sont négligeables. Convection : La chaleur est transférée de la peau (T_{peau}) à l'air (T_{Air}), et ce processus est modifié par la vitesse du vent. Évaporation : La perte de chaleur se fait par évaporation, où la pression de vapeur de la peau (P_{peau}) est supérieure à celle de l'air (P_{Air}). Radiation : La chaleur est également perdue par rayonnement de la peau (T_{peau}) vers l'environnement (T_{rayon}). Lorsque les T_{Air} et T_{rayon} excèdent la température au niveau de la peau T_{peau} , ces mécanismes peuvent être des sources de gain de chaleur (adaptée de Bouchama et al., 2022).

Le TRPV1 est activé par la chaleur, seuil d'activation à 42°C, et contribue à la sensation de chaleur, tandis que le TRPM8 est activé par le froid, vers 5°C, et contribue à la sensation de fraîcheur. Le TRPA1 est activé par des stimuli chauds et froids et participe à la détection des températures nocives. D'autres canaux, tels que les canaux sodiques voltage-dépendants et les canaux potassiques, peuvent également jouer un rôle dans la thermorégulation (Nakamura, 2011; Nakamura and Morrison, 2008).

Le circuit de la thermorégulation se compose donc de la moelle épinière, du système cortical somatosensoriel, le thalamus et l'aire pré-optique de l'hypothalamus (Bouchama et al., 2022). Chez l'homme, la thermorégulation est un processus physiologique complexe qui implique des mécanismes réflexes et comportementaux.

Introduction

La thermorégulation comportementale, quant à elle, repose sur des décisions volontaires et implique la perception du confort thermique, et les décisions de l'individu de gagner ou de perdre de la chaleur (Dávila, 2014). Les réponses thermorégulatrices varient pour conserver ou dissiper la chaleur dans divers environnements, tels que les environnements froids, thermo-neutres et chauds (Charkoudian, 2016). Cette réponse passe par le cortex somatosensoriel primaire suite à la détection de la température périphérique (**Figure 8**) (Bouchama et al., 2022).

La thermorégulation réflexe ou autonome utilise des thermorécepteurs pour détecter la température centrale du corps et échappe au contrôle volontaire. L'aire pré-optique hypothalamique intègre les informations et envoie des signaux aux effecteurs pour conserver ou dissiper l'énergie thermique. Cette réponse consiste à augmenter le flux sanguin vers la peau avec une vasodilatation des vaisseaux permettant les échanges avec l'environnement, une augmentation du débit cardiaque et l'initiation de la sudation par le système cholinergique (Bouchama et al., 2022; Osilla et al., 2023) (**Figure 8**).

Les échanges de la peau avec l'environnement se font par rayonnement (transfert d'énergie thermique par rayonnement électromagnétique entre le corps et son environnement, dont on a au premier plan le rayonnement solaire), conduction (l'échange thermique qui s'opère entre deux corps en contact physique statique), convection (transfert d'énergie thermique par le mouvement de fluides tels que l'air ou l'eau) et évaporation (mécanisme en lien avec la sudation). Environ, 60 % de la perte totale de chaleur corporelle est fait par le biais du rayonnement, 15% par convection en état de sédentarité (Lim, 2020; Osilla et al., 2023).

La sudation est un mécanisme important de perte de chaleur, soit 80% de la dissipation de la chaleur lors d'un exercice physique. Les glandes sudoripares produisent de la sueur et la libèrent à la surface de la peau lorsque la température corporelle augmente. La sueur se refroidit au fur et à mesure qu'elle s'évapore, absorbant la chaleur du corps. Il est important de noter néanmoins que c'est un échange unidirectionnel, mais surtout qui dépend du taux d'humidité environnant. Ainsi, une humidité trop élevée ne permet que très peu de dissipation de chaleur. Lors d'un exercice physique prolongé, cette perte de fluide pouvant atteindre 3.5 L/h et si elle n'est pas compensée peut aboutir à une réduction du débit cardiaque entraînant une réduction

Introduction

de la sudation (Appenzeller, J. Lamotte, A. Coon, 2022; Lim, 2020; Lim et al., 2008).

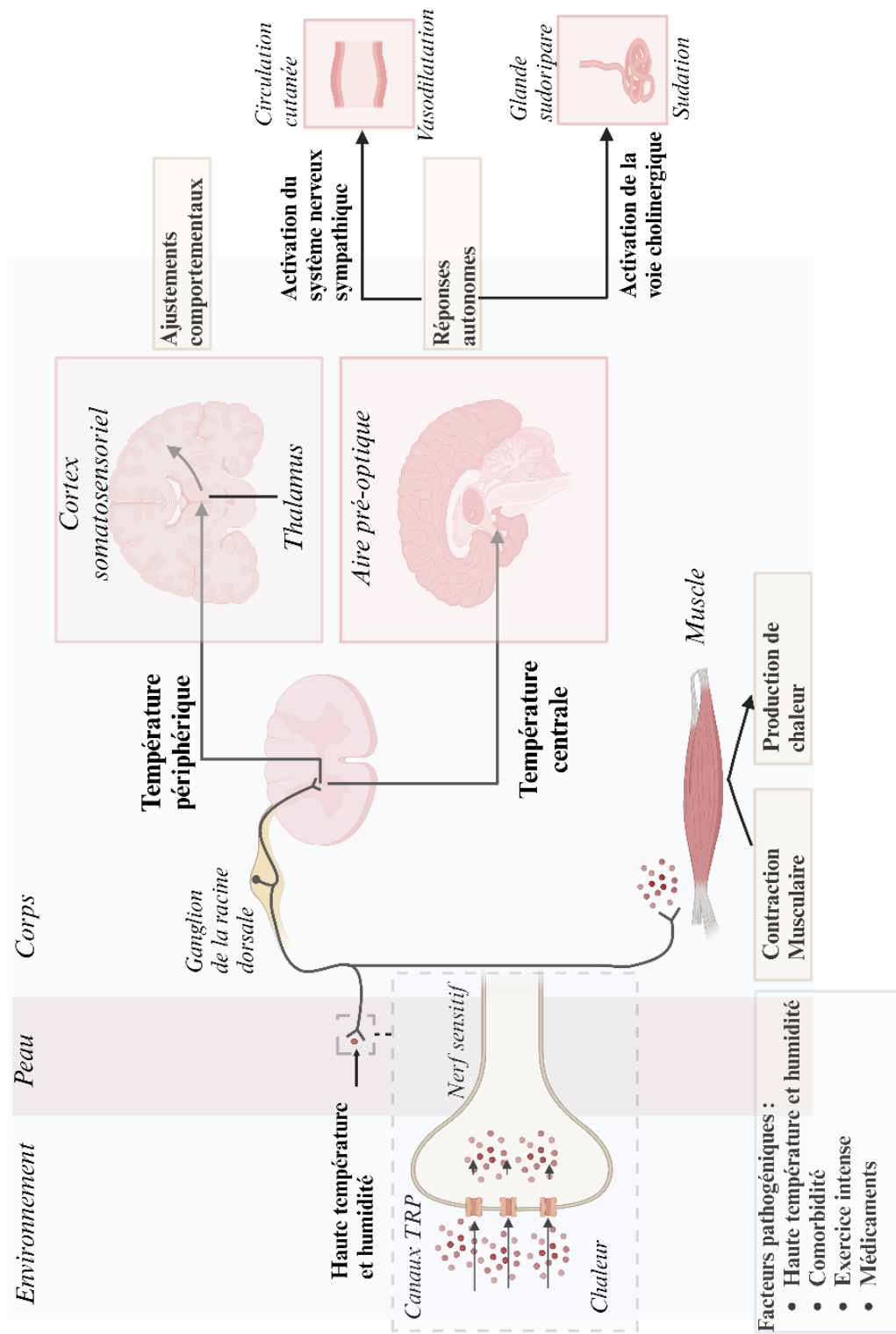


Figure 8 : Mécanisme de régulation de la température centrale au cours d'un stress thermique induit par l'exercice ou l'exposition à la chaleur. Les thermorécepteurs, TRP, perçoivent l'augmentation de la température au

Introduction

niveau de la peau, central et des muscles. L'information est acheminée pour la température périphérique vers le cortex somatosensoriel via le thalamus, ce qui régule une réponse consciente comportementale. Les modifications thermiques internes via l'air pré-optique de l'hypothalamus déclenchent une réponse autonome en deux temps, activation du système nerveux sympathique avec vasodilatation cutanée et activation de la voie cholinergique avec la sudation. Les éléments comme l'exercice physique intense dans un environnement chaud et humide, les comorbidités ou encore la prise de médicaments ou stimulants peuvent être des facteurs pouvant déréguler ces mécanismes (Bouchama et al., 2022).

Un effort physique soutenu peut augmenter le taux métabolique d'au moins 10 fois le taux basal. Ainsi, une augmentation de la thermogenèse métabolique enclenche les mécanismes cités ci-dessus. L'activation des fibres cholinergiques sympathiques permet d'augmenter la sudation. L'inhibition de l'activité sympathique dans les vaisseaux sanguins cutanés, entraîne une dérivation du sang vers la peau et une augmentation de la perte de chaleur par convection, conduction et rayonnement. On note également une augmentation du débit cardiaque permettant de compenser les besoins en oxygène du muscle squelettique (Bouchama et al., 2022; Lim, 2020). Lors d'un exercice physique, la température centrale peut augmenter de 3-4°C et atteindre 40.01 à 40.08°C (Appenzeller, J. Lamotte, A. Coon, 2022; Bouchama et al., 2022; Lim, 2020; Lim et al., 2008). Au-delà de ce seuil critique, la diminution de la libération de catécholamines et d'hormones thyroïdiennes, entraîne une réduction du taux métabolique et de la production de chaleur. Les changements comportementaux tels que la réduction des mouvements et de l'appétit complètent les mécanismes de thermolyse. Néanmoins, des températures de plus de 41.7°C ont déjà été rapportées chez des athlètes entraînés sans séquelles (Byrne et al., 2006), ce qui peut tendre à montrer que chez les patients hyperthermiques, existent des facteurs de risques ou prédisposant à la rupture de la balance de thermorégulation.

Facteurs de déséquilibre de la balance thermorégulatrice :

Les facteurs de risques pourraient être divisés en deux groupes. Des risques intrinsèques au rang desquels on pourrait citer (Bouchama et al., 2022):

- Un manque d'acclimatation : Une adaptation insuffisante aux environnements chauds, telle qu'une exposition inadéquate à la chaleur ou un manque d'adaptation progressive, peut augmenter la susceptibilité à l'hyperthermie d'effort (HE).

Introduction

- Une mauvaise condition physique : Les personnes ayant un faible niveau de capacité aérobie ou celles qui ne sont pas habituées à faire de l'exercice régulièrement peuvent être plus à risque de développer une hyperthermie lors d'un effort physique intense.
- Une hydratation inadéquate : La déshydratation et les déséquilibres électrolytiques, en particulier le sodium et le potassium, peuvent nuire à la thermorégulation et augmenter le risque d'hyperthermie.
- La présence de lésions musculaires induites par l'exercice avant une séance de sport intense semble aussi être un facteur de risque. L'inflammation qui en découle altère la thermorégulation avec la libération de cytokines entraînant la libération de prostaglandine PGE_2 qui au niveau de l'hypothalamus participent à la pyrexie (Li et al., 2021). Fortes et al., 2013 montre que des sujets, avec une lésion musculaire par exercice excentrique provoquée 2h et 7h avant une activité de type course à pieds de 50 min à 33°C 50% d'humidité, ont une température rectale significativement plus élevée que des sujets contrôles.
- Conditions médicales sous-jacentes : Les conditions médicales préexistantes, telles que les maladies cardiovasculaires, les troubles respiratoires et les affections métaboliques, sont aussi des facteurs de risque.
- Repos et récupération inadéquats : Un repos insuffisant entre des séances d'exercice intenses ou un temps de récupération insuffisant peuvent contribuer au développement de l'HE (Bouchama et al., 2022).
- Le risque génétique a aussi été établi avec la découverte chez des patients HE de mutations sur des gènes tels que *TRPV1*, *ASPH* et *RYR1* pouvant avoir un rôle potentiel dans la survenue de la maladie (Bosson et al., 2020; Bouchama et al., 2022). Ce point sera plus largement détaillé.

Il existe aussi des facteurs dits extrinsèques (Bouchama et al., 2022) :

- Conditions environnementales : L'exercice dans des environnements chauds et humides augmente le risque d'HE. Une température ambiante élevée, une humidité élevée et un manque de ventilation adéquate contribuent à l'accumulation de chaleur dans le corps.

Introduction

C'est d'autant plus effectif avec des vêtements et équipement inadéquats. Le port de vêtements excessifs ou l'utilisation d'un équipement de protection qui entrave la dissipation de la chaleur peuvent augmenter le risque d'HE pendant l'activité physique. Néanmoins des cas d'hyperthermie d'effort se sont produit lors de course avec un climat tempéré (Smith et al., 2016).

- Certains médicaments et substances : Certains médicaments, tels que les diurétiques et les stimulants, peuvent affecter l'équilibre hydrique et la thermorégulation, ce qui peut augmenter le risque d'HE. De plus, la consommation de drogues illicites, telles que les amphétamines ou la cocaïne, peut exacerber davantage le risque.

2. Les pathologies en lien avec un défaut de la thermorégulation

Les hyperthermies englobent un large éventail de maladies dont les mécanismes physiopathologiques peuvent être similaires mais qui ont des étiologies différentes.

Les hyperthermies dites déclenchées sont ainsi appelées car nécessitant un évènement ou élément déclencheur. Ainsi, dans ce groupe on a l'hyperthermie dite d'effort (HE) car survient durant ou après un exercice physique intense et prolongé. Elle concerne une population jeune, en relative bonne santé et souvent entraînée (DeHan et al., 2023).

On peut aussi citer l'hyperthermie maligne peranesthésique, déclenchée par l'exposition à des anesthésiques halogénés tels que l'halothane, l'isoflurane, le desflurane ou encore la sévoflurane. C'est une maladie génétique autosomique dominante avec des mutations trouvées sur des gènes, *RYR1* à 70%, impliqués dans l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique (Endo et al., 2022).

Pour les autres formes d'hyperthermie, il y a le coup de chaleur dit classique ou insolation, forme la plus connue d'hyperthermie. Il concerne surtout une population souvent fragilisée par une comorbidité ou encore l'âge, les nourrissons, les personnes âgées et les très jeunes étant les plus concernés (Casa et al., 2010). Elle survient surtout lors d'une exposition prolongée à de fortes chaleurs et reste un enjeu de santé publique avec le réchauffement climatique et la multiplication des épisodes caniculaires. Ainsi, durant la vague de chaleur d'août 2003, on a

Introduction

noté une surmortalité de 60% chez les populations déjà fragiles et vulnérables à la chaleur (Santé Publique France, 2004).

Elle partage avec l'hyperthermie d'effort de nombreuses manifestations cliniques en commun, mais on peut noter des différences notables permettant de définir deux pathologies aux étiologies bien différentes (Orlando Laitano and Lisa R. Leon, 2019) (**Tableau 5**).

Introduction

Tableau 5 : Comparatif entre le coup de chaleur classique et l'hyperthermie d'effort

Patients	Coup de chaleur classique	Hyperthermie d'effort
Age	Enfant et personnes âgées	15-45 ans
Etat de santé	Maladie chronique	En relative bonne santé
Temps environnement	Exposition prolongée à des températures élevées	Variable
Activité	Sédentaire	Exercice intense
Usage de médicaments ou drogues	Diurétiques, antidépresseurs, anticholinergiques, phénothiazines	Rien souvent mais rarement des stimulants ou cocaïne
Sudation	Absent souvent	Présent
Acidose lactique	Rare	Fréquent
Insuffisance rénale aigue	Rare (<5%)	Fréquent (~30%)
Rhabdomyolyse	Très rarement	Fréquent et sévère
Potassium	Normal	Hypo- or hyperkalemie
Calcium	Normal	Hypocalcémie
Coagulation intravasculaire disséminée (DIC)	légère	Peut être marquée
Glucose	Hypoglycémie fréquent	Variable; hyper- or hypoglycémie peuvent être présents

Introduction

3. L'hyperthermie maligne peranesthésique

a) Historique et définition

L'histoire de l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM) remonte au début du 20^e siècle, lorsque des cas de fièvre inattendue pendant l'anesthésie ont été signalés. Les premiers cas documentés de HM ont été signalés en 1900, mettant en évidence le lien entre l'anesthésie et la fièvre. Dans les années 1910, les décès survenus pendant l'anesthésie générale ont été attribués à une susceptibilité héréditaire au chloroforme, qui a ensuite été reconnue comme les premiers exemples de HM. Ce n'est qu'en 1961 que l'HM a été identifiée comme une anomalie autosomique dominante. Dans les années 1960 et 1970, le test de contracture à la caféine et à l'halothane (IVCT) a été développé pour évaluer la sensibilité à l'HM, et le dantrolène sodique a été découvert comme un antidote efficace. D'autres recherches menées dans les années 1980 ont révélé que les anomalies du récepteur de la ryanodine sont liées à l'HM dans de nombreuses familles. Depuis sa description initiale, l'HM a été reconnue comme une cause importante de décès liés à l'anesthésie et a fait l'objet d'études approfondies (Denborough, 1988; MacLennan and Britt, 1998; Rosenberg et al., 2015).

L'hyperthermie maligne peranesthésique est une maladie génétique rare caractérisée par une réponse hypermétabolique à certains déclencheurs tels que les agents anesthésiques halogénés volatils et la succinylcholine. Il s'agit d'une maladie potentiellement mortelle qui peut être fatale si elle n'est pas rapidement détectée et traitée. Les symptômes de la HM incluent l'hyperthermie, l'augmentation du taux de dioxyde de carbone, la rigidité musculaire, l'acidose métabolique et les dysrythmies. La maladie est causée par une augmentation incontrôlée du calcium myoplasmique, qui déclenche des voies biochimiques associées à l'activation musculaire. La cause la plus fréquente d'HM est une mutation du gène du récepteur de la ryanodine 1 (*RYR1*). Le diagnostic d'HM peut être confirmé par le test de contracture à la caféine et à l'halothane (IVCT). Le traitement implique l'administration de dantrolène, qui a permis de réduire de manière significative les taux de mortalité. Une détection précoce et un traitement rapide sont essentiels pour prévenir les complications fatales (Lopez et al., 2018; MacLennan et al., 1990; Sagui et al., 2015a).

Introduction

b) Epidémiologie

L'incidence et la prévalence de l'hyperthermie maligne peranesthésique varient selon les populations et les régions géographiques. L'âge moyen des patients ayant des réactions d'hyperthermie maligne peranesthésique est de 18,3 ans, avec une incidence plus élevée chez les jeunes, en particulier chez les enfants de moins de 15 ans, qui représentent 52,1 % de toutes les réactions. Cependant, l'âge des patients ayant des réactions d'HM peut varier considérablement, allant de nouveau-nés à 78 ans. L'incidence signalée d'une réaction HM varie de 1:250 000 à 1:10 000, avec une prévalence estimée de la sensibilité à l'HM entre 1:2000 et 1:3000 (Rosenberg et al., 2015).

La pénétrance de l'hyperthermie maligne peranesthésique varie en fonction des mutations diagnostiquées spécifiques du *RYRI*. L'étude de la pénétrance globale des mutations sur *RYRI* s'est révélée être de 40,6 %. Cependant, aucune différence statistique de pénétrance n'a été observée entre les différentes mutations. Les hommes avaient une pénétrance significativement plus élevée (50 %) que les femmes (29,7 %). Il a été démontré que l'âge et le type d'anesthésique influent sur la sévérité de l'expression clinique de l'HM. Dans certains cas, la présence de deux allèles *RYRI* mutés a semblé avoir un effet additif sur la restriction fonctionnelle du récepteur RyR1 et a entraîné une réponse plus forte lors du test de contracture *in vitro* (IVCT) et des signes cliniques plus sévères. La pénétrance des variants de *RYRI* dans l'HM est complexe et peut impliquer d'autres facteurs génétiques ou environnementaux (Ibarra Moreno et al., 2019; Litman et al., 2018; Wolak et al., 2014).

c) Signes cliniques et complications

La crise d'HM peut survenir au décours d'une anesthésie générale, mais également en période post-opératoire. Les signes cliniques annonçant la survenue de la crise HM chez l'homme incluent une rigidité musculaire (en particulier un spasme du masséter), une hypercarbie (augmentation de la pression artérielle en CO₂), une tachycardie, une tachypnée, l'augmentation de la demande en oxygène et une hyperthermie avec une élévation rapide de la température corporelle au-dessus de 41°C (Edjiu and Gutstein, 2023; Gregory and Weant, 2021).

Les complications suite à une crise d'hyperthermie maligne peranesthésique peuvent être graves et potentiellement mortelles. L'hyperthermie non contrôlée peut entraîner une acidose

Introduction

respiratoire et, dans la plupart des cas, une acidose métabolique due à une consommation rapide des réserves d'énergie et de l'ATP. Si elle n'est pas traitée, la mort cellulaire continue et la rhabdomyolyse entraînent une hyperkaliémie potentiellement mortelle, et la myoglobinurie peut conduire à une insuffisance rénale aiguë. D'autres complications potentiellement mortelles comprennent la coagulation intravasculaire disséminée (DIC), l'insuffisance cardiaque congestive et l'ischémie intestinale. En outre, lorsque la température corporelle dépasse environ 41 °C, la DIC est la cause habituelle de décès. Il est essentiel de reconnaître rapidement les signes de l'HM et de surveiller en permanence la température centrale pour minimiser la morbidité et la mortalité associées (Rosenberg et al., 2015).

d) Prise en charge et prévention

La prise en charge et la prévention de l'hyperthermie maligne peranesthésique impliquent une détection rapide, un diagnostic précoce et un traitement immédiat. Le traitement de première intention pour une réponse à l'HM est le dantrolène. Parmi les autres considérations thérapeutiques, il y a la prise en charge des complications liées à une réponse hypermétabolique, telles que l'hyperkaliémie et les arythmies. La mortalité due à l'HM a diminué au fil des ans grâce à une meilleure compréhension de la maladie et sa prise en charge. L'identification et le traitement précoces sont essentiels pour une prise en charge efficace et pour réduire la morbidité et la mortalité des patients (Bahaidarah et al., 2023).

e) Diagnostic

Le test de contracture *in vitro* (IVCT) est le premier moyen de diagnostic mise en place dans cette pathologie dès les années 80. Le standard actuel pour tester la prédisposition à l'HM est le test de contracture *in vitro*, mais le test génétique est privilégié pour sa rapidité et son moindre fardeau pour les patients.

Ce test mesure la force de contraction développée par des fibres musculaires, *in vitro*, soumises à des concentrations successives de caféine ou d'halothane. Ces deux composés permettent de déterminer la sensibilité du canal calcique RyR1 déterminant ainsi la susceptibilité à l'HM. Le test est positif au-delà d'une valeur seuil qui est 0.2 g-contraction pour l'exposition à la caféine (0.5 à 2mM) et de 0.5g-contraction pour l'halothane (2% V/V) (Tanwar et al., 2022). Selon les résultats, différents diagnostics sont possibles selon l'EHRMG (groupe européen HM) :

Introduction

- HMS (positif à la caféine et à l'halothane)
- HMS_c (positif à la caféine)
- HMS_h (positif à l'halothane)
- HMN (négatif ou normal)

Ce test a une spécificité de 93.6% mais des faux positifs sont aussi rapportés dus à la présence de myopathies sous-jacentes autres que le HM (Ording et al., 1997).

Le diagnostic passe aussi par le screening systématique des gènes dont des mutations ont été associées à la survenue de l'HM.

Le gène *RYR1*, situé sur le chromosome 19q13.1, présente plus de 400 variations, dont au moins 66 sont liées à la HM (www.eHMg.org/diagnostic-mutations consulté le 22/04/2024). D'autre part, le gène *CACNA1S* codant pour la sous-unité canalaire, Cav1.1, du DHPR représente moins de 1% des mutations découvertes (Tanwar et al., 2022).

Il existe des pathologies liées aux gènes cités ci-dessus qui confèrent une susceptibilité à l'HM. Ces maladies incluent les myopathies congénitales avec des noyaux centraux, les myopathies congénitales avec disproportion des fibres musculaires, le syndrome de King-Denborough, les myalgies d'effort et la rhabdomyolyse d'effort. Ces maladies sont souvent liées à des variants pathogènes du gène *RYR1*, qui est associé à la susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique (Litman et al., 2018).

f) Physiopathologie

Agents déclencheurs

Les agents déclencheurs de l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM) comprennent les anesthésiques halogénés par inhalation tels que l'halothane, l'isoflurane, le sévoflurane et le desflurane. De plus, le relaxant musculaire succinylcholine est également un déclencheur de l'HM ainsi que des facteurs de stress tels que l'exercice intensif et la chaleur chez l'homme (Rosenberg et al., 2015; Tanwar et al., 2022).

Les agents halogénés agissent en se liant aux récepteurs ryanodine sensibilisés (RyR1) dans le réticulum sarcoplasmique (RS) des cellules musculaires. Cette liaison entraîne une ouverture

Introduction

prolongée des canaux RyR1, ce qui provoque une libération accrue de calcium du RS dans le cytosol. Cette libération de Ca^{2+} déclenche une cascade de réactions cellulaires entraînant une augmentation de la production de chaleur (Hopkins et al., 2018).

La succinylcholine est un relaxant musculaire dépolarisant qui provoque une activation soutenue des récepteurs nicotiques post-jonctionnels à l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire. Cela entraîne une contraction musculaire normalement suivie d'une relaxation musculaire dans les 60 à 90 secondes, car la dépolarisation persistante empêche la génération ultérieure de potentiels d'action. Chez les patients susceptibles à l'hyperthermie maligne, la dépolarisation persistante induite par la succinylcholine entraîne une augmentation soutenue des ions calciums intracellulaires, ce qui conduit à une contracture prolongée, un spasme du masséter qui se résout généralement dans les 5 minutes, même en l'absence de traitement. Cependant, s'il dure plus de 2 minutes et entrave l'intubation endotrachéale, il est considéré comme anormal et est associé à une probabilité de 24 à 50 % de susceptibilité à l'HM (Hopkins et al., 2018).

Mécanismes physiopathologiques

L'HM est une dérégulation de la thermogenèse métabolique musculaire. C'est une maladie génétique avec des mutations autosomiques dominantes trouvées sur des gènes majeurs du couplage excitation-contraction, dont majoritairement *RYR1*, mais aussi *CASQ1*, *STAC3* et *CACNA1S* (Lopez et al., 2018 ; Maclennan et al., 1990b). Ces mutations entraînent une sensibilité aux anesthésiques halogénés dont l'exposition entraîne une libération exacerbée de calcium du réticulum vers le cytosol menant à une production importante de chaleur et une hyperthermie avec une température centrale supérieure à 41.5°C (Groom et al., 2011 ; Laitano et al., 2019a). Ainsi, l'HM est une altération du métabolisme calcique dans le muscle squelettique.

En condition physiologique, la contraction musculaire est initiée lors de la transformation d'une impulsion électrique en action mécanique au niveau des triades formées d'une invagination du sarcolemme, le tubule T (tubule transverse), et deux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Au niveau de ces triades, on trouve le complexe de libération du calcium CRC (Calcium Release Calcium) qui se compose, du côté du sarcolemme, d'un canal calcique

Introduction

voltage-dépendant de type L, le récepteur aux dihydropyridines (DHPR), associé au canal RyR1 qui se trouve sur la membrane sarcoplasmique. A ces 2 canaux s'ajoutent des protéines régulatrices comme la calséquestrine, la triadine et la junctine. La libération d'acétylcholine par le motoneurone entraîne une dépolarisation de la cellule musculaire entraînant l'activation du DHPR qui change de conformation et mécaniquement induit l'activation et l'ouverture du canal RyR1 et la libération de calcium du réticulum vers le cytosol. Le calcium permet le déplacement des têtes de myosine sur l'actine permettant ainsi la contraction des muscles, c'est le couplage excitation-contraction. Le calcium est ensuite remis dans le réticulum par les pompes SERCA (SR/ER Ca^{2+} -ATPase).

Chez les sujets HM, il y a une anomalie du métabolisme calcique dans le muscle squelettique due à une altération du couplage excitation-contraction. Les signes et symptômes du HM sont liés à une libération incontrôlée de calcium intracellulaire par RyR1. Cette libération accrue d'ions calcium, entraîne une activation anormale du métabolisme musculaire, de la respiration mitochondriale entraînant notamment une augmentation de la consommation d'oxygène, de la production de dioxyde de carbone, de l'hydrolyse de l'ATP et de la production de chaleur. La recapture du calcium libéré par la SERCA est insuffisante, ce qui entraîne une augmentation de la thermogénèse liée à l'hydrolyse d'ATP dans une tentative vaine de réduire le calcium intracellulaire. L'ensemble de ces processus mènent à une augmentation de la température corporelle au-delà de 41°C (**Figure 9**). La susceptibilité à la HM est causée principalement par une hypersensibilité du récepteur RyR1 (Tanwar et al., 2022).

La déplétion en ATP entraîne un switch vers la glycolyse anaérobie et la production d'acide lactique, c'est l'acidose métabolique. Cette dernière et la contraction anormale des muscles entraînent une fragilité de la membrane cellulaire menant à la rhabdomyolyse et à la libération du contenu cellulaire dans le sang ce qui se traduit par une hyperkaliémie cardiotoxique, une augmentation de la créatine phosphokinase plasmatique (CPK), une myoglobulinémie et aussi une myoglobulinurie néphrotoxique (Rosenberg et al., 2015).

Introduction

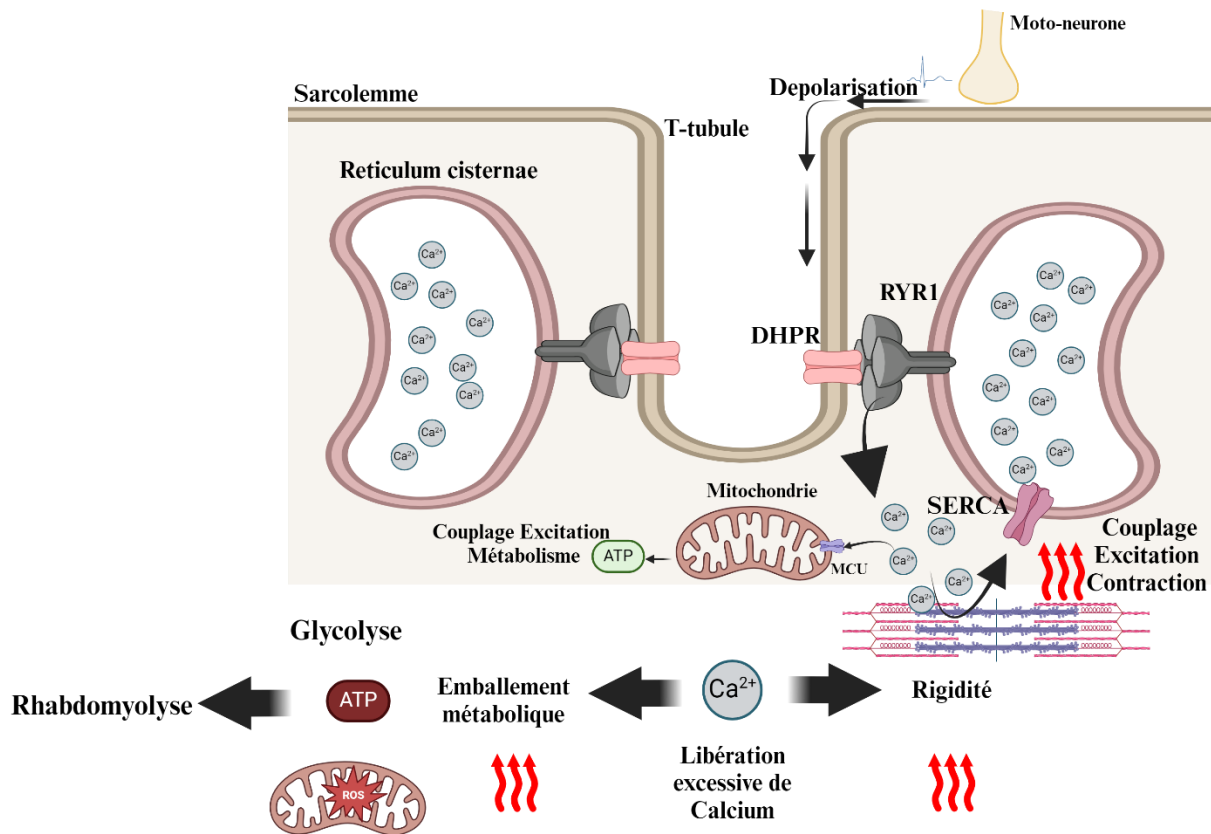


Figure 9 : Physiopathologie de l'hyperthermie maligne. Une altération du couplage EC induite par une mutation sur un des acteurs de ce processus, entraîne une hypersensibilité du canal RyR1 qui exposé aux anesthésiques halogénés ou succinylcholine libère de façon excessive et incontrôlée du calcium vers le cytoplasme entraînant une contraction généralisée. La libération accrue de calcium entraîne aussi un emballement métabolique qui consomme et mène à une déplétion énergétique. Cela augmente la respiration mitochondriale qui avec la glycolyse mène à l'acidose métabolique cytotoxique. L'ensemble de ces événements définissent un état hypermétabolique produisant de la chaleur qui en fragilisant la membrane des fibres musculaires entraîne la rhabdomyolyse.

g) Génétique

Les bases génétiques de l'hyperthermie maligne peranesthésique sont aujourd'hui bien connues et impliquent principalement des mutations sur le gène *RYR1* avec plus de 400 variants identifiés, dont au moins 34 sont associés à l'HM (Papapetrou and Ferguson, 2023). A la marge, d'autres gènes ont aussi été identifiés avec des mutations sur *CACNA1S*, codant le canal Cav1.1 du DHPR mais aussi sur *STAC3*, *TRPV1* et *CASQ1*.

Introduction

RYRI

- Prévalence

Selon le groupe européen d'hyperthermie maligne, il y a 66 variants *RYRI* HM utilisés en diagnostic (<https://www.eHMg.org/diagnostic-mutations> consulté le 23/04/2024) mais il y a d'autres référentiels. La prévalence des mutations *RYRI* est estimée à moins de 25% chez les enfants (2 500/10 000) et à moins de 5% chez les adultes (2 500/50 000). Cette prévalence change chez les personnes ayant une suspicion de HM avec un IVCT positif passant à 60% (Ibarra Moreno et al., 2019). Ces chiffres sont basés sur l'hypothèse que la prévalence de ces mutations n'est pas différente chez les personnes recevant des anesthésiques par rapport aux témoins. Il est important de noter que la pénétrance réelle de cette mutation sera probablement beaucoup plus faible. La pénétrance n'est pas de 100%, ce qui signifie que tous les individus porteurs de mutations *RYRI* ne développeront pas nécessairement d'hyperthermie maligne.

- Nature et localisation

Les variants pathogènes de *RYRI* associés à l'HM comprennent des mutations ponctuelles, des délétions, des insertions et d'autres types de variants génétiques qui peuvent affecter la fonction du canal de libération du calcium. Ces mutations peuvent être de nature hétérozygote ou homozygote. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories : les variants gain-de-fonction qui augmentent l'activité du canal, et les variants perte de fonction qui réduisent ou altèrent l'activité du canal.

Les mutations dans *RYRI* sont réparties sur l'ensemble du gène mais certaines régions, appelées "hot spots", présentent une densité plus élevée de mutations pathogènes. Ces "hot spots" correspondent souvent à des domaines fonctionnels importants du canal de la ryanodine, tels que les régions impliquées dans la liaison avec la FKBP12, la régulation par le magnésium et l'ATP, la transduction du signal, ou encore dans les régions qui influencent la conformation du canal. Les mutations sont souvent situées dans les trois régions transmembranaires C-terminales du récepteur, qui sont essentielles pour la fonction de conduction du canal. Ces régions clusters sont ainsi comme suit (Van Petegem, 2015) :

Introduction

N-terminale du RyR1 : comprenant les 600 premiers acides aminés environ, contiennent des sites de liaison pour des cofacteurs et des protéines modulatrices.

Région centrale du RyR1 : autour des acides aminés 2163 à 2458, est un autre hot spot connu. Cette région inclut le domaine de liaison à la FKBP12 (FK506-binding protein), une protéine stabilisatrice qui joue un rôle dans la régulation de l'ouverture du canal.

C-terminale du RyR1 : La région C-terminale du récepteur (environ les 500 derniers acides aminés) contient les régions transmembranaires et les sites formant le canal. Des mutations dans cette zone sont fortement associées à l'HM et peuvent causer une augmentation de la libération de calcium.

- Effet pathogène des mutations sur *RYR1* dans l'HM

Les variants pathogènes du gène *RYR1* ont des effets qui perturbent la régulation normale du calcium dans les cellules musculaires squelettiques. Voici comment ces variants peuvent conduire à une crise d'hyperthermie maligne peranesthésique :

Beaucoup de variants pathogènes *RYR1* sont des variants faux-sens ou délétion/insertion sans décalage du cadre de lecture. Ces mutations peuvent rendre le canal hypersensible aux déclencheurs normaux ou causer une ouverture spontanée du canal, menant à une libération excessive de calcium dans le cytoplasme des cellules musculaires. Chez les personnes ayant des variants pathogènes de *RYR1*, les agents anesthésiques volatils peuvent agir comme des déclencheurs, potentialisant l'hypersensibilité du canal muté en exacerbant la libération d'ions calcium du réticulum sarcoplasmique notamment en interférant avec l'effet inhibiteur du Mg^{2+} sur RyR1. Les mutations *RYR1* peuvent affecter la capacité de la protéine à être régulée par ses protéines partenaires, par exemple, la protéine de liaison FKBP12. Elles peuvent perturber l'interaction entre *RYR1* et ces protéines modulatrices, affectant ainsi la stabilité et la fonction du complexe protéique. Elles peuvent aussi perturber la conformation tri-dimensionnelle de la protéine due au fait que les parties C et N-terminales sont amenées à interagir. Ces mutations peuvent également affaiblir les interactions interdomaines, abaissant ainsi la barrière énergétique à l'ouverture du canal. Ainsi, une répartition tout le long de la protéine des

Introduction

mutations aboutit au même phénotype (Duke et al., 2006; Ibarra Moreno et al., 2020; Riazi et al., 2018).

CACNAIS

Le gène *CACNAIS* code pour la sous-unité Cav1.1 du canal calcique de type L voltage-dépendant situé dans la membrane du sarcolemme des cellules musculaires squelettiques. Les mutations dans *CACNAIS* sont beaucoup moins fréquentes que celles dans *RYR1*, mais elles peuvent également conduire à l'hyperthermie maligne. Deux variants faux-sens sont reconnus comme pathogènes par l'EHMg (<https://www.eHMg.org/diagnostic-mutations> consulté le 23/04/2024).

Voici les domaines où les mutations associées à l'HM ont été identifiées dans *CACNAIS* : Les domaines de la protéine mutée sont le segment de détection de tension IS4, la boucle cytoplasmique reliant les domaines III et IV et le domaine extracellulaire IV S5-S6. Ces mutations peuvent abroger le courant de type L sans affecter le couplage EC, mais aussi favoriser l'activation de RyR1 ou altérer la fonction inhibitrice de cav1.1 sur RyR1, ce qui peut conduire à des réactions potentiellement mortelles lors de l'exposition à des anesthésiques volatils et/ou à la succinylcholine (Beam et al., 2017).

STAC3

Aucune mutation pathogène sur *Stac3* en lien avec l'HM n'est, à ce jour, reconnue par l'EHMg. Néanmoins, *Stac3* joue un rôle stabilisateur dans le couplage excitation – contraction comme adaptateur dans la liaison entre Cav1.1 et RyR1.

Des cas historiques de susceptibilité à l'HM chez les amérindiens Lumbee ont été associés à un variant *STAC3*, avec des symptômes d'HM survenant lors de l'utilisation de l'halothane pour l'anesthésie. Des variants *STAC3* ont été identifiés chez des individus de diverses origines présentant une myopathie congénitale et des symptômes d'HM. Cependant, en raison du manque d'informations cliniques et de tests contracture *in vitro*, l'implication des variants *STAC3* dans la susceptibilité à la HM reste à démontrer.

Introduction

Les variants, p.(Trp284Ser) et c.997-1G>T, de *STAC3* ont été associés à une susceptibilité à l'hyperthermie maligne lors de réactions anesthésiques. Les patients porteurs de ces variants ont présenté des réactions anesthésiques indésirables, avec des symptômes similaires à ceux de l'hyperthermie maligne peranesthésique. Cependant, il a été observé que les réactions à l'hyperthermie maligne associées aux variants de *STAC3* se caractérisent par un début plus progressif des symptômes, une absence de myoglobinurie, une augmentation élevée des taux de CPK ou de potassium, et des résultats de laboratoire post-événement indiquent une dégradation musculaire moins significative que dans l'hyperthermie maligne peranesthésique (Zaharieva et al., 2018).

Les autres gènes

D'autres gènes, acteurs dans le complexe de relâchement du calcium ont été mis en évidence chez des personnes HM sans que le lien pathophysiologique ne soit établi. Ainsi, *CASQ1* codant la calséquestrine 1, son invalidation induit chez le modèle murin une sensibilité à la chaleur et aux anesthésiques halogénés (Protasi et al., 2009). D'autres gènes comme *CACNB1*, *CASQ2*, *SERCA1*, *JSR1*, *STIM1*, *ORAI1* et *KCNA1* ont également été identifiés mutés chez des patients HM (Mestre et al., 2016; Rosenberg et al., 2015).

Le canal calcique *TRPV1*, nocicepteur exprimé de façon ubiquitaire a également été mis en cause dans le HM. La mutation sur *TRPV1* c.1836C>T; p.(Thr612Met) a été identifiée chez des patients HM avec une sensibilité au test *in vitro* positive. Les études de caractérisation fonctionnelle montrent une hypersensibilité à l'halothane des myotubes exprimant ce variant (Vanden Abeele et al., 2019).

4. L'hyperthermie d'effort

a) Historique : De l'antiquité à aujourd'hui, à la quête d'une définition

L'histoire des pathologies dues à un défaut de la thermorégulation est aussi ancienne que celle de l'humanité et est évoquée depuis des temps bibliques. Durant l'antiquité, plusieurs faits dans l'histoire des opérations militaires font référence à des cas d'hyperthermies. En 400 av. J.C., Hérodote décrivait comment les combats sous la chaleur, le poids des armures et la soif avaient terrassé les Spartes et les Athéniens à la bataille des Thermopyles. En 325 av. J.C. Alexandre

Introduction

le Grand, faisant face à la fronde de ses soldats démoralisés d'être partis de chez eux depuis trop longtemps, fait une longue marche de retour dans le désert. Plutarque rapporta que parti avec 15 000 hommes, Alexandre arrivera qu'avec 5000 survivants à la place perse de Pura. Pour finir, on peut aussi citer en 24 av. J.C., l'expédition vers l'Arabie Heureuse, actuel Yémen, d'Aelus Gallus, préfet romain d'Egypte, qui perdit une large partie de ses légions dans le désert de Rub al-Khali, le plus vaste et chaud d'Arabie (Casa et al., 2010a).

Jusqu'à pas si longtemps, les termes de coup de chaleur, syncope ou encore *siriasis* étaient utilisés pour définir sans distinction toutes les formes d'hyperthermie dont celle induite par l'effort physique. Ainsi, jusqu'à la première moitié du 20^e siècle, la distinction n'est pas faite entre ces différentes conditions (Hubbard, 1979). Le terme « Heat stroke » ou coup de chaleur, est employé pour décrire aussi bien les cas chez les soldats pendant la guerre civile américaine ou durant la Seconde Guerre mondiale (Schickele, 1947) que pour parler de la surmortalité due à la canicule de Juillet 1916 à Chicago chez les personnes âgées (Gauss and Meyer, 1917). Bien que la description des signes cliniques chez les soldats américains durant la Seconde Guerre Mondiale correspond à ce qu'on sait aujourd'hui de l'hyperthermie d'effort (Malamud et al., 1946), la distinction n'est pas encore faite. Néanmoins, dès 1898, L. Westenra Sambon publie un papier où il essaie de différencier deux termes : La syncope dont la description qu'il en fait ressemble à l'HE et le *siriasis*, qui correspond au coup de chaleur dit classique (CC). Le terme *siriasis* faisant référence à l'étoile Sirius symbole des mois de forte chaleur où les insulations sont fréquentes (Knochall, 1975 ; Sambon, 1898). C'est en 1935, que D.H.K Lee décrit pour la première fois différentes conditions physiologiques ou pathologiques liées à la « *rupture de l'équilibre entre le corps et son environnement* » en différenciant quatre états. Ainsi, il décrit (Lee, 1935) :

L'hyperpyrexie : un état où la température centrale du corps dépasse des limites (42°C) où le maintien de la vie et le fonctionnement des organes vitaux sont très compromis. Il l'associe au terme de « True heat stroke ». Les causes ainsi décrites sont l'incapacité d'une sudation efficace (déshydratation, vêtement non adapté) ou la production de chaleur due à une infection, l'hyperthyroïdisme, l'alcoolisme ou encore l'effort physique. La description clinique qu'il en fait colle à la description actuelle de l'hyperthermie d'effort. Il décrit ainsi une atteinte

Introduction

du système nerveux central se manifestant par de l'irritabilité, des nausées, de la stupeur ou encore une convulsion.

Les trois autres conditions qu'il décrit sont l'insuffisance circulatoire, un déficit en électrolytes et la déshydratation sévère qui sont associés respectivement à l'épuisement dû à la chaleur, les crampes et la déshydratation.

Mais c'est entre 1942-1943, l'étude conduite dans le désert californien, sur les troupes américaines en préparation pour la Seconde Guerre mondiale, met en évidence la relation entre l'effort physique et la survenue de l'hyperthermie (Mcardle, 1948). Le point culminant arrive en 2003 avec le livre « *Les hyperthermies liées à l'effort* » décrivant le diagnostic, les facteurs de prédisposition et de pronostic (Armstrong, 2003). Ainsi, l'hyperthermie d'effort est définie comme une maladie à part entière différente des autres états pathologiques liés à un défaut de thermorégulation.

Pour ce qui est de la compréhension de la physiopathologie et l'étiologie de la survenue de la maladie, les premières hypothèses remontent à l'antiquité avec Hippocrate qui parlait de surchauffe du corps. Puis durant le 17 et le 19^e siècle, l'hypothèse est toute autre, on croit qu'à l'inverse, c'est plutôt une transpiration excessive qui refroidirait les organes internes, on parle d'hypothermie paradoxale due à une exposition prolongée à la chaleur. Ainsi, les colons américains, pendant les périodes de forte chaleur, s'hydratent avec des spiritueux forts et mangent du piment dans le but de réchauffer les organes internes. Le Duffy's Pure Malt Whiskey servira ainsi de traitement pour les coups de chaleur jusqu'en 1860 (Casa et al., 2010b, 2010a).

Vers la fin du 19^{ème} siècle, le raisonnement scientifique prend le dessus. Ainsi, le vendredi 28 août 1896, l'institut pathologique de New York publiait dans le *UTICA DAILY UNION* « *Une avancée médicale remarquable a été faite ces quatre derniers jours. La cause du « sunstroke* », (*insolation ou coup de chaleur en français*), *un sujet jusqu'ici obscur vient d'être définitivement résolu* ». La cause évoquée est un virulent poison sécrété par le corps et qui ne peut être éliminé dans un environnement chaud et humide (UTICA DAILY UNION, 1896). Puis c'est l'hypothèse d'un agent infectieux dans le sol qui serait activé par la chaleur qui émerge en 1898 (Sambon, 1898).

Introduction

Faut attendre la première moitié du 20^e siècle, avec la distinction et la définition qui sont faites de l'hyperthermie d'effort pour que les premières avancées majeures aussi bien sur sa compréhension que sur sa prise en charge arrivent. L'étude réalisée sur les soldats américains engagés dans la Seconde Guerre Mondiale permet de mieux comprendre l'impact de la chaleur sur les organismes durant un exercice physique. Elle visait à étudier l'influence de la chaleur et de la déshydratation sur la tolérance à l'effort en particulier. Cette étude de quatre ans dans le désert californien, pour comprendre la réaction humaine à l'exercice dans la chaleur afin d'améliorer les performances des soldats américains, posera les jalons pour mieux comprendre les mécanismes de la thermorégulation (Mcardle, 1948 ; Cohen et al., 1981 ; Fox et al., 1966 ; Goodman et al., 1985 ; Meir et al., 1994 ; Meir and Murphy, n.d. ; Olivier et al., 1978).

Ainsi, l'hyperthermie d'effort pourrait être définie comme suit.

b) Définition

Elle se caractérise par une hyperthermie sévère, avec une température corporelle supérieure à 40.5°C, associée à un dysfonctionnement neurologique soudain. Elle est observée chez des personnes jeunes, en bonne santé et exposées à un exercice physique intensif. Elle résulte d'un dysfonctionnement de la thermorégulation, conduisant à une augmentation incontrôlée de la production de chaleur interne dépassant les mécanismes de compensation (Navarro et al., 2017).

Le coup de chaleur dû à l'exercice ou hyperthermie d'effort (HE) est une affection potentiellement mortelle. Elle peut entraîner une réponse inflammatoire systémique avec une coagulopathie et une défaillance multiviscérale. La base physiologique exacte de l'HE n'est pas entièrement comprise, mais on pense qu'elle est le résultat d'une combinaison de facteurs environnementaux et individuels. Le diagnostic peut être difficile, car il existe des formes plus légères de la maladie dues à la chaleur et qui peuvent présenter des symptômes similaires. Le traitement implique un refroidissement rapide, l'immersion dans de l'eau glacée étant la stratégie la plus efficace (Filep et al., 2020). Il est essentiel de commencer le traitement dans les 30 minutes pour ramener la température corporelle à un niveau seuil soit en dessous de 40.5°C (Casa et al., 2010; Gamage et al., 2020; Li et al., 2021; Yeo, 2004a).

Introduction

En l'absence d'une prise en charge adaptée, cela peut évoluer vers des lésions multiviscérales. Ainsi, les organes les plus impactés sont le foie pouvant nécessiter une greffe ou encore l'insuffisance rénale.

Bien que des ressemblances existent entre le HE et d'autres conditions pathologiques liées à l'exposition à la chaleur, un profil clinique type peut être dressé permettant ainsi de rendre plus simple le diagnostic.

c) Epidémiologie

L'hyperthermie d'effort est une problématique importante dans l'armée et constitue un point critique notamment sur les terrains d'opérations. Ceci explique pourquoi les premières grandes études épidémiologiques et de mise en place d'une prise en charge rapide de la maladie sont issues de la recherche militaire. Bien que la distinction entre le coup de chaleur classique et l'hyperthermie d'effort ne soit pas encore clairement établie, c'est à la fin du 19^{ème} siècle qu'on a les premières données.

Ainsi, dès 1879, durant la guerre anglo-zouloue en Afrique du Sud, on a une première étude. Durant cette guerre, une incidence de 2.78 cas pour 1000 soldats sera rapportée dans les troupes britanniques avec des pics pendant les mois d'été sud-africain d'octobre à mars (Bricknell, 1995).

Puis c'est pendant la Première Guerre mondiale, avec sa particularité d'être un conflit étendu sur plusieurs zones géographiques avec des différences climatiques majeures, que des analyses rétrospectives comparatives en fonction de l'environnement prenant en compte la température et l'humidité seront faites. Ainsi, les observations sur les troupes britanniques parties combattre en Macédoine et en Mésopotamie montrent des incidences variant respectivement de 2 à 28 cas pour 1000 soldats. Cela fait émerger l'hypothèse que la cause primaire du coup de chaleur serait liée à l'exercice physique dans un environnement chaud étant donné la prédominance des cas en Mésopotamie. Ainsi, les premières mesures seront de s'assurer que les soldats aient assez d'eau froide pour s'hydrater, du sel, du repos et aussi des tenues plus adaptées à la chaleur (Bricknell, 1995).

Introduction

Les leçons apprises de la Première Guerre mondiale, permettent de mieux appréhender les cas durant la Seconde aussi bien dans sa prise en charge que dans la prévention. Dans des régions comme l'Iraq où une grande partie de l'armée britannique est déployée, on recensera jusqu'à un maximum de 295 cas pour 1000 durant l'été, en juillet 1943, poussant le commandement militaire à mettre en place des centres médicaux spécifiquement dédiés, à éditer des manuels de prévention et construire des quartiers équipés de lits refroidis permettant ainsi de baisser cette incidence à 41 pour 1000 en juillet 1944 (Bricknell, 1995).

Cette expérience acquise au fil des années, a permis aujourd'hui de trouver au sein de l'armée la base de données la plus fiable et précise en ce qui concerne l'épidémiologie de l'hyperthermie d'effort. Ainsi, dans son rapport de surveillance annuel, l'armée américaine, donne une incidence de 0.4 par 1000 personnes dans ses effectifs (Périard et al., 2022). Dans l'armée française, les données sont moins récentes et il a été rapporté une incidence de 34 pour 100 000 (Sagui et al., 2015a).

Mais l'hyperthermie d'effort constitue aussi dans les populations civiles un problème de santé publique.

La difficulté dans l'étude épidémiologique de l'hyperthermie d'effort dans le sport et dans la population civile réside principalement sur le manque de cohérence dans l'utilisation des mots utilisés pour définir les différentes conditions pathologiques liées à la thermorégulation ou à l'exposition à la chaleur mais aussi sur la variabilité épidémiologique selon le sport (Périard et al., 2022).

On sait aujourd'hui que la population à risque est constituée de personnes jeunes avec une moyenne d'âge de 30 ans pratiquant une activité physique à un niveau professionnel ou amateur. Dans le domaine sportif, une grande partie des études nous vient des Etats-Unis due à l'importance qu'occupe le sport universitaire dans la société américaine. Les études montrent que la discipline la plus impactée est le football américain avec un risque 11 fois plus élevé (Kerr et al., 2013). Ceci s'explique entre autre par les nombreuses couches de protection qu'ils portent formant un microclimat ne favorisant pas la dissipation de la chaleur mais aussi entraînant une augmentation du métabolisme et de la thermogénèse. Les positions souvent statiques dans ce sport ne permettant pas les échanges avec l'environnement jouent aussi un

Introduction

rôle (Deren et al., 2014; Périard et al., 2022). Les données existantes font état d'une incidence entre 1 à 42 cas pour 10 000 athlètes exposés. En comparaison, dans le football (ou soccer comme ils disent) et dans le hockey l'incidence est en moyenne de 1 cas pour 10 000. Il ressort également que la sur-motivation peut être un facteur aggravant avec un risque 2.6 fois plus élevé en compétition qu'en pratique récréationnelle. Mais là où on retrouve les incidences les plus élevées sont les sports d'endurance que sont la course à pieds et le vélo avec respectivement 674 et 401 cas pour 10 000 athlètes exposés (Gamage et al., 2020; Périard et al., 2022). Néanmoins, ces données restent imprécises car englobant tout le spectre des conditions allant de la crampe, la fatigue musculaire à la crise d'hyperthermie due à l'exercice. Mais des études plus récentes sur différents marathons font état d'une incidence entre 3 et 21 cas pour 10 000.

Ce qui peut aussi être noté, c'est que l'incidence est plus importante sur des courses de courte distance. L'explication en est que l'effort fourni est plus élevé de même que la production de chaleur métabolique (Périard et al., 2022).

Les différences de risque en fonction du sexe ont été étudiées. Une étude de trois ans sur le marathon de Boston, a montré une incidence 5 fois plus élevée chez les hommes (Divine et al., 2018). Mais sur d'autres études, on ne retrouve pas une sensibilité plus élevée en fonction du sexe (Giersch et al., 2023). Mais certainement il y a là un biais lié au nombre de femmes participant à ces événements.

En dehors des athlètes et des militaires, les travailleurs extérieurs, notamment les ouvriers du bâtiment, les travailleurs agricoles et les jardiniers, sont particulièrement vulnérables aux maladies liées à la chaleur, y compris l'HE, car ils travaillent souvent dans des conditions chaudes et humides pendant de longues périodes. Cependant, les données épidémiologiques manquent concernant ces populations. On peut néanmoins citer comme exemple de population civile en dehors du sport particulièrement à risque, les pèlerins de la Mecque (ville la plus sainte de l'Islam) en Arabie Saoudite, lors du Hajj (pèlerinage annuel pour les musulmans). De par le climat chaud et humide de la région et les exigences physiques en lien avec le pèlerinage, des cas d'HE sont régulièrement rapportés. Ainsi, l'évaluation de l'incidence entre 2002 et 2018 montre qu'elle varie entre 0.18 et 35.97 par 100 000 pèlerins (Seroji, 2024).

Introduction

En somme, il en découle de ces études que la physiopathologie de l'hyperthermie d'effort est liée à un défaut de la thermorégulation avec des facteurs extrinsèques et intrinsèques pouvant augmenter le risque (Périard et al., 2022).

d) Signes cliniques et complications

Le tableau clinique de l'hyperthermie d'effort peut être divisé en deux parties, la phase prodromique annonçant la survenue de la crise et la phase d'état ou la crise à proprement parler.

Les résultats d'une étude, par questionnaire, conduite sur 466 sujets ayant été diagnostiqués HE sur la période 2004 – 2010 dans l'armée française (Sagui et al., 2015) nous dessinent le tableau clinique d'une crise d'hyperthermie d'effort.

Ainsi, la phase prodromique se manifeste dans au moins 50% des cas par différents symptômes dont les plus fréquents sont les nausées et vomissements puis la sensation de fatigue, de soif intense et une marche titubante. Dans une moindre mesure, les patients rapportent des céphalées, un rétrécissement du champ de vision, une irritabilité et une sensation de tête vide. Ces signes doivent alerter et justifient l'arrêt immédiat de l'effort physique en cours pour prévenir la phase d'état (Sagui et al., 2015b).

Puis vient la phase d'état, le sujet s'effondre avec des signes d'encéphalopathie, toujours présents dans l'HE. Ainsi, on peut dire sans signes neurologiques, il n'y a pas de diagnostic d'hyperthermie d'effort. Ces signes d'atteintes du système nerveux central sont principalement une confusion, la perte de connaissance et une crise comitiale. Une autre manifestation de cette atteinte est l'amnésie. A cela, s'ajoute une hyperthermie avec une température centrale supérieure à 40.5°C et dans quelques cas une hypotension artérielle est aussi rapportée (Sagui et al., 2015b).

La mesure de la température peut varier en fonction du délai et de la méthode. Ainsi, une étude évaluant la précision de différents appareils de mesure de la température par voie orale, axillaire, auriculaire, gastro-intestinale, frontale, temporale et rectale a montré que la forme de mesure la plus efficace reflétant la température centrale est au niveau rectal (Casa et al., 2007).

Donc, le diagnostic peut être posé pour une personne jeune en relative bonne santé ayant une hyperthermie au-delà de 40.5°C s'accompagnant d'une encéphalopathie au cours ou décours

Introduction

d'un effort physique intense et prolongé. Au niveau biologique, on note aussi une rhabdomyolyse avec une augmentation du taux plasmatique de créatine phosphokinase pouvant atteindre 100 000UI/L dans certains cas (Abriat et al., 2014; Sagui et al., 2015b).

Les complications à long terme de l'HE sont un domaine de recherche critique, car ils peuvent avoir un impact significatif sur la qualité de vie des survivants. Des études ont indiqué que l'HE peut entraîner des complications neurologiques et cardiovasculaires persistantes, qui peuvent rester inchangées même un à deux ans après l'événement (Bouchama et al., 2022).

Sur le plan neurologique, l'HE a été associée à des lésions de certaines régions cérébrales, telles que le cervelet, l'hippocampe, le mésencéphale et le thalamus. Ces lésions peuvent entraîner des déficiences cognitives et neurologiques fonctionnelles. La perte de cellules de Purkinje dans le cervelet, en particulier, a été observée, entraînant une infirmité grave. Les mécanismes de cette vulnérabilité due à l'hyperthermie ne sont pas entièrement compris et nécessitent une enquête plus approfondie (Yang et al., 2017).

Les complications cardiovasculaires sont également une préoccupation, les études rétrospectives montrant que l'HE peut augmenter le risque de mortalité toutes causes confondues, en particulier des maladies cardiovasculaires. Une étude de suivi de 14 ans a rapporté une incidence quatre fois plus élevée d'événements cardiovasculaires majeurs et une incidence 5,5 fois plus élevée d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques chez les patients atteints d'HE. Des études précliniques chez la souris ont montré que le myocarde pourrait être sujet à un trouble métabolique émergent lent après l'HE, pouvant entraîner des problèmes cardiovasculaires à long terme (Laitano et al., 2020; Schermann et al., 2018; Stearns et al., 2020).

De plus, il existe un risque accru d'un deuxième épisode d'HE chez ceux qui ont déjà vécu cette expérience, les données cliniques suggérant que 4,1 à 15,4 % des patients ayant eu un HE ont signalé un épisode antérieur jusqu'à 2 ans auparavant. Il n'est pas clair si une blessure cardiovasculaire préexistante joue un rôle dans ce risque de récurrence (Abriat et al., 2014; Stearns et al., 2020).

Ainsi, il y a le besoin de recherches supplémentaires pour comprendre pleinement les conséquences à long terme de l'HE. Cela inclut l'identification de facteurs de risque génétiques,

Introduction

de biomarqueurs pour une reconnaissance précoce, le développement de stratégies ciblées de protection cérébrale et la conception de thérapies spécifiques pour atténuer les effets à long terme de l'HE.

e) Evaluation et prise en charge

La reconnaissance rapide d'une crise HE est cruciale pour minimiser le temps entre l'effondrement et le début du refroidissement corporel complet, ce qui est associé à de bons résultats cliniques. L'évaluation initiale doit également inclure une évaluation des signes vitaux, de la réactivité et des signes de récupération. Il est important de noter que l'HE nécessite un traitement immédiat, et le refroidissement précoce sur place est priorisé par rapport au transport vers un établissement médical (DeGroot et al., 2022).

Le diagnostic repose donc sur la capacité à reconnaître les signes cliniques prodromiques comme les nausées et vomissements puis la sensation de fatigue, de soif intense et une marche titubante afin de mettre en place immédiatement le processus de refroidissement d'où la nécessité de la prévention pour mieux informer les personnes concernées, athlètes, entraîneurs etc... Aux Etats Unis, où le sport universitaire est très impacté, est mis en place un protocole de prise en charge rapide pour réduire les risques de complications et faciliter le retour à l'activité des athlètes. Ainsi, l'évaluation et la prise en charge sur le terrain en cas de suspicion de crise HE comprennent 4 étapes (Roberts et al., 2023) :

- La reconnaissance des signes prodromiques avec l'altération du SNC : confusion, délire, désorientation.
- Les premiers gestes d'urgence : déplacer à l'ombre, retirer les vêtements et équipements superflus, vérifier les signes vitaux et la température rectale, évaluer l'état mental et appeler le personnel médical et les services d'urgence.
- La mise en place d'un refroidissement agressif sur place : « refroidir d'abord transférer ensuite ». L'immersion dans de l'eau glacée particulièrement efficace pour le refroidissement corporel global dans des conditions chaudes et humides est la méthode préférée lorsque cela est possible. D'autres méthodes de refroidissement, telles que l'application de serviettes imbibées d'eau froide sur le tronc, les extrémités et la tête, ainsi que l'utilisation de packs de glace dans le cou, les aisselles et l'aîne, sont également

Introduction

couramment utilisées pour réduire la température corporelle en cas d'hyperthermie d'effort.

- Enfin, le transfert vers un établissement médical, poursuite du refroidissement, surveillance des signes vitaux et voies respiratoires, limiter les intraveineuses en cas d'hyponatrémie.

Le retour à l'activité pour les athlètes se fait selon un protocole supervisé par un médecin. Pendant la récupération médicale, les activités de la vie quotidienne sont autorisées, suivies d'une augmentation progressive de l'activité physique dans des conditions de faible stress thermique. Cette progression se fait sous la supervision d'un médecin et d'un entraîneur sportif, et inclut des exercices aérobiques confortables dans des environnements frais. Ensuite, l'athlète progresse vers des exercices aérobiques plus intenses et des activités sportives spécifiques, tout en s'acclimatant progressivement à la chaleur évaluée grâce à des tests de tolérance à la chaleur (Roberts et al., 2023).

L'approche pharmacologique dans la prise en charge de l'HE n'existe pas encore, bien que ce soit un domaine de recherche actif. Le dantrolène sodique (DS) utilisé pour traiter l'hyperthermie maligne peranesthésique a été testé. Cependant, son efficacité pour traiter l'hyperthermie d'effort est encore débattue, avec des résultats contradictoires et des effets secondaires négatifs potentiels tels que la faiblesse musculaire, la perte de coordination et les arythmies cardiaques. Bien que certains auteurs rapportent que le DS est un traitement plus efficace pour l'HE que le refroidissement passif, ce constat n'est pas universel. Ainsi, bien que le DS soit largement utilisé pour traiter la HM, son utilisation pour l'HE reste une question en suspens (Laitano et al., 2020b).

f) Physiopathologie de l'hyperthermie d'effort

L'hyperthermie d'effort est une pathologie associée à un défaut de la thermorégulation. Donc pour mieux comprendre la pathophysiologie, il est nécessaire d'évoquer les mécanismes qui sous-tendent la régulation de la température centrale du corps mais aussi les conséquences d'une rupture de l'homéostasie thermique (Bouchama et al., 2022; Filep et al., 2020; Laitano et al., 2019a; Yeo, 2004b).

Introduction

Évènements physiopathologiques dans l'HE

Le stress thermique entraîné par une crise d'hyperthermie joue un rôle dans la cytotoxicité, la protéotoxicité, l'altération de la membrane cellulaire et aussi peut entraîner une dégradation de l'ADN. Les cellules meurent alors par nécrose et apoptose (Bouchama et al., 2022). Les débris cellulaires ainsi générés entraînent une inflammation avec libération de cytokines. L'autre facteur participant à cet épisode inflammatoire est la perméabilité de la paroi intestinale. La muqueuse intestinale protège des bactéries du microbiote. La réduction du débit splanchnique entraînée par la redistribution du sang des viscères vers la peau, entraîne une ischémie, une déplétion en ATP, une acidose et une hypoxie qui fragilisent la muqueuse. Ces évènements favorisent une infiltration de microorganismes dans la circulation systémique et déclenchent une réaction inflammatoire systémique (Yeo, 2004a). C'est le syndrome inflammatoire systémique qui entraîne une fièvre qui s'ajoute à l'hyperthermie et participe aux lésions multiviscérales observées chez les patients souffrant d'hyperthermie d'effort (Bouchama et al., 2022). Ainsi, sur des modèles animaux d'hyperthermie, l'utilisation d'anti-inflammatoires comme des corticostéroïdes ou l'utilisation de la protéine C activée ont montré un effet protecteur contre l'inflammation, la perméabilité intestinale et les lésions des organes (Chen et al., 2006; Garcia et al., 2020).

Il a été montré une certaine tolérance à la chaleur chez certains athlètes bien entraînés et acclimatés avec des températures centrales supérieures à 41°C relevées en fin de course sans séquelles observées (Byrne et al., 2006). Cette tolérance est médiée par des modifications épigénétiques notamment sur l'expression des protéines de choc thermique (HSP) (Horowitz, 2016). Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur des protéines HSP sur une cohorte de sportifs a montré des lésions de la barrière intestinale et aussi une température centrale plus élevée comparée aux sujets contrôles sous placebo (Kuennen et al., 2011).

On note aussi une coagulopathie qui existe aussi dans le coup de chaleur classique. Sur des modèles primates ou encore des patients ayant souffert de coup de chaleur classique, il a été montré des lésions de l'endothélium de nombreux organes comme le cœur, l'intestin, le rein, le foie ou encore les poumons. Ces lésions participent à la coagulopathie et au syndrome inflammatoire en favorisant la libération d'antigène de facteur de von wilbrand, de fibrine, de

Introduction

plaquettes activées et de leucocytes (al-Mashhadani et al., 1994; Bouchama et al., 2022). Néanmoins, le syndrome inflammatoire persiste sur des modèles primates traités avec un inhibiteur du facteur tissulaire (al-Mashhadani et al., 1994).

Dans le cadre de l'hyperthermie due à l'effort intense et prolongé, un taux élevé de la créatine kinase plasmatique reflétant la rhabdomyolyse est fréquemment associé à la maladie. Le muscle squelettique réutilise seulement 20% de l'énergie métabolique produit au cours d'un exercice physique et 80% de cette énergie est alors libérée sous forme de chaleur (Yeo, 2004b). Ainsi, le muscle est en moyenne 1°C au-dessus de la température centrale (Bouchama et al., 2022). Cette température élevée entrainerait une tension musculaire constante due à une augmentation du calcium mais aussi d'espèces réactives de l'oxygène. Ce stress oxydatif est la conséquence de l'ischémie du muscle squelettique due à la réduction du flux sanguin lors d'un exercice prolongé (González-Alonso et al., 1998; Yeo, 2004b). Cette tension constante fragilise la membrane des cellules musculaires entraînant ainsi la rhabdomyolyse. Cette dernière peut être mise en lien aussi avec l'acidose métabolique dans le muscle squelettique due à la glycolyse ou encore à l'incapacité du foie à éliminer l'acide lactique (Yeo, 2004b).

Le mécanisme par lequel le système nerveux central est atteint, n'est pas très bien compris. Mais des études sur le rat ont montré une ischémie cérébrale (Yeo, 2004b). Une autre théorie c'est que l'hypocalcémie, attribuée à la rhabdomyolyse, une hyponatrémie et une hypoglycémie constatées sur des marathoniens pourrait entraîner un dysfonctionnement du système nerveux central (Yeo, 2004b).

En somme, l'hyperthermie entraîne un syndrome inflammatoire systémique dû à sa cytotoxicité. Ce qui forme une boucle entretenant la thermogénèse. L'impact au niveau musculaire se traduit par une rhabdomyolyse qui avec l'inflammation entraîne les lésions multiviscérales avec une insuffisance rénale et hépatique pouvant être fatale (**Figure 10**).

Même si on a une meilleure compréhension de la physiopathologie, la connaissance sur les causes sous-jacentes est encore très floue.

Introduction

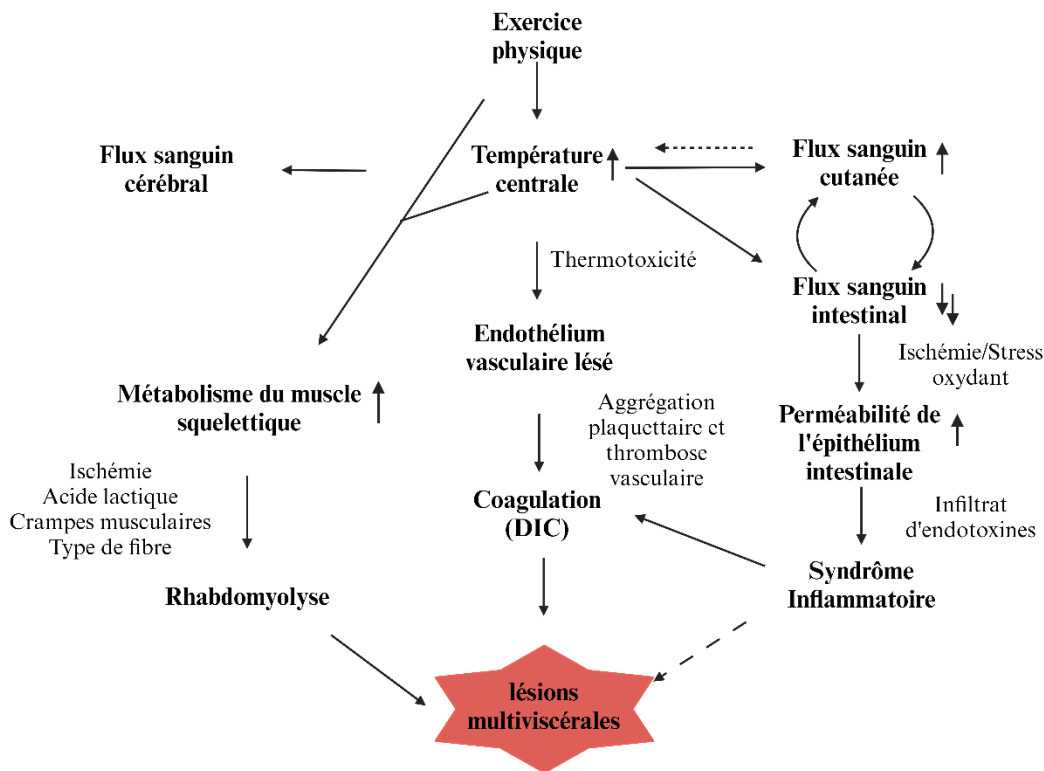


Figure 10 : Pathophysiologie de l'hyperthermie d'effort. Progression des réponses physiologiques « normales » au stress lié à l'exercice, qui peut évoluer vers des réponses physiopathologiques qui aboutissent à une hyperthermie avec défaillance du système multiviscéral (Laitano et al., 2019a)

Quel rôle pour le muscle squelettique

Le muscle squelettique qui représente 40% de la masse corporelle totale, est l'organe sollicité par excellence au cours d'un exercice physique. Son rôle dans la production de chaleur pendant une activité physique est connu depuis le début du 20^e siècle, étant l'objet du prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1922. Cette thermogenèse musculaire repose entre autres sur le fait que l'énergie générée par la contraction musculaire n'est réutilisée qu'à hauteur de 20% pour produire de l'ATP et que 80% sont dissipés sous forme de chaleur (Laitano et al., 2021). Le muscle squelettique est donc vu comme un acteur important dans la pathogenèse de l'hyperthermie d'effort.

Introduction

L'hypothèse d'un rôle potentiel du muscle squelettique dans l'étiologie de l'hyperthermie d'effort prend sans doute son origine dans son implication dans la survenue de l'hyperthermie maligne.

Hyperthermie d'effort et Hyperthermie maligne peranesthésique : le calcium dans tous ses états

Le lien entre les deux pathologies est suggéré depuis le début des années 90 quand le test de contracture *in vitro* (IVCT) utilisé pour déterminer la susceptibilité à l'HM a également donné des résultats anormaux chez des sujets avec une hyperthermie d'effort (Hopkins et al., 1991a). Ainsi, une étude sur 192 patients HE a montré que le test IVCT était dans 66% des cas anormal (Kozak-Ribbens et al., 1999). Une seconde étude réalisée sur 145 patients, recrutés au sein de l'armée française, a montré un IVCT anormal chez 45.6% des sujets (Sagui et al., 2015a). C'est le premier lien établi entre les deux conditions suggérant une implication musculaire dans l'hyperthermie d'effort par l'altération du couplage excitation-contraction. Il est néanmoins important de dire que la forte sensibilité et le manque de spécificité des test IVCT peuvent aboutir à des faux positifs (Laitano et al., 2019b). Des études ont aussi montré que des taux élevés de créatine phosphokinase peuvent mener à des IVCT anormaux chez des patients avec des myopathies sans lien avec le HM (Paasuke and Brownell, 1986).

Un deuxième lien est l'existence de l'hyperthermie maligne dite « éveillée », une forme très similaire à l'hyperthermie d'effort (de la Bastaie and Poujol, 1978). C'est une crise HM car en lien avec des mutations caractérisées dans cette maladie mais la crise se fait sans exposition aux anesthésiques halogénés mais due à un stress qui peut être physique, environnemental ou psychologique (Groom et al., 2011). Ainsi, plusieurs cas fatals de cette forme de HM ont été rapportés, dont celui d'un garçon de 12 ans avec un antécédent de HM sous anesthésie et qui plus tard a succombé lors d'un match de foot à cette forme dite « éveillée » (Lavezzi et al., 2013; Tobin et al., 2001). Cette situation pathologique a aussi été mise en lien avec des mutations HM identifiées sur *RYR1* notamment dans un modèle préclinique porcin (Laitano et al., 2020b). Une étude réalisée sur les souris *RYR1*^{Y522S/WT}, modèle HM, qui lorsqu'elles sont mises dans des conditions de stress physique avec un exercice forcé de 30 minutes à 30 m/min développe une hyperthermie maligne donc dite « éveillée » qui est prévenue par l'injection en

Introduction

amont d'azumolene, antagoniste *RYR1* (Michelucci et al., 2017). Néanmoins, plusieurs différences avec l'hyperthermie effort sont à noter. On peut citer l'inefficacité du bain d'eau froide contrairement à l'utilisation du traitement de référence du HM, le dantrolène antagoniste *RYR1*, dans ces cas. Les signes prodromiques de cette forme de HM qui se manifestent par des crampes et des contractions généralisées sont aussi à souligner comme différence avec l'hyperthermie d'effort (Laitano et al., 2019b, 2020b) (**Tableau 6**).

La rhabdomyolyse, lyse du tissu musculaire avec déversement dans le système circulatoire de protéines comme la myoglobine ou la créatine phosphokinase, est un syndrome clinique souvent associé à la survenue de l'hyperthermie maligne peranesthésique (Wappler and Fiege, 2000). Dans ce cas, la rhabdomyolyse peut être mise en lien avec deux processus physiologiques. D'une part, l'hypercontracture traumatique qui accompagne l'HM, due à un bolus anormal de calcium libéré dans le cytosol, entraînant mécaniquement une fragilité et la destruction de la fibre musculaire. Cet excès de calcium entraîne aussi un métabolisme exacerbé avec hyper hydrolyse d'ATP qui aboutit à une acidose métabolique responsable de la nécrose et l'apoptose cellulaire menant à la rhabdomyolyse (Bendahan et al., 1998; Rosenberg et al., 2015). D'autre part, l'augmentation plasmatique de la créatine phosphokinase, reflétant la rhabdomyolyse, est aussi un signe clinique observé dans l'hyperthermie d'effort (Bouchama et al., 2022; Sagui et al., 2015a; Shieh et al., 1995). Ce défaut métabolique, symbolisé par une acidose dans ces deux maladies, est plus marqué que chez des sujets contrôles comme le rapporte Bendahan et al., 2001.

Introduction

Tableau 6 : Comparaison hyperthermie d'effort et hyperthermie maligne

Critère	Hyperthermie Maligne (HM)	Hyperthermie d'Effort (HE)
Déclencheurs	Agents anesthésiques volatils et relaxants musculaires.	Exercice physique intense, chaleur environnementale, humidité.
Génétique	Mutations dans RYR1 (majoritairement), CACNA1S (moins).	Variants dans RYR1 et autres gènes liés au métabolisme musculaire et à la thermorégulation (moins bien établis).
Symptômes principaux	Hyperthermie, rigidité musculaire, rhabdomyolyse, acidose, hypercarbie, hyperkaliémie.	Hyperthermie, épuisement, déshydratation, altération de la conscience, rhabdomyolyse (dans les cas sévères).
Traitement	Dantrolène, mesures de support, refroidissement.	Refroidissement rapide (immersion en eau froide), réhydratation, mesures de support.
Prévention	Évitement des agents déclencheurs, utilisation d'anesthésiques alternatifs.	Acclimatation à la chaleur, hydratation adéquate, ajustement de l'exercice.
Physiopathologie	Dysfonction du canal de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique.	Stress thermique et métabolique, déshydratation, dysfonctionnement de la thermorégulation (moins bien compris).
Diagnostic	Histoire clinique, test de contracture à la caféine-halothane, tests génétiques.	Diagnostic clinique basé sur les symptômes et les circonstances, absence de test spécifique.
Incidence	Rare, liée à l'exposition aux agents déclencheurs.	Plus fréquent, surtout chez les athlètes et dans des conditions environnementales extrêmes.
Gestion aiguë	Arrêt de l'anesthésie, administration de dantrolène, stabilisation vitale.	Cessation de l'activité physique, refroidissement actif, stabilisation vitale.
Conséquences	Peut être fatale sans traitement rapide et adéquat.	Peut être fatale sans intervention rapide, surtout en cas de retard de refroidissement.

Introduction

Métabolisme, déplétion énergétique et acidose

L'augmentation du taux métabolique au cours d'un exercice physique peut atteindre 100 fois le niveau du métabolisme basal, d'où la nécessité de la resynthèse d'ATP tout le long de l'activité physique (Hargreaves and Spriet, 2020). L'ATP joue un rôle clé dans le fonctionnement de nombreuses enzymes impliquées dans l'excitabilité membranaire (la pompe Na^+/K^+), dans la recapture du Ca^{2+} (les pompes SERCA) et sur le glissement des têtes de myosines sur l'actine (Marty and Fauré, 2016). Ces processus sont des acteurs majeurs de la thermogénèse musculaire lors d'un exercice. Ainsi, l'emballement métabolique ou son altération peuvent aboutir, comme c'est le cas dans l'hyperthermie maligne, à une surproduction de chaleur qui non compensée mène à l'hyperpyrexie (Bourdon and Canini, 1995). Donc, le métabolisme des muscles squelettiques pendant l'exercice implique l'activation de voies métaboliques pour maintenir la resynthèse de l'ATP. Ces voies incluent la dégradation de la phosphocréatine et du glycogène musculaire pour le métabolisme anaérobie et aérobie respectivement (Hargreaves and Spriet, 2020). Les ions calcium participent également à ce processus *via* le couplage excitation – métabolisme. Le calcium transporté dans la mitochondrie par l'uniporteur de calcium mitochondrial (MCU) participe à l'oxydation des acides gras pour produire de l'ATP. Il favorise l'activité des enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras, telles que l'isocitrate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase (Gonzalez et al., 2012). Ainsi, le calcium est au centre du métabolisme dans le muscle squelettique et l'altération du processus de couplage excitation - contraction aboutit à des myopathies notamment des pathologies métaboliques comme l'hyperthermie maligne.

Les défauts métaboliques dans le cadre de l'HM ont été étudiés. L'étude réalisée sur les modèles murins HM, *RYR1*^{WT/Y522S} et les souris avec une invalidation de *CASQ1*, montre une accélération de leurs métabolismes au repos et au cours d'un stress thermique (Serano et al., 2022). Dans cette étude, ces souris ont une prise de nourriture plus importante associée à une consommation en oxygène au repos entre 25 et 40% plus élevée que chez les contrôles. Ces différences sont encore plus significatives lorsque les souris sont soumises à un stress thermique, exposition à une température de 37°C pendant 20min pour les *RYR1*^{WT/Y522S} et de 41°C 20min pour les souris KO *CASQ1*. On note également une altération des mitochondries

Introduction

qui apparaissent gonflées et avec une matrice claire en microscopie électronique (Chang et al., 2019; Serano et al., 2022). Une étude évaluant un moyen diagnostique moins invasif que l'IVCT, a identifié un hypermétabolisme avec une acidification intracellulaire importante chez des sujets HM. En effet, des lymphocytes B issus de patients HM, exprimant aussi le récepteur RyR1, ont été stimulés avec du 4-chloro-m-cresol (4-CmC), un activateur de RyR1. La mesure du pH dans le milieu extracellulaire montre une acidification significativement plus importante que chez des cellules contrôles (Hoppe et al., 2016).

Dans le cadre de l'hyperthermie d'effort, des défauts métaboliques ont aussi été identifiés. Ainsi, des études rétrospectives ont montré qu'une acidose métabolique était associée à l'HE dans 83 à 93.3% des cas (Bouchama and De Vol, 2001; Tham et al., 1989). Une étude sur des militaires français ayant expérimentés un épisode d'hyperthermie d'effort et avec un IVCT anormal, a aussi montré une chute précoce et significative du pH intracellulaire dans le muscle squelettique lorsqu'ils sont soumis à un exercice physique (Bendahan et al., 2001). Néanmoins, lorsque le recrutement des sujets n'est pas en lien avec la présence d'un test IVCT anormal, cette différence n'est pas significative (Payen et al., 1992).

Ces défauts métaboliques sont aussi à mettre en parallèle avec les différents types de fibre. Une étude sur des patients HE a ainsi montré une prédominance des fibres musculaires de type II. L'étude a porté sur 37 jeunes recrues militaires souffrant d'HE, et a révélé que 24 d'entre eux ont développé une rhabdomyolyse, dont 18 présentaient une prédominance des fibres de type II dans leur biopsie musculaire. Les patients avec une prédominance des fibres de type II ont montré une tendance à avoir une concentration de lactate sanguin plus élevée et à atteindre plus rapidement le seuil de lactate sanguin pendant un test sur tapis roulant. Les fibres de type II sont à contraction rapide et glycolytiques, ce qui signifie qu'elles dépendent davantage du métabolisme anaérobie et ont une plus faible capacité de transport du glucose (Hsu et al., 1997).

L'acidose métabolique constatée dans l'hyperthermie d'effort, est mise en lien avec une augmentation de la glycogénolyse pour compenser une concentration anormale de Ca^{2+} dans le cytosol (Bendahan et al., 2001). Cette chute précoce du pH est aussi associée à l'hyperthermie maligne, (Bendahan et al., 1998) venant alimenter une fois de plus une implication musculaire et le lien supposé entre les deux maladies.

Introduction

Facteurs de risque

Une méta-analyse de 42 papiers portant sur l'HE, a permis à Westwood et al., 2021 d'identifier plusieurs facteurs de risque individuels associés à l'HE. Ces facteurs comprennent des caractéristiques individuelles telles que l'âge, ainsi que des conditions de santé telles que l'hypohidrose, l'hyperthermie maligne, la production altérée de cytokines, la prédominance des fibres musculaires de type II, les brûlures, la sympathectomie et le trait drépanocytaire. Des facteurs environnementaux tels que l'accumulation de la charge thermique, la température élevée et des facteurs organisationnels tels que la branche des forces armées et le grade du personnel ont également été identifiés comme des facteurs de risque. En outre, des facteurs liés au mode de vie tels que le surpoids, le manque de condition physique, le tabagisme, la consommation d'alcool, l'utilisation de cocaïne et le manque d'acclimatation à la chaleur ont été associés à un risque accru d'hyperthermie d'effort.

g) Génétique

Chez l'homme

Actuellement il y a très peu de données sur la prédisposition génétique à l'hyperthermie d'effort. Les seules études existantes avaient pour objectif de montrer le lien qui existe entre l'hyperthermie d'effort et l'hyperthermie maligne peranesthésique. Ainsi, deux acteurs du CRC, RyR1 et la junctine, impliqués dans l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique ont été identifiés mutés chez des patients HE. La junctine est codée sur le locus génomique humain A β H-J-J ou *ASPH*, qui code pour trois protéines fonctionnellement distinctes : l'enzyme aspartyl- β -hydroxylase (A β H), la protéine structurale junctine et la protéine de liaison au calcium junctate (Feriotta et al., 2006).

La prédisposition génétique dans le cas de l'hyperthermie d'effort est un sujet longtemps débattu reposant sur les similarités avec l'HM, une maladie génétique dominante. Malgré l'intérêt, très peu d'études mettant en évidence des facteurs de prédisposition génétique ont été publiées dans le cadre de l'hyperthermie d'effort.

Le séquençage d'exomes sur une cohorte de 15 soldats ayant subi une HE documentée, a permis d'identifier deux variants pathogènes sur le gène *TRPV1*, p.(Gly684Val) et

Introduction

p.(Arg772Cys). Des études fonctionnelles *in vitro* ont révélé que ces mutations induisaient une modification importante de la réponse du canal TRPV1 à l'agoniste naturel, la capsaïcine, les mutations rendant le canal moins sensible. L'étude des relâchements de calcium montre une réponse atténuée voire abolie par les mutations identifiées (Bosson et al., 2020).

Une autre étude a été réalisée sur une cohorte hétérogène composée de patients hyperthermie d'effort et hyperthermie maligne. Le séquençage complet de l'exome ou du génome de 103 individus a été fait avec une analyse sur une liste de 22 gènes candidats associés au couplage excitation-contraction. Au total, 48 variants rares ont été identifiés, dont 35 se trouvaient dans les gènes *RYR1* ou *CACNA1S*. Trois patients présentaient des variants rares dans l'isoforme junctine du gène *ASPH*, p.(Val54Ala), p.(Lys88Thr), p.(Asp149His) et p.(Lys202Arg). La caractérisation phénotypique faite sur des cellules C2C12 modifiées par CRISPR-cas9 a montré une augmentation des relâchements de calcium par RyR1. Le modèle poisson-zèbre transgénique exprimant les variants p.(Val54Ala) et p.(Lys88Thr) de junctine a montré une réduction significative des capacités de nage après exposition à la chaleur et à la caféine. De plus, ces poissons ont présenté une production significativement accrue de radicaux libres oxygénés (ROS) en réponse à la chaleur et à la caféine (Endo et al., 2022).

Modèle animal

Aujourd'hui, il n'existe pas de modèle génétique d'hyperthermie d'effort. Néanmoins, un modèle murin basé sur l'épuisement dû à l'effort a été développé pour étudier les impacts de l'effort intensif dans des conditions environnementales extrêmes.

Un protocole a été développé pour un modèle préclinique de HE chez la souris, qui évite les contraintes communes comme l'anesthésie et l'utilisation de sondes rectales. Le modèle utilise des souris C57Bl/6 équipées de sondes télémétriques pour mesurer la température centrale, et comprend une phase d'accoutumance des souris à la roue de course pendant trois semaines. Les souris sont ensuite soumises à l'exercice dans une chambre climatique réglée à 37,5 °C et 40-50 % d'humidité relative, jusqu'à l'apparition de symptômes limitants, comme la perte de conscience, à une température centrale de 42,1-42,5 °C. Le protocole permet de varier la sévérité de l'exposition en modifiant le temps passé dans la chambre chauffée. Les résultats obtenus avec ce modèle reflètent les événements pathophysiologiques de l'HE chez l'humain,

Introduction

y compris l'hyperthermie sévère, les dommages multi-organes, et les réponses inflammatoires et immunitaires (King et al., 2021).

L'étude de ce modèle a permis de mettre en évidence plusieurs observations. Ainsi, l'étude comparant les réponses des souris mâles et femelles au protocole d'hyperthermie due à l'effort, met l'accent sur les différences de tolérance à l'exercice, de thermorégulation et de réponses cytokiniques. Les différences observées dans l'étude portent sur la réponse au stress thermique entre les souris mâles et femelles. Les résultats montrent que les femelles ont une plus grande capacité de travail aérobie que les mâles. De plus, les femelles ont résisté à des élévations de température corporelle tout en augmentant leur vitesse de course et leur production de puissance mécanique, ce qui leur a permis d'atteindre des vitesses de course plus élevées et de parcourir des distances plus importantes au cours de l'expérience. En outre, des différences significatives ont été observées dans les niveaux de corticostérone plasmatique entre les souris mâles et femelles immédiatement après le stress thermique et tout au long de la phase de récupération. Enfin, les femelles ont également démontré des réponses immunitaires spécifiques qui n'ont pas été observées chez les mâles (Garcia et al., 2018a).

Ils ont également évalué les conséquences à long terme de ce stress thermique mimant l'HE. Chez les femelles, après 14 jours de récupération, il y a eu une augmentation significative des acides gras libres, des céramides et des diacylglycérols dans le myocarde, ainsi qu'un déplacement de la glycolyse vers les voies du phosphate de pentose et de la déshydrogénase glycérol-3-phosphate. Des signes de stress oxydatif, de lésions tissulaires et d'inflammation interstitielle microscopique ont été observés (Laitano et al., 2020a). Pour comprendre ces différences entre les sexes, ils ont étudié l'impact de la castration. La conclusion principale de cette recherche est que la castration n'a pas eu d'impact significatif sur les niveaux absolus de performance à l'exercice dans la chaleur ou sur la résistance à la survenue de l'HE dans ce modèle préclinique (Garcia et al., 2022).

Les études musculaires montrent que l'hyperthermie peut amplifier la réponse de l'IL-6 dans les cellules musculaires, en particulier lors de l'exposition à des températures modérément élevées, telles que celles observées pendant la fièvre ou pendant un exercice musculaire intense (Welc et al., 2016). Ce modèle a aussi permis d'étudier les facteurs permettant d'apprécier le

Introduction

retour au sport pour les patients HE. Ainsi, ils ont étudié les conséquences d'épisodes successifs de stress thermique (HE). L'expérience a utilisé des souris femelles C57BL/6 soumises à deux épreuves de stress thermique ou à un exercice témoin (EXC) avec deux semaines d'intervalle. Les résultats ont montré qu'après le premier épisode de HE, les groupes HE-EXC et HE-HE ont présenté une réduction significative de la force maximale, observée 24 heures et une semaine après l'exposition. Après le second HE, la force, la rotation horizontale, le tonus des membres postérieurs, l'écart des membres postérieurs suspendus et la morsure provoquée ont continué à diminuer dans le groupe HE-HE (Alzahrani et al., 2022). Pour finir, ils ont également montré qu'après un stress thermique, il y a des modifications épigénétiques de l'expression de gènes impliqués dans la myogenèse et le déterminisme des cellules satellites notamment dans la transition fibres rapides fibres lentes et de l'augmentation de l'expression dans le muscle de gènes impliqués dans l'homéostasie calcique comme *CACNA2D4* (Murray et al., 2024).

Introduction

IV. Contexte et objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail était l'étude de mécanismes physiopathologiques en lien avec l'homéostasie calcique dans le cadre de pathologies humaines. Trois projets ont été menés :

- Deux projets annexes : l'étude fonctionnelle de mutations sur *STAC3* et *CACNA1S* trouvées chez des patients avec des myopathies congénitales.
- Un projet principal : l'étude de l'implication de *CACNA2D4* dans la survenue de l'hyperthermie d'effort.

L'altération du métabolisme calcique dans le muscle squelettique comme cause de l'hyperthermie d'effort est débattue depuis des décennies du fait de la proximité physiopathologique de cette maladie avec l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM), une maladie génétique autosomique dominante. L'altération du métabolisme calcique dans le muscle squelettique due à une altération du couplage excitation-contraction est à la base de la survenue de l'HM. Cette altération est mise en évidence par le test de contracture *in vitro* (IVCT), utilisé comme outil diagnostique dans l'HM.

Chez les patients HE, ce test est anormal dans 1 cas sur 2 (Sagui et al., 2015b) renforçant l'intérêt pour l'étude du métabolisme calcique dans le muscle squelettique dans le cadre de l'hyperthermie d'effort. Cela pose aussi la question de l'existence d'une prédisposition génétique dans cette maladie.

Une cohorte homogène de 41 soldats ayant fait une crise d'hyperthermie d'effort bien caractérisée avec un test IVCT anormal a été étudiée par le biais du séquençage de leur exome. Dans un premier temps, l'étude des gènes que sont *RYR1*, *CACNA1S*, *STAC3* et *CASQ1* impliqués dans l'HM a montré une faible prévalence (Bosson, 2020). Dans un second temps, la recherche d'autres gènes par le séquençage de l'exome a permis de trouver des variants sur un même gène chez des individus non apparentés, *CACNA2D4*.

Des variants ont été identifiés sur *CACNA2D4* chez 4 patients HE non apparentés : c.897C>G p.(Ser299Arg), c.748G>C p.(Gly250Arg), c.649G>T p.(Asp217Tyr) et le variant intronique c.486+1G>A. L'étude par minigène du variant d'épissage c.486+1G>A a permis de mettre en évidence deux conséquences possibles sur l'épissage du transcrit *CACNA2D4*. Ainsi, il y a le

Introduction

saut de l'exon 4, 60 nucléotides (N143_V162del (Δ Exon4)) en phase, ou la perte de la Valine 162 (V162del (Δ V162)) (**Tableau 7**).

Le tableau clinique de ces patients est détaillé dans le **Tableau 7**. On peut ainsi noter, au moment de la crise, une température rectale supérieure à 40°C et la présence de signes de défaillances neurologiques. Les analyses ultérieures montrent des taux de CPK anormalement élevés, traduisant une rhabdomyolyse, et une sensibilité musculaire anormale à l'halothane et la caféine (test IVCT MHS positif). Enfin, on note aussi dans le muscle au niveau histologique, pour deux des sujets, des altérations légères : 1) une hypertrophie des fibres de type I avec une désorganisation intermyofibrillaire non-spécifique et 2) un pseudo-multiminicores des fibres de type I.

Donc ce travail comprend :

- La caractérisation fonctionnelle des variants identifiés sur *CACNA2D4* chez les 4 patients HE, *in vitro* (par expression dans des systèmes hétérologues) et *in vivo* grâce à un modèle murin.
- L'étude de l'expression de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique.
- Et pour finir, la caractérisation fonctionnelle des mutations sur *STAC3* et *CACNA1S*.

L'objectif de ce travail est donc :

- Une meilleure compréhension des bases moléculaires de l'homéostasie calcique.
- Une meilleure compréhension pour une meilleure prévention de l'HE chez les populations à risque notamment en établissant l'importance du facteur de prédisposition génétique. Ce qui pourrait améliorer le diagnostic préventif.
- Et finalement, ce travail permettra de mieux comprendre la relation entre l'hyperthermie d'effort et l'hyperthermie maligne peranesthésique.

Introduction

Tableau 7 : Tableau clinique des patients HE portant les mutations identifiées

Patient	HGV5c	HGV5p	Allele frequency		localization	Bioinformatic predictions			ACMG	Conservation				
			GnomAD	ExAC		SIFT	PolyPhen2	CADD Score		Mutation taster	GERP	α2β-1	α2β-2	α2β-3
3c	c.897C>G	p.S299R	/	/	MIDAS	+	+	237	+	3	5.2	C	C	C
4c	c.748G>C	p.G250R	0.0000637	0.0000964	/	+	+	32	+	3	5.3	C	C	C
5c	c.486+1G>A	p.delExon4 p.delV162	/	0.0000362	/	/	/	29	+	3	5.5	/	/	/
3b	c.649G>T	p.D27Y	/	/	/	+	+	35	+	3	5.2	NC(Ser)	C	C

Patient	Age	Gender	Family history	Personal history (General anesthesia)	Exertional Heat Stroke crisis					IVCT test					
					Body core temperature	Date of the crisis	Neurological signs	Hepatorenal failure	CPK (U/L)	Idle CPK (U/L)	Rhabdomyolysis	Status	Halothane (2%)	Caffeine (2mM)	Histopathology
3c	25	M	No	2-3 GA	40.2°C	October	Yes	Yes	3634	554	Yes	MHS	Positive (0.3g and 0.2g)	Positive (0.3g and 0.2g)	Type I fiber hypertrophy and unspecific intermyofibrillar disorganization
4c	32	M	No	1 GA	ND	June	Yes	Yes	500	ND	Yes	MHS	ND	ND	ND
5c	25	M	No	1 GA	>40°C	July	Yes	Yes	8230	308	Yes	MHS	Positive (0.3g and 0.8g)	Positive (0.23g)	Rare pseudo-multicores (type I fiber)

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Modèles murins

Les projets de recherche ont été approuvés par un comité d'éthique local (CECCAPP, enregistré sous le numéro CEEA015 par le ministère français de la recherche). Les souris ont été développées par le biais du plateau de biologie expérimentale de la souris (PBES) de l'ENS Lyon.

Les modèles murins ont été générés à l'aide du protocole CRISPR-Cas9 utilisé pour générer le modèle murin *CACNA2D4*^{WT/S306R} comme décrit dans le papier (Teixeira et al., 2018a). J'ai dessiné le sgRNA (single guide RNA) : GGACATTAGCGGCAGCATGA et l'oligonucléotide simple brin ssODN (single-stranded oligonucleotides) servant de modèle à la recombinaison homologue pour introduire la mutation p.(Ser306Arg) ou S306R :
 C*G*C*GATGATGTTACGAAGTCGTTCTCTCCCAGGGTGTCCAATATGGTGGTAA
 TGGTGTGCTTGGCGATAGCCATCCTCAGCCCCTTCATGgatCCcCTAATGTCCACCA
 GAATTACGATGTCTTTGGGA*G*A*T (en rouge la mutation d'intérêt, en vert les mutations silencieuses pour l'introduction d'un site de restriction BamHI pour des fins de génotypage et * phosphorothioate).

Dans l'optique d'étudier l'expression musculaire de *CACNA2D4*, au cours du développement de ce modèle knock-in, un modèle knock-out a également été créé par délétion d'un nucléotide dans l'exon 8 entraînant un décalage du cadre de lecture et un stop prématuré dans l'exon 8.

Les souris utilisées dans le cadre de nos études ont toutes été contrôlées sur la présence de possibles sites off-targets (mutations inattendues). Ainsi, les sites possibles ne pouvant être ségrégués situés sur le même chromosome ont été étudiés par séquençage (Teixeira et al., 2018a). Pour assainir le fonds génétique, les souris ont été backcrossées sur trois générations avant d'être utilisées dans nos études.

II. Culture cellulaire, transfection et transduction

Dans le cadre de la caractérisation *in vitro* des mutations trouvées sur *CACNA2D4* chez les patients HE, plusieurs types cellulaires ont été utilisés pour différentes expérimentations : HEK293T, COS7 et cellules satellites murines.

Matériel et méthodes

A. HEK 293T

Les HEK 293T sont cultivées dans un milieu DMEM 4,5g/L glucose contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

Dans le cadre des études d'isolation des protéines membranaires par biotinylation et de co-immunoprécipitation, les cellules sont transfectées avec le kit CalPhos (631312, TAKARA) utilisant le phosphate de calcium pour réaliser un précipité phosphate de calcium – ADN qui adhère à la surface et entre dans la cellule par endocytose. Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture 60mm à raison de 600 000 cellules pour une confluence d'environ 70% 24 heures après, au moment de la transfection. Cette dernière se fait comme suit pour une boîte 60mm. Deux solutions A et B :

Solution A : 169µL d'eau pure, 25µL de phosphate de calcium 2M et 6 µg de plasmide

Solution B : 200 µL de 2X tampon HEPES saline (HBS). La solution B est rajoutée à la solution tout en vortexant. La solution est incubée pour 15 min à température ambiante. Les boîtes sont transfectées avec 300µL du mélange final.

B. COS7

Les COS7 sont cultivées dans un milieu DMEM 4,5g/L glucose contenant 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine (PS). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂.

Ces cellules ont servi dans le cadre des études de la localisation membranaire et subcellulaire de la forme WT et mutées de *CACNA2D4*. Les cellules sontensemencées à raison de 200 000 cellules dans une boîte de 35mm avecune lamelle stérile déposée au fond. Les cellules sont transfectées avec le kit jetPRIME (101000015, Polyplus) à 60% de confluence. Dans 200µL de tampon, on ajoute 2µg de plasmide et 4µL de réactif jetPRIME. La solution est incubée 10 min à température ambiante puis déposée dans les boîtes à 48H d'incubation.

Matériel et méthodes

C. Cellules satellites murines

Les cellules satellites de souris WT ou hétérozygotes *CACNA2D4* S306R ont été isolées à partir de portées d'un jour. Protocole de dissection des cellules satellites joint en (**annexe 4**).

Les cellules sont ensemencées, dans des fluorodish ou des boîtes 35mm revêtues d'une couche de matrigel (1/100), avec une densité de 800 cellules/ μ L de milieu de prolifération composé de Ham-F10, 20% FBS, 1% PS et 1% UltroSerG pendant 3 heures pour permettre l'adhérence.

Les cellules sont mises en différenciation dans du DMEM 1g/L glucose, 2% sérum de cheval et 1% PS.

- Pour l'imagerie calcique : Après ensemencement pendant 3H pour adhérence, les cellules sont ensuite mises en différenciation pour 3 jours.
- Pour l'immunofluorescence, des cellules satellites WT sont transduites avec des lentivirus codant pour la protéine $\alpha 2\delta$ -4 WT ou mutée après 24H de différenciation. Une deuxième couche de matrigel (1/3 vol/vol dans du milieu de différenciation) est ajoutée à deux jours de différenciation pour éviter le décrochage des myotubes.

III. Biologie moléculaire

A. Etude de l'expression musculaire de *CACNA2D4*

1. RT (q)PCR

L'expression tissulaire de *CACNA2D4* reste mal connue. Étant le dernier membre de la famille des sous-unités alpha-2-delta des canaux calciques voltage-dépendants à être caractérisé, l'étude de sa répartition tissulaire reste encore une question à investiguer. Pour étudier cette expression surtout au niveau du muscle squelettique, des extraits d'ARN obtenus à partir de quadriceps de souris WT sont utilisés. En se basant sur la littérature, on sait que l'expression de $\alpha 2\delta$ -4 est établie dans l'œil au niveau de la rétine. Donc des échantillons d'ARN obtenus à partir d'yeux de souris ont aussi été utilisés comme contrôle positif.

Les ARN ont été extraits en utilisant le kit RNA Set for NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL, 740406.50) et puis les ADN complémentaires par transcription reverse avec le kit iScriptTM cDNA Synthesis kit (BIO-RAD, 1708897).

Matériel et méthodes

Une PCR, pont final permettant d'investiguer la présence d'un transcrit *CACNA2D4* a été faite avec la paire d'amorces se situant au niveau dans les exons 8 et 13 respectivement en orientation sens GCTGAGGATGGCTATCGCCA et en anti-sens CCTCTGTCCAGATGATGTCGT. Les amplicons ont été déposés et migrés sur un gel agarose 1% 0.5% gel Red. La révélation a été faite sur l'appareil GelDoc Go de BIO-RAD.

Dans une première approche d'investigation d'un transcrit musculaire, une RTqPCR a également été réalisée avec des amorces dirigées contre les exons 1 et 2 connus pour être sujets à épissage alternatif et les exons invariants 10 et 11 (**Tableau amorces Annexe 1**).

2. RACE-PCR

La séquence du transcrit musculaire inconnu de la littérature a été identifiée par 5'/3'RACE PCR.

Pour l'investigation de l'expression de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique chez la souris, j'ai donc réalisé une 5'/3' RACE PCR à partir d'extraits d'ARN messagers provenant du quadriceps. La RACE PCR pour Random Amplification of cDNA Ends ou PCR est particulièrement utile pour identifier des séquences d'ADNc inconnues, pour cloner des gènes complets à partir de séquences partielles, ou pour étudier les extrémités des ARN messagers. La RACE PCR est basée sur l'amplification aléatoire des extrémités d'ADN complémentaire. C'est une technique de biologie moléculaire utilisée pour amplifier des séquences d'ADN à partir d'extraits ARN ou ADN partiellement connus. Voici le principe en quelques points :

Synthèse d'ADNc (ADN complémentaire) : L'ARN cible est d'abord converti en ADNc

Amplification aléatoire des extrémités : Des amorces dégénérées sont utilisées pour amplifier les extrémités 5' ou 3' de l'ADNc. Cela permet d'obtenir des séquences d'ADN qui peuvent être inconnues à l'origine.

PCR classique : Une PCR traditionnelle est ensuite effectuée pour amplifier spécifiquement les régions d'intérêt identifiées lors de l'amplification aléatoire avec des amorces gènes spécifiques et des amorces universelles complémentaires la coiffe en 5' ou de la queue polyA en 3'.

Matériel et méthodes

Analyse des produits PCR : Les produits de PCR sont clonés et séquencés pour identifier et caractériser les séquences cibles d'ADN.

Ainsi, pour la 5'/3' RACE, j'ai utilisé le SMARTer® RACE 5'/3' Kit (634859, TakaraBio) sur extraits d'ARN totaux de quadriceps et d'yeux de souris C57BL/6J WT. Les ARN ont été extraits en utilisant le kit RNA Set for NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL, 740406.50) et puis les ADN complémentaires par transcription reverse avec le kit iScript™ cDNA Synthesis kit (BIO-RAD, 1708897).

Pour les amorces gènes spécifiques (GSP) (**Annexe 1**), la séquence de l'amorce pour la 5'RACE est placée sur l'exon 26 et pour la 3'RACE, la séquence complémentaire sur l'exon 24. Ces amorces avec des séquences d'homologies de 15 pb permettent le clonage dans le plasmide pRACE du kit des transcrits amplifiés.

Les conditions de PCR sont en **annexe 2**.

B. Obtention des plasmides *CACNA2D4* et mutagenèse

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu à produire des constructions afin de les utiliser dans des systèmes d'expression hétérologues en surexpression :

- WT et mutés humains, isoforme canonique dans pcDNA3.1 et pWPXLD
- WT et mutés murins, isoformes canonique et musculaire définies par la RACE PCR dans pcDNA3.1

Ces constructions sont présentées dans le (**Tableau 13 en annexe 3**).

L'ensemble des clonages ont été faits avec le kit In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (638948, TakaraBio). Le clonage par assemblage homologue In-Fusion est une méthode de clonage moléculaire qui permet d'insérer précisément un fragment d'ADN dans un vecteur en exploitant la recombinaison homologue entre les extrémités complémentaires du fragment et du vecteur. Voici une explication simplifiée du processus :

Des amorces spécifiques aux extrémités de l'insert et du vecteur sont conçues. Ces amorces contiennent des séquences complémentaires permettant l'assemblage homologue. Les

Matériel et méthodes

extrémités complémentaires s'apparient et la recombinaison se produit, permettant l'insertion du fragment d'ADN dans le vecteur. Le produit de la réaction d'In-Fusion est introduit dans des cellules compétentes (636763, Takara Bio Stellar™ Competent Cells) pour la création de clones recombinants. Le clonage par assemblage homologue In-Fusion offre une alternative efficace et précise au clonage traditionnel basé sur les sites de restriction, permettant l'assemblage de fragments d'ADN sans les contraintes liées aux sites de restriction.

- Plasmides pcDNA3.1 contenant cDNA de *CACNA2D4* (NM_172364.5) humain WT et mutés taggués HA

L'introduction des mutations ont été faite par mutagenèse dirigée dans le plasmide pcDNA3.1 HA-*CACNA2D4*_{humain} WT, don de Amy Lee (Lee et al., 2015).

- Plasmides pcDNA3.1 contenant le cDNA murin *CACNA2D4* canonique (NM_001347427.2) et la forme musculaire WT et mutées

Les transcrits 5' et 3' issus de la RACE PCR de *CACNA2D4* ont été sous-clonés pour reconstruire la séquence complète. Cette dernière a été transférée dans un plasmide d'expression, pcDNA3.1 avec un promoteur CMV. Dans ce cadre, on a utilisé la recombinaison homologue avec la technologie In-Fusion pour reconstruire ces transcrits en deux temps.

D'abord la reconstitution de la séquence complète du transcrit dans le plasmide pRACE : les amorces ont été placées sur l'exon 24 en commun pour le transcrit canonique souris *CACNA2D4* FL et le transcrit musculaire *CACNA2D4* M. Un site de restriction unique SmaI dans l'exon24 a permis la linéarisation du plasmide. La partie 3' est amplifiée à partir du site SmaI de l'exon 24 jusqu'au dernier exon 38. Par recombinaison, la séquence 3' est transférée dans le plasmide pRACE contenant la partie 5' linéarisée avec SmaI (**Figure 11**).

Les séquences complètes des transcrits canonique *CACNA2D4* et musculaire *CACNA2D4* M souris sont amplifiées et transférées dans pcDNA3.1 préalablement linéarisé avec BamHI.. L'ensemble des mutations ont aussi été introduites dans le plasmide pcDNA3.1 HA-*CACNA2D4*_{souris} WT. Un tag interne HA (YPYDVPDYA) entre les nucléotides 1512-1513 (numérotation basée sur la forme canonique) a également introduit par mutagenèse dirigée avec

Matériel et méthodes

recombinaison homologue grâce à des amorces avec des séquences complémentaires codant le tag HA.

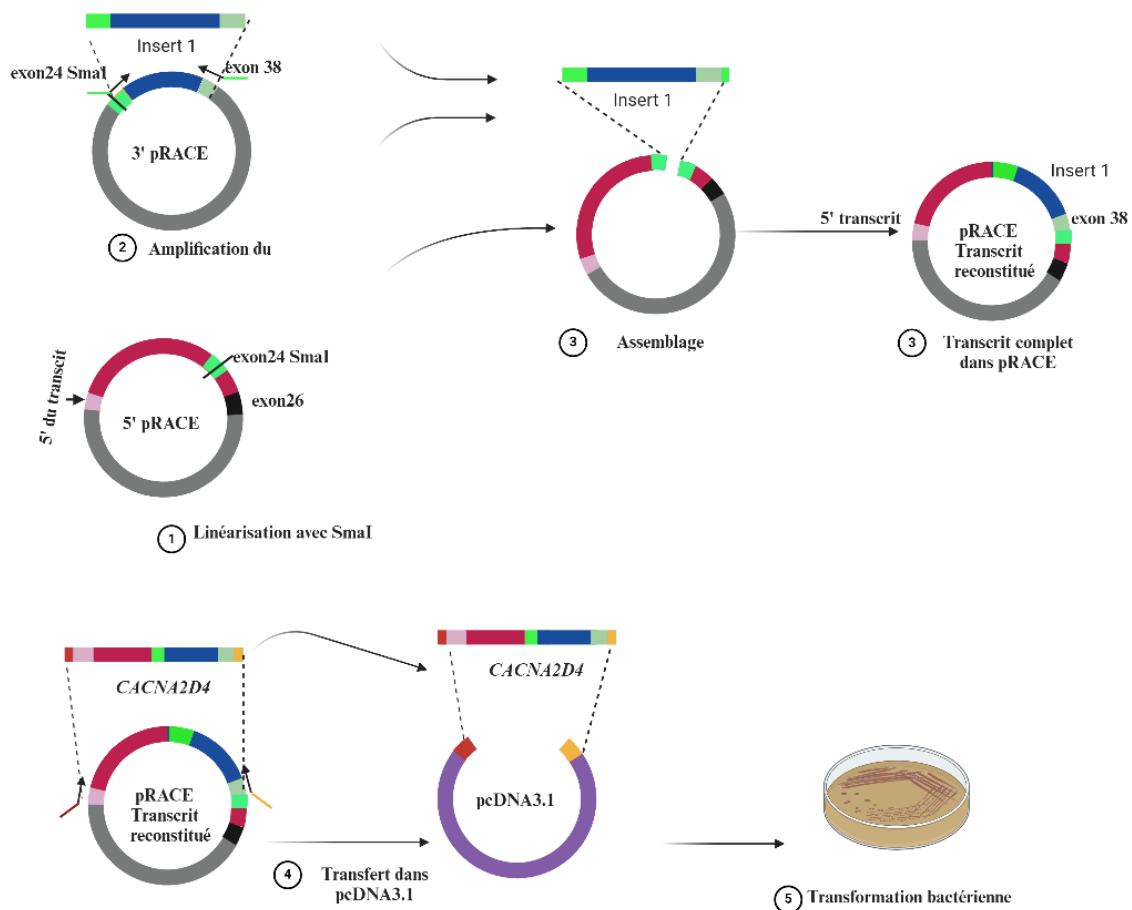


Figure 11 : Protocole de clonage des transcrits murins *CACNA2D4* à partir des produits de la RACE PCR

- Plasmides dans pWPXLd pour la production de lentivirus

Pour la production de lentivirus, les ADN complémentaires des différents transcrits de *CACNA2D4* ont été transférés dans un plasmide pWPXLd par recombinaison homologue. Les inserts ont été amplifiés des plasmides pcDNA3.1 respectifs puis insérés dans pWPXLd linéarisé avec EcoRI/BamHI enlevant ainsi le tag GFP présent dans ce plasmide. Ce dernier est un vecteur de transfert lentiviral largement utilisé pour la production de particules virales lentivirales (protocole en annexe) et encode la protéine de capsid et les gènes de l'enveloppe.

L'ensemble des amorces utilisées sont à retrouver **en Annexe 1**.

Matériel et méthodes

IV. Etudes biochimiques

A. Préparation des tissus

1. Homogénats de tissus murins

L'expression de différents gènes impliqués dans le processus de couplage excitation-contraction du muscle squelettique ont été investigués dans le cadre de la caractérisation du modèle murin. Une autre partie majeure a été aussi d'élucider l'expression tissulaire de $\alpha 2\delta$ -4. Les tissus, muscle squelettique et yeux, ont été homogénéisés dans un tampon de broyage (200mM sucrose, 20mM Hepes pH 7.4 et 0.4mM CaCl_2) supplémenté avec les inhibiteurs de protéases (PMSF et DFP). Après dosage au BCA (kit BCA Protein Assay A55864, ThermoFisher), 40 μg sont déposées sur un gel 8% pour l'expression tissulaire de $\alpha 2\delta$ -4 et 5-15% pour le reste.

Pour $\alpha 2\delta$ -4, l'anticorps utilisé est un don d'une équipe de l'Université d'Austin au Texas dirigée par le Dr. Amy Lee. Cet anticorps a été caractérisé et publié par cette équipe (Kerov et al., 2018).

2. Fractionnement subcellulaire du muscle squelettique murin

Tampon d'isolation : 880 mmol/L sucrose, 20 mmol/L HEPES (pH 7.4), 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl_2 , 5 mmol/L EGTA. Supplémenté en inhibiteur de protéases (DFP et PMSF)

Toute la procédure se déroule sur glace : 50 mg d'échantillon de muscle frais ou congelé sont découpés sur une plaque refroidie. Les échantillons sont homogénéisés par minilyse (20s X 2) dans 500 μL de tampon d'isolation puis manuellement en utilisant un potter (5 up and down) puis lavage avec 500 μL tampon isolation et encore potter 5 up and down. L'homogénat est centrifugé à 1 000 g pour 10 min. Le culot 1 (Fraction « nucléaire ») est re-suspendu dans du RIPA (supplémenté inhibiteurs de protéases). Le surnageant 1 est centrifugé de nouveau à 1 000 g/ 10 min et le culot 2 jeté. Le surnageant 2 est centrifugé 20 000 g/ 25 min et le culot 3 (Fraction « mitochondriale ») re-suspendu dans du RIPA. Le surnageant 3 est centrifugé 20 000 g/ 25 min et culot 4 jeté. Le surnageant 4 subit une centrifugation de 45 000 rpm/ 30 min. Le Surnageant 5 constitue la fraction « cytosolique » et le culot 5, le microsome (re-suspendu dans du RIPA). Les différentes fractions sont analysées par western blot.

Matériel et méthodes

B. Western blot

Cette méthode a servi dans les études d'expression de *CACNA2D4* et de *STAC3*.

Les extraits protéiques issus des expériences sont dosés au BCA et déposés sur un gel acrylamide. La migration s'est faite sous une tension constante de 200 V jusqu'à la sortie du front de migration puis le transfert sur une membrane PVDF 0.45 μ m (Immibilon-P, Millipore, IPVH00010) pendant 4 Heures avec un ampérage constant de 0.8A. Les membranes ont été bloquées avec du lait écrémé à 4 % PBS-Tween 0.1 % pendant 30 minutes à température ambiante.

Puis les membranes sont incubées en chambre froide sur la nuit avec les anticorps primaires puis après lavage 3X PBS-Tween 0.1%, elles sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la HRP (**Tableau 8**) pour tous. La révélation de la protéine a été faite sur un chemiDoc Touch (Biorad) avec Pierce ECL Western (ThermoFisher, 32106). Les signaux protéiques ont été quantifiés à l'aide d'ImageJ.

C. Biotinylation de surface

Cette méthode a servi dans le cadre du projet *CACNA2D4* pour étudier l'impact des mutations sur la localisation à la surface cellulaire. Il a également servi pour étudier l'impact sur l'adressage à la surface de la mutation sur *CACNA1S* c.2970G>A dans l'exon 24.

L'isolation des protéines membranaires permet d'étudier l'impact des mutations sur la localisation de la protéine. Le principe consiste à utiliser la capacité de la sulfo-N Hydroxysuccinimide-biotine à se lier aux amines primaires, mais surtout de ne pas traverser la membrane plasmide sur des cellules vivantes. Ainsi, les protéines biotinylées peuvent être éluées en utilisant l'affinité de biotine avec la streptavidine.

Les cellules HEK 293T transfectées avec les plasmides codant pour $\alpha 2\delta$ -4 WT ou muté, soit la forme humaine ou murine, sont biotinylées 48H après. Les cellules sont lavées avec du tampon phosphate saline 1X (PBS) puis incubées 30 minutes sur glace dans 50mM de EZ-Link Sulfo-NHS-S-S-Biotine (21331, ThermoFisher). La biotine en excès est neutralisée avec du Tris 50mM froide. Les cellules sont ensuite lysées dans du PBS 1X, 1% Igepal et 0.1% SDS

Matériel et méthodes

supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (PMSF et DFP). Les lysats sont centrifugés 13 000g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les protéines est récupéré après une centrifugation et le culot est jeté. Les protéines sont dosées au kit BCA (23235, ThermoFisher), 40µg sont gardés pour analyser le lysat cellulaire et environ 600µg sont incubés avec des billes d'agarose streptavidine (20357, ThermoFisher) au froid toute la nuit pour isoler les protéines de surface ainsi biotinylées ou 1h à température ambiante. Les billes sont ensuite centrifugées à 500g 3 minutes et le surnageant, constituant la fraction intracellulaire, est mise de côté pour être analysée. Les billes de streptavidine sont ensuite lavées avec du RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8), 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate and 0.1% SDS). Par la suite l'élution de la fraction biotinylée est faite avec du tampon 2X de western blot contenant du β-mercapto-éthanol, un agent réducteur permettant de libérer les protéines biotinylées des billes agarose streptavidine en rompant le pont disulfure du Sulfo-NHS-S-S-Biotine. Les différentes fractions, intracellulaires et membranaires (biotinylées) sont analysées par western blot comme décrit ci-dessus sur un gel acrylamide 5-15%.

D. Co-Immunoprécipitation

Ce protocole a été basé sur l'article (Dahimene et al., 2022). Les cellules ont été remises en suspension dans un tampon de co-IP (20 mM HEPES (pH 7,4), 300 mM de NaCl, 1 % de digitonine et inhibiteurs de protéases (PI) (DFP et PMSF)), soniquées pendant 8s à 20 kHz et mise en rotation pendant 1 h à 4 °C. Les échantillons ont ensuite été dilués avec un volume égal de 20 mM 7 HEPES (pH 7,4), 300 mM de NaCl, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, avec PI (à 0,5 % de concentration finale de digitonine), mélangés par pipetage et centrifugés à 18 000 x g pendant 20 min. 2 mg de protéines totales ont été ajustés à 3 mg/ml avec un tampon co-IP et incubés pendant une nuit à 4 °C avec des billes magnétiques anti-HA (88836 ThermoFisher). Le reste a servi à la préparation du contrôle de lysat total à 1mg/ml. Les billes ont ensuite été lavées trois fois avec du RIPA. L'élution a été faite dans du tampon dénaturant 2X 1H à température ambiante. Les différents échantillons sont révélés par western blot comme décrit ci-dessus.

Matériel et méthodes

V. Techniques d'imagerie

A. Immunofluorescence

1. Réexpression ectopique sur COS7 pour l'étude de la localisation de $\alpha 2\delta$ -4 wild-type et mutés

Les COS7 ont servi à la fois pour étudier sur un système ectopique, avec la reconstitution du canal DHPR avec les sous-unités principales, la localisation intracellulaire de $\alpha 2\delta$ -4 sur des cellules perméabilisées ou sa présence à la membrane, quand exprimé seul, sur des cellules non perméabilisées.

Les cellules sont lavées dans du PBS 1X puis fixées au para-formaldéhyde 4% (PFA) suivi d'un rinçage avec du NH_4Cl 50mM.

Pour la condition avec perméabilisation, les cellules sont mises dans du PBS 1X triton 0.1% pendant 10 minutes à température ambiante puis bloquées dans du PBS-Tween 0.1% avec 20% de sérum de chèvre et 4% de BSA pendant une heure. Les cellules sont alors incubées avec les anticorps primaires anti-HA et anti-Climp63 pour marquer le réticulum (**Tableau 8**).

Pour la condition non perméabilisée, les cellules sont bloquées dans du PBS 1X avec 20% de sérum de chèvre et 4% de BSA pendant 1 heure. Elles sont ensuite incubées avec les anticorps, dilués dans le tampon de blocage, anti-HA et un anti-Cdk2 comme patron cellulaire. Les anticorps secondaires anti-souris Cy3 pour HA et anti-lapin Cy5 pour le Cdk2 (**Tableau 8**).

Au préalable, après l'étape de fixation, les cellules ont été traitées 5 minutes à température ambiante avec de la WGA (wheat germ agglutinin) (1/500 ThermoFisher W11261) pour marquer la membrane plasmique.

2. Etude de la colocalisation Cav1.1 – $\alpha 2\delta$ -4 sur myotubes de souris transduits

Les myotubes issus de souris WT sont transduits avec un lentivirus codant pour $\alpha 2\delta$ -4 pour étudier sa co-localisation avec DHPR. Après deux semaines de différenciation, ils sont fixés avec du PFA 4% puis rincés avec du NH_4Cl . Ils sont ensuite perméabilisés avec du PBS 1X triton 0.2% pendant 20 minutes, suivi d'un blocage dans du PBS triton 0.1% avec 10% de FBS pendant 1 heure.

Matériel et méthodes

Les cellules sont ensuite incubées pendant 1H30 avec les anticorps, dilués dans le tampon de blocage, anti-Cav1.1 et anti-HA. Les anticorps secondaires anti-souris alexa488 pour HA et anti-lapin Cy3 pour Cav1.1 (**Tableau 8**).

Les noyaux ont été marqués par du hoechst 1/1000 5 minutes à température ambiante.

Pour l'acquisition des images, pour les Cos7 ça été fait avec un confocal Leica SPE et pour les myotubes sur le Confocal LSM710/Airyscan (Zeiss).

Tableau 8 : Tableau des anticorps primaires et secondaires utilisés

Anticorps primaires			
Stac3	1/1000	Proteintech, 20392-1-AP	Western blot
RyR1	1/1000	homemade	Western blot
MF 20 (Chaîne lourde myosine)	1/1000	DSBH	Western blot
GAPDH	1/2500	Cell signaling 2118	Western blot
HA (hémagglutinine)	1/1000; 1/300	Thermofisher 28183	Western blot/IF
RFP (Red fluorescence protein)	1/1000	Rockland 600401379	Western blot
DHPR (Cav1.1)	1/1000	Sigma HPA048892	Western blot
$\alpha\delta$ -4	1/1000	don Amy Lee	Western blot
Flag	1/1000	Cell signaling 8146T	Western blot
Cdk2	1/300	Santa Cruz SC163	IF
Anticorps secondaires			
Anti-souris HRP	1/10000	Jackson	Western blot
Anti-lapin HRP	1/10000	Jackson	Western blot
Alexa488 anti-souris	1/500	Thermofisher	IF
Cy3 anti-lapin	1/500	Thermofisher	IF
Cy3 anti-souris	1/500	Thermofisher	IF
Cy5 anti-lapin	1/500	Thermofisher	IF

B. Imagerie calcique

Cette méthode a servi dans l'étude des relâchements de calcium dans les myotubes des souris *CACNA2D4* S306R hétérozygotes et aussi pour investiguer l'impact des mutations homozygotes composites *STAC3* sur des myotubes humains issus du patient.

Les cellules satellites sont mises en différenciation pour trois jours comme décrit dans la partie culture cellulaire. Les myotubes ainsi différenciés sont incubés avec une sonde calcique, le fluo-4 Direct (Life Technologies, F10471) 30min à 37°C. Cette sonde diffère de la génération précédente des sondes Fluo-4 AM en ce qu'elle supprime la fluorescence de fond, fonctionne

Matériel et méthodes

dans un format de « simple ajout » nécessitant pas de déestérification et peut être utilisée en milieu complet.

Différents stimuli ont été utilisés :

- KCl 140 mM en présence de calcium extracellulaire (5.92g de KCl dans HEPES 10mM pH 7.4, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM) :

Les myotubes après l'incubation sont lavés et maintenus jusqu'à l'imagerie calcique dans du Krebs (136 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (pH 7,4), 2 mM CaCl₂) supplémenté avec 6 mM D-glucose pour des expériences en présence de calcium extracellulaire. Après aspiration du Krebs, les cellules sont stimulées avec du KCl 140 mM.

J'ai également étudié l'impact du pH extracellulaire sur le couplage excitation – contraction dans le cadre du projet *CACNA2D4*. Différents pH (6.3 ; 7.4 et 8) ont été testés afin d'étudier l'impact de la mutation sur la fonction des $\alpha 2\delta$ comme régulateur de l'inhibition par les protons des canaux calciques voltage-dépendant. Les solutions de Krebs et le KCl ont été acidifiées ou basifiées respectivement avec du HCl ou du KOH. Les myotubes sont maintenues à un pH constant tout le long de l'expérience.

- KCl 140mM en absence de calcium extracellulaire (5.92g de KCl dans HEPES 10mM pH 7.4, MgCl₂ 2mM, EGTA 1mM) :

L'absence de calcium extracellulaire permet d'étudier les flux de calcium intracellulaire induit uniquement par le phénomène VICR (la libération de calcium induite par voltage) et non le CICR (la libération de calcium induite par le calcium entrant via le DHPR).

Pour l'imagerie calcique en l'absence de calcium extracellulaire, les cellules sont lavées et maintenues dans du Krebs sans calcium (136 mM NaCl, 5 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES (pH 7,4), 1 mM d'EGTA (pH 7,4), 0,1 mM de LaCl₃, 0,5 mM de CdCl₂) et on ajoute 6 mM de D-glucose.

- 4-chloro-m-crésol (4-CMC) 500 μ M dans Krebs avec calcium

Le fonctionnement du canal RyR1 a aussi été testé en le stimulant directement avec 500 μ M de 4-chloro-m-crésol (4CMC) agoniste RyR1.

Matériel et méthodes

Les flux calciques ont été quantifiés avec ImageJ.

VI. Caractérisation du modèle murin

Pour mettre en évidence un phénotype hyperthermie d'effort chez notre modèle, les souris doivent être dans les conditions qui entraînent le déclenchement de la pathologie d'où un protocole de course soutenue. Dans la littérature liée à l'HE, il est établi que l'humidité est un facteur de risque, car lorsque l'éléver cela diminue la capacité de sudation (Bouchama et al., 2022). Ainsi, ce protocole est basé sur les travaux qui ont été faits par Orlando Laitano pour entraînant chez des souris WT. En contrôlant les paramètres environnementaux, température et humidité, il a réussi à entraîner un épuisement avec élévation de la température rectale de ses souris dû à l'effort (Garcia et al., 2020).

A. Protocole de course

Ce protocole expérimental a été évalué et a reçu l'aval du comité d'éthique CEEA-004. Tout a été mis en œuvre pour respecter le bien-être animal avec la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement).

Les souris hétérozygotes *CACNA2D4* S306R obtenues par CRISPR-Cas9, ont été backcrossées sur trois générations afin d'éliminer les éventuels effets off-targets que la prédiction bio-informatique n'aurait pas mis en exergue.

La taille des cohortes a été définie en se basant sur la littérature (Garcia et al., 2018a, 2020; He et al., 2020), 7 souris au moins par génotype et par sexe ont été nécessaires. Ainsi, pour les mâles, on a 7 souris WT et 8 hétérozygotes âgées de 2-3 mois. Pour les femelles, on a 15 souris par génotype.

Le protocole commence par 4 jours d'entraînement des souris sur un tapis roulant BIOSEB (BX-TM) avec une vitesse modérée à raison de 10cm/s pendant 10 minutes/jour afin qu'elles s'habituent à l'environnement du tapis. Cette partie s'est déroulée à température et à l'humidité ambiante. Dans le même temps, leur température rectale était prise en début et en fin de course pour atténuer le stress de cette manipulation invasive et donc fausser les données.

Matériel et méthodes

Après deux jours de repos, post-entraînement, le challenge physique visant à déclencher l'hyperthermie d'effort est mis en place (**Figure 12**). Il consiste à une heure de course avec une vitesse initiale de 5 m/s qui est incrémentée toutes les 5 minutes pour atteindre 20 cm/s maintenue tout le long de l'exercice. Les paramètres environnementaux sont monitorés et fixés à 37°C pour une humidité située entre 40 et 60%. La température rectale des souris est relevée en début de course et à la fin, une fois que l'animal a atteint un des points limites fixés.

Deux points finaux ont été fixés :

- La souris va au bout de l'heure d'exercice sans arrêter sa course.
- Ou l'arrêt de l'exercice au moins pendant 10 secondes en restant sur la grille d'électrostimulation (des stimuli électriques de faibles amplitudes 0.5mA) servant pour motiver l'exercice.

Une fois que l'un de ces événements s'est produit, la souris est soustraite du tapis et euthanasiée pour réduire la souffrance animale et prélever du sang pour des analyses biochimiques. Le sang ainsi prélevé est mis dans des tubes héparinés puis centrifugé pour dosage du taux de créatine Phosphokinase (CPK) sérique qui est l'enzyme permettant de mettre en évidence une rhabdomyolyse. La rhabdomyolyse, lyse des cellules musculaires, est l'une des principales complications qui accompagne de façon systématique la crise d'hyperthermie d'effort.

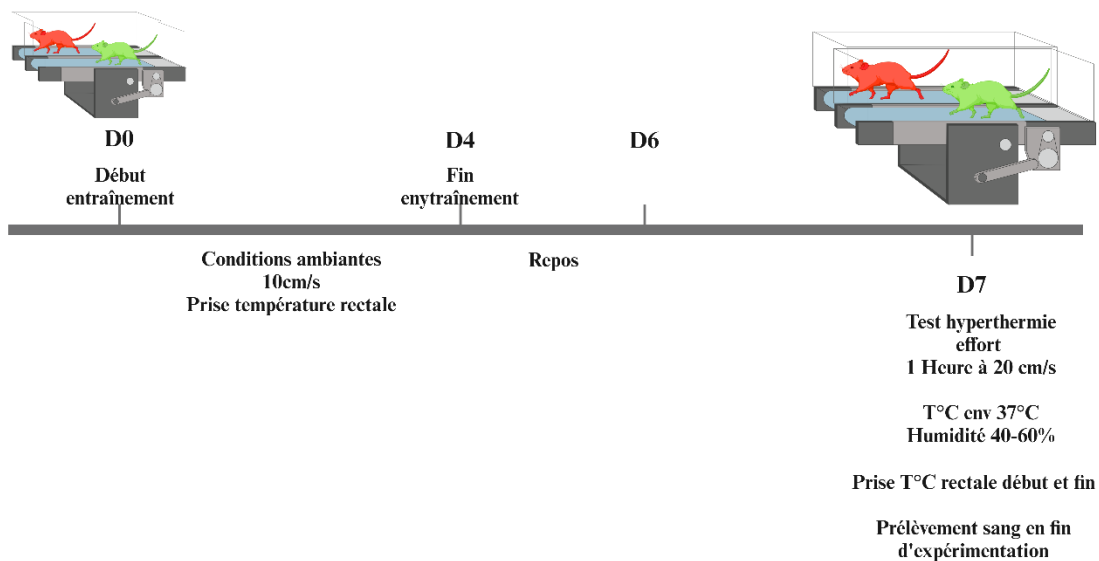


Figure 12 : Protocole hyperthermie d'effort de course sur tapis roulant. Les couleurs pour les génotypes différents (Verte : $CACNA2D4^{WT/S306R}$; Rouge : $CACNA2D4^{WT/WT}$)

B. Protocole test de sensibilité à la chaleur

Le stress thermique peut entraîner la survenue d'une crise d'hyperthermie maligne peranesthésique comme c'est observé chez les modèles murins de la maladie (Dainese et al., 2009).

Ainsi, j'ai voulu tester la sensibilité au stress thermique sur ce modèle murin. Les souris WT et hétérozygotes S306R sont placées dans une chambre climatique réglée à 41°C pendant 30 minutes.

Donc des souris âgées de trois mois WT et hétérozygotes de la même portée ont été utilisées pour cette expérimentation. Les cohortes sont composées comme suit :

- Mâle : 13 hétérozygotes et 12 souris WT
- Femelle : 9 hétérozygotes et 9 WT

C. Protocole test de sensibilité à l'isoflurane (anesthésique halogéné)

La sensibilité aux anesthésiques halogénés est la cause principale de l'hyperthermie peranesthésique maligne. Le lien entre le HE et le HM depuis les années 90, fait l'objet d'une

Matériel et méthodes

controverse récurrente due à la ressemblance des signes cliniques et physiopathologiques de ces deux conditions.

Ainsi, j'ai voulu tester la sensibilité de notre modèle à l'isoflurane, un des membres de la famille des anesthésiques halogénés, couramment utilisé en expérimentation animale.

Donc des souris âgées de trois mois WT et hétérozygotes de la même portée ont été utilisées pour cette expérimentation. Les cohortes sont composées comme suit :

- Mâle : 4 hétérozygotes et 4 souris WT (wild-type)
- Femelle : 5 hétérozygotes et 3 WT

Les protocoles sont basés sur ce qui a été fait sur les souris modèles HM avec des mutations sur *RYR1* ou *CASQ1* (Protasi et al., 2009; Yamazawa et al., 2021).

L'anesthésie est induite avec 3% d'isoflurane 1000mg puis maintenue avec 2% sur 1h30. Les souris sont placées sur une plaque chauffante à 37°C pour éviter le refroidissement et une sonde rectale permet de suivre tout le long de l'expérience les modifications de la température centrale.

A la fin de la procédure, les souris ont suivi un protocole de réveil en les mettant dans une enceinte chauffée avec une lampe infrarouge.

D. Electrophysiologie (En collaboration)

Les études d'électrophysiologies ont été faites en collaboration.

- Université du Texas (Amy Lee team) :

Ainsi, l'étude par patch-clamp du canal DHPR reconstitué, en transfectant dans des cellules HEK 293T avec Cav1.1/Stac3/ β 1a et soit avec la forme musculaire α 2 δ -4 wild-type ou avec la mutation S306R, soit avec α 2 δ -4 canonique wild-type ou encore α 2 δ -1 wild-type, a été faite par Juan de la Rosa Vasquez de l'Université du Texas.

Différents paramètres ont été étudiés, l'activation et l'inactivation dépendant du voltage, les densités de courant et l'inhibition du canal DHPR médiée par les protons.

Matériel et méthodes

- INSA (Institut National des Sciences Appliquées) de Lyon (Bruno Allard)

L'étude des courants calciques et des relâchements de calcium voltage-dépendant du réticulum a été faite sur des fibres isolées de souris WT et hétérozygotes *CACNA2D4* S306R.

VII. Statistique

La taille des cohortes a été définie en se basant sur les études sur le modèle préclinique d'hyperthermie d'effort (Garcia et al., 2018a, 2020; He et al., 2020).

Les études d'imagerie calcique sur les myotubes ont été faites en triplicata avec un nombre minimum de 90 myotubes par condition.

Pour l'ensemble des données, concernant l'imagerie calcique et les tests phénotypiques sur le modèle murin, la distribution des valeurs a été testée avec Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-wilk et test d'adéquation du χ^2 . Le choix du t-test est justifié par l'existence d'une distribution normale et la taille de l'échantillon inférieure à $n=30$. Le test U de Mann-whitney est utilisé ici pour les faibles échantillons, $n=3$.

Tous les résultats sont exprimés en moyennes \pm s.e.m. La signification statistique a été déterminée à l'aide du t-test non apparié ou Mann-whitney réalisés avec le logiciel GraphPad Prism. $P < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif et * indique $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$.

VIII. Bio-informatique

Différents outils de bio-informatique ont été utilisés dans le cadre de cette thèse pour étudier différents paramètres.

Avec <https://www.uniprot.org/align> pour étudier le degré de conservation des acides aminés mutés sur *CACNA2D4* sur les différents isoformes $\alpha 2\delta$. <https://alphafold.ebi.ac.uk/> a permis de faire la prédiction de la structure 3D de *CACNA2D4* canonique et de situer les mutations identifiées.

L'étude de l'isoforme musculaire de *CACNA2D4* par <https://atgpr.dbcls.jp/> a permis de déterminer le site d'initiation de la traduction et la présence d'une séquence KOZAK. La présence d'un peptide signal en N-terminal a également été étudiée avec

Matériel et méthodes

<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/> pour prédire la probabilité. J'ai également investigué les mécanismes d'épissage alternatifs en identifiant les sites et les facteurs impliqués avec <http://www.introni.it/splicing.html>.

Les régions promotrices sur l'isoforme musculaire a également été investiguée avec <https://services.healthtech.dtu.dk/services/Promoter-2.0/>.

Dans le cadre de la création de la lignée *CACNA2D4* S306R, j'ai déterminé les séquences des guides gRNA et de l'oligonucléotide simple brin utilisé pour la création du modèle murin avec <http://crispor.tefor.net/crispor.py>. Cet outil a également servi pour déterminer les régions off-targets à vérifier. J'ai également fait une analyse quantitative des éditions présentes sur les résultats de séquençage sanger des souris fondatrices avec <https://decodr.org/>. Les données de séquençage ont également été analysées avec <https://www.benchling.com/> pour les alignements. Ces outils ont également servi pour le clonage afin de dessiner les différentes paires d'amorces utilisées.

L'analyse des différentes images d'immunofluorescence et de western blot a été faite avec Image J.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Projet principal : *CACNA2D4*,
dans la survenue de
l'hyperthermie d'effort (HE)

Partie 1 : Implication de *CACNA2D4*
dans l'Hyperthermie d'effort

Résultats et discussion

L'objectif de cette partie de mon travail de thèse a été d'établir l'implication de *CACNA2D4* dans la survenue de l'hyperthermie d'effort (HE).

Ce gène a été défini comme un excellent gène candidat après identification en exome, sur le gène *CACNA2D4* chez 4 patients ayant présenté une crise d'hyperthermie d'effort, de 3 variants faux-sens rares : p.(Asp217Tyr ; D217Y), p.(Gly250Arg ; G250R), p.(Ser299Arg ; S299R) et un variant intronique, c.486+1G>A dont les conséquences possibles sont : V162del (Δ V162) et N143_V162del (Δ Exon4). Le variant p.(Ser299Arg) était particulièrement intéressant car se localisant dans le domaine fonctionnel MIDAS, permettant l'interaction entre $\alpha 2\delta$ et $\alpha 1$.

Plusieurs études ont été réalisées dans le but de montrer l'implication de *CACNA2D4* dans l'HE.

Premièrement, l'impact des quatre variants d'intérêt identifiés sur le gène *CACNA2D4* a été étudié en modèle de surexpression. L'impact sur l'expression, la localisation, l'interaction avec Cav1.1 et la libération de calcium a été étudié.

Deuxièmement, une souris Knock-In *CACNA2D4* p.(Ser306Arg ; S306R) a été conçue. Ce modèle animal était ainsi porteur du variant équivalent au variant p.(Ser299Arg ; S299R) identifié chez un des patients de la cohorte Hyperthermie d'Effort. Ce modèle animal a ensuite été caractérisé sur le plan clinique et cellulaire, à la recherche d'une susceptibilité à l'hyperthermie d'effort, d'une hypersensibilité à la chaleur, et d'une susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique.

Troisièmement, l'expression musculaire squelettique de *CACNA2D4*, non prouvée à ce jour, a été caractérisée par étude et séquençage du transcrite musculaire, recherche de la protéine en western blot et spectrométrie de masse.

I. Caractérisation fonctionnelle *in vitro* des mutations sur *CACNA2D4*

Dans cette première partie de mon travail de thèse, l'objectif était d'étudier l'impact fonctionnel des mutations identifiées sur *CACNA2D4* chez les patients hyperthermie d'effort. J'ai ainsi étudié l'implication de ce gène candidat dans la survenue de la pathologie.

Résultats et discussion

Pour rappel, l'objectif de ce projet est l'implication du gène candidat *CANA2D4* dans l'HE. Des résultats préliminaires avaient permis d'identifier quatre variants d'intérêt sur le gène *CACNA2D4* chez 4 patients ayant présenté un épisode d'HE : 3 variants faux-sens rare : p.(Asp217Tyr ; D217Y), p.(Gly250Arg ; G250R), p.(Ser299Arg ; S299R) et un variant intronique, c.486+1G>A dont les conséquences possibles sont : V162del (Δ V162) et N143_V162del (Δ Exon4).

J'ai réalisé une caractérisation fonctionnelle des quatre variants identifiés sur *CACNA2D4* à l'aide de système de surexpression dans des lignées cellulaires.

L'intérêt de cette caractérisation fonctionnelle est de montrer le caractère pathogène des mutations identifiées en investiguant l'impact qu'elles peuvent avoir sur la protéine, son expression, sa localisation et ses fonctions comme sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants de type L.

Pour cela, j'ai utilisé des systèmes d'expression hétérologues, HEK293T et COS7, me permettant de reconstituer un canal calcique de type L en réexprimant les sous-unités α 1, β 1 et α 2 δ .

L'impact des différentes mutations a été étudié en grande partie sur la forme canonique humaine de la protéine α 2 δ -4_{hu} (ENST00000382722). Une autre partie de cette caractérisation fonctionnelle, les études électrophysiologiques principalement, a été faite sur une isoforme musculaire de α 2 δ -4 nommée α 2 δ -4 M identifiée dans le muscle squelettique de souris. L'étude de cette isoforme sera détaillée dans la partie « **Caractérisation fonctionnelle de l'isoforme musculaire** ».

A. Etude d'expression protéique

L'expression a été étudiée par réexpression de *CACNA2D4* WT et mutées par transfection de pcDNA 3.1 codant la forme canonique α 2 δ -4_{hu} wild type ou portant les mutations Ser299Arg (S299R), Gly250Arg (G250R), N143_V162del (Δ Exon4), delVal162 (Δ V162) et Asp217Tyr (D217Y) dans des cellules HEK293T. Les protéines extraites ont été analysées par western blot.

Résultats et discussion

L'analyse de lysats cellulaires des cellules HEK293T par western blot permet de voir que les mutations n'impactent pas l'expression de la protéine (**Figure 13A**). La quantification sur des expériences indépendantes ($n = 3$) montre qu'il n'y a pas de différence de niveau d'expression induite par les mutations ($p > 0.05$) (**Figure 13B**).

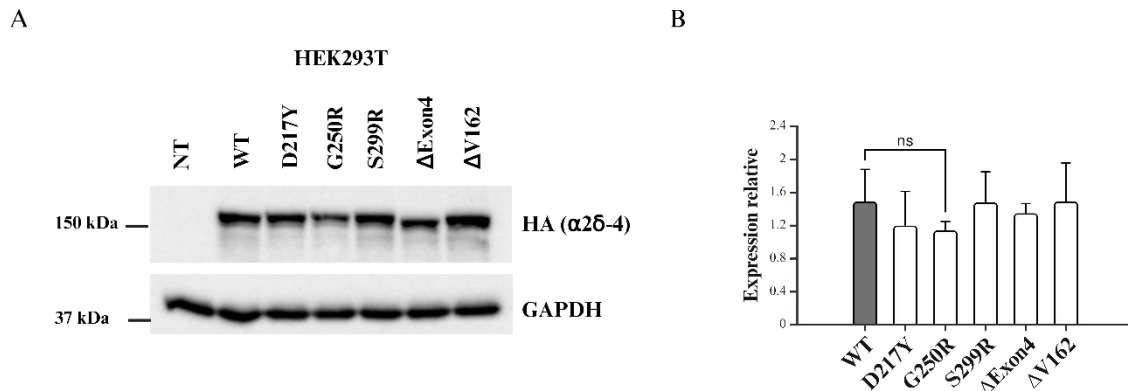


Figure 13 : Impact des mutations sur l'expression de $\alpha 2\delta-4$. A. Western blot d'expression de $\alpha 2\delta-4$ WT et mutées exprimés dans des HEK293T quantifié en B. *t-test* non apparié $n=3$ (ns $p > 0.05$).

B. Etude de localisation

La protéine $\alpha 2\delta-4$ est une protéine à ancre GPI avec un peptide signal. La synthèse se fait au niveau du réticulum endoplasmique où s'effectuent les modifications post-traductionnelles permettant la maturation fonctionnelle à savoir l'attache de l'ancre GPI puis l'adressage à la surface via le Golgi où se fait le clivage protéolytique.

- *Etude de la distribution intracellulaire par immunofluorescence sur COS7 perméabilisées*

Une étude de la distribution intracellulaire de $\alpha 2\delta-4$ a été faite par immunofluorescence sur des cellules Cos7 perméabilisées.

Grâce à un marquage anti-HA de $\alpha 2\delta-4$ et de la protéine ribosomale S6, servant de patron cellulaire, j'ai analysé la distribution cellulaire de la protéine $\alpha 2\delta-4$ sauvage et de chaque protéine $\alpha 2\delta-4$ mutée. La quantification (sur $n = 30$ cellules) de l'intensité de la fluorescence du marquage anti-HA a été faite avec ImageJ linescan (**Figure 14A**).

Résultats et discussion

Les images de microscopie confocale montrent pour la condition WT une distribution étendue et homogène de la protéine sur l'ensemble de la cellule, avec une fluorescence périnucléaire inférieure à 10%. Soixante pour cent des cellules WT comptées présentent ce profil (**Figure 14A et B**).

Les formes mutées présentent une distribution de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 mutée différente. Seulement 20 à 40% (selon les mutations) des cellules ont une distribution étendue et homogène de la protéine mutée sur l'ensemble de la cellule, avec une fluorescence périnucléaire inférieure à 10%. Les protéines mutées semblent être concentrées autour du noyau avec une rétention en périnucléaire forte avec en moyenne 50% de la fluorescence concentrée autour du noyau. On retrouve une distribution périnucléaire pour les protéines mutées.

Cette étude montre une rétention périnucléaire significative de $\alpha 2\delta$ -4 en présence des mutations.

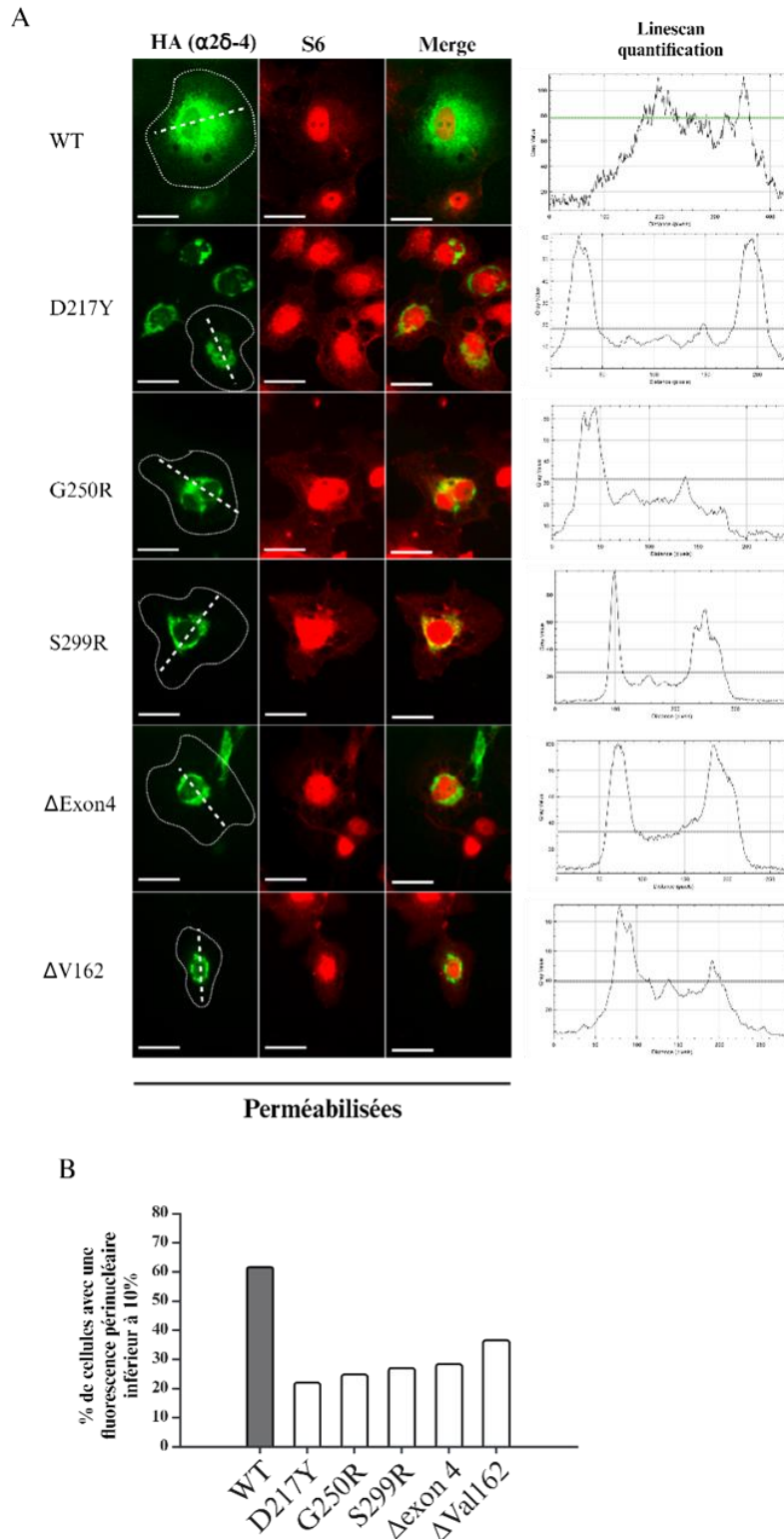


Figure 14 : Rétention périnucléaire de $\alpha 2\delta$ -4 mutées. A. Microscopie confocale immunofluorescence sur Cos7 perméabilisées avec un co-marquage de $\alpha 2\delta$ -4 et de la protéine ribosomale S6 montrant l'étendue de la cellule. Les lignes horizontales discontinues représentent la ligne de quantification de la distribution de l'intensité de la

Résultats et discussion

fluorescence périmoléculaire montrée sur les courbes à gauche. **B.** Histogramme quantifiant le pourcentage de cellules avec une fluorescence autour du noyau inférieur à 10% (n=30 pour chaque condition). Barre d'échelle 20 μ M.

- *Etude de l'impact des mutations sur l'adressage vers la surface de $\alpha 2\delta$ -4*

En tant que protéine à ancre GPI, la protéine $\alpha 2\delta$ -4 est localisée dans les radeaux lipidiques à la membrane cellulaire. Cette localisation a été étudiée par biotinylation des protéines membranaires.

La biotinylation et l'isolation des protéines membranaires de cellules HEK293T, transfectées avec la forme wild type ou mutée p.(Asp217Tyr ; D217Y), p.(Gly250Arg ; G250R), p.(Ser299Arg ; S299R), delV162 (Δ V162) et N143_V162del (Δ Exon4), suivies d'une révélation par western blot ont permis d'étudier l'impact des mutations sur la localisation à la membrane de $\alpha 2\delta$ -4.

L'analyse de la fraction biotinylée (membranaire) avec l'anticorps anti-HA montre la présence d'une expression membranaire de la forme WT et une réduction drastique de l'adressage à la membrane des protéines mutées (**Figure 15A**). La quantification du ratio (fraction biotinylée sur lysat total) montre une réduction significative de 73 à 80% de l'expression membranaire des formes mutées ((p <0.05) **Figure 15B**). On note aussi que sur la fraction biotinylée, à la condition WT on a deux bandes qui ne sont pas présentes sur le lysat total (**Figure 15A**).

Ces résultats montrent une altération significative de la localisation membranaire de $\alpha 2\delta$ -4 en présence des mutations.

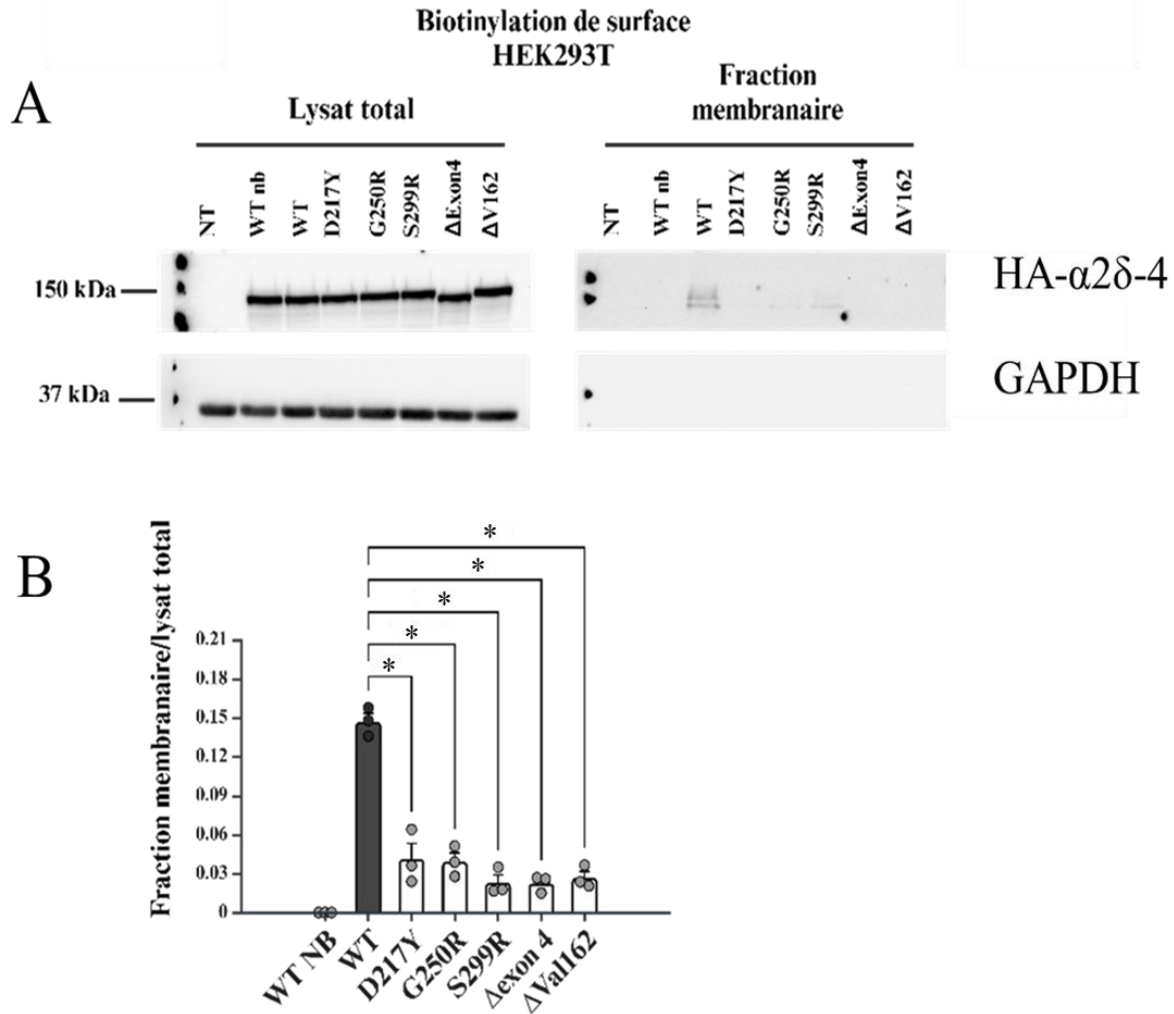


Figure 15 : Biotinylation de surface A. Western blot de la biotinylation de surface sur des cellules HEK293T exprimant α 2 δ -4 WT et les formes mutées. A droite le lysat cellulaire total, et à gauche la fraction membranaire soit les protéines biotinylées. Les niveaux d'expression de la protéine d'intérêt α 2 δ -4 sont révélés grâce à son tag HA et sont comparés à ceux de la protéine de charge GAPDH, servant de contrôle dans la fraction membranaire de l'absence de contamination intracellulaire (n=3). **B.** La quantification relative de l'expression membranaire de la protéine α 2 δ -4 par rapport au lysat total (normalisation). Test U de Mann-Whitney (* p < 0.05).

Résultats et discussion

C. Etude de l'impact des mutations sur l'interaction entre $\alpha 2\delta$ -4 et Cav1.1

La co-immunoprécipitation anti-HA de $\alpha 2\delta$ -4 a permis l'étude de l'impact des mutations sur la formation du complexe protéique du canal DHPR avec ses sous-unités régulatrices.

L'immunoprécipitation a été faite sur des lysats de cellules HEK293T coexprimant Cav1.1, $\beta 1a$ et $\alpha 2\delta$ -4 WT ou mutée p.(Asp217Tyr ; D217Y), p.(Gly250Arg ; G250R), p.(Ser299Arg ; S299R) V162del (Δ V162) et N143_V162del (Δ Exon4). Des billes magnétiques anti-HA ont permis d'immunoprécipiter $\alpha 2\delta$ -4. Le précipité anti-HA a ensuite été analysé par western blot (**Figure 16A**).

La révélation en western blot montre la présence de Cav1.1 et $\beta 1a$, démontrant la conservation de leur interaction avec $\alpha 2\delta$ -4 (**Figure 16A**). Il n'y a pas d'abolition de l'interaction induite par les mutations.

Néanmoins, la quantification de l'interaction entre Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 par la mesure (n=3) du rapport Cav1.1 / $\alpha 2\delta$ -4 dans le précipité anti-HA, montre une réduction significative de cette interaction de 25% pour la protéine mutée p.(Ser299Arg) comparée à la protéine sauvage (p=0.0245) **Figure 16B**). Les autres mutations n'ont pas d'impact significatif sur cette interaction.

Seule la mutation p.(Ser299Arg), localisée dans le site MIDAS, impliqué dans l'interaction protéine-protéine, altère l'interaction entre Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 sans pour autant l'abolir. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature (Briot et al., 2018).

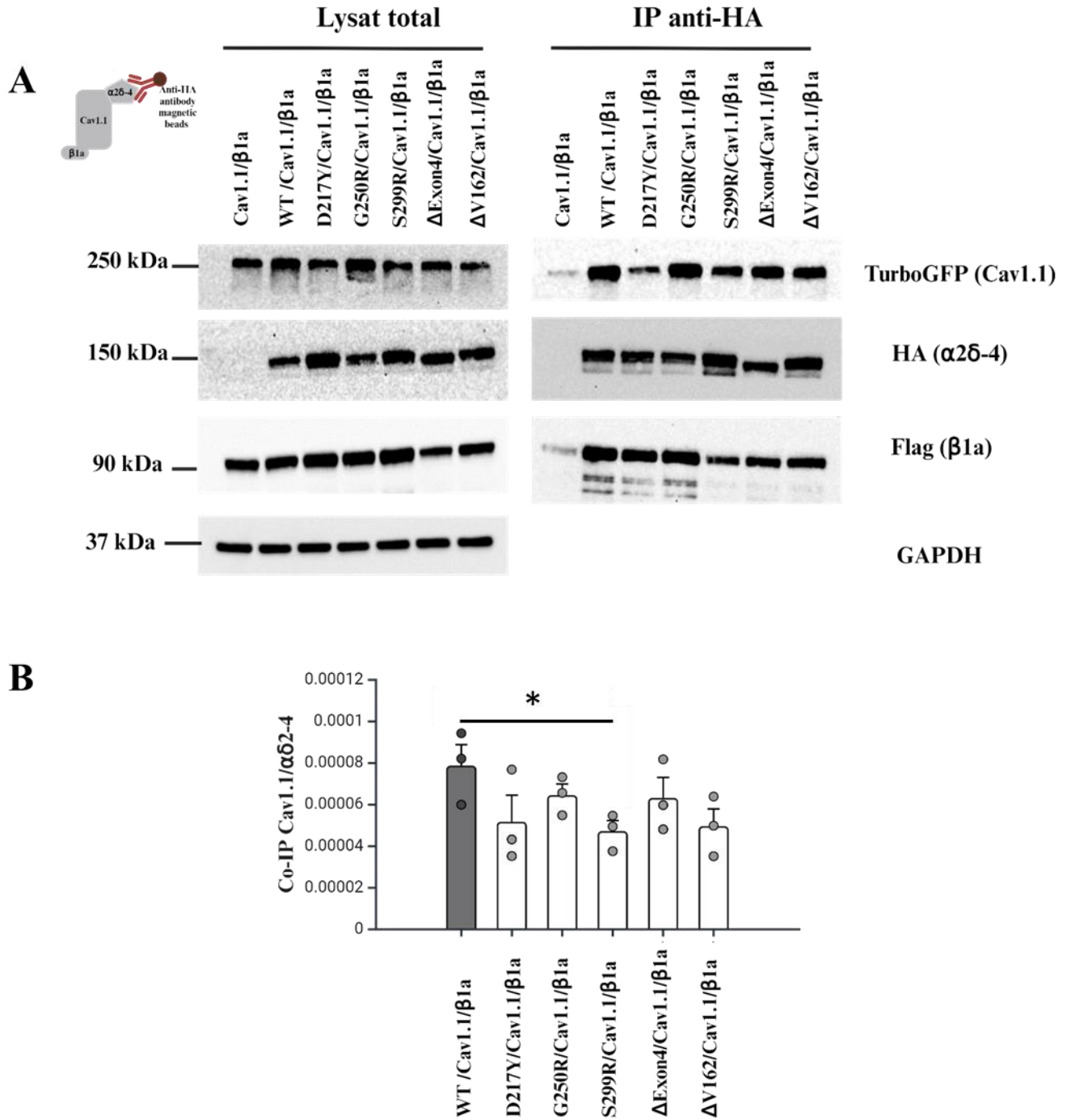


Figure 16 : Etude de l'impact des mutations sur l'interaction entre Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 par co-immunoprécipitation.
A. A droite le lysat total des HEK293T coexprimant Cav1.1-turboGFP/ $\beta 1a$ -flag et $\alpha 2\delta$ -4 WT et mutés. **A gauche** la co-immunoprécipitation anti-HA ($\alpha 2\delta$ -4). **B.** Histogramme de quantification du ratio $\alpha 2\delta$ -4 immunoprécipité sur l'expression totale (lysat total). Test U de Mann-Whitney sur $n=3$ (* $p < 0.05$).

Résultats et discussion

D. Etude de l'impact fonctionnel sur le canal Cav1.1 du DHPR

1. Etude de l'adressage à la surface de Cav1.1

En tant que sous-unités régulatrices des canaux calciques de type L, les sous-unités $\alpha 2\delta$ participent à l'adressage de la sous-unité canalaire $\alpha 1$ (Cav1.x) à la surface par un mécanisme incomplètement compris, impliquant une interaction directe $\alpha 1 - \alpha 2\delta$.

La biotinylation des protéines membranaires a été réalisée sur des cellules HEK293T transfectées, réexprimant Cav1.1 seule, ou coexprimant Cav1.1/ $\beta 1a$, ou Cav1.1/ $\beta 1a$ et $\alpha 2\delta$ -4 WT ou mutée. Les protéines biotinylées ont été éluées grâce à des billes agarose streptavidine. Les protéines membranaires (fraction biotinylée), et le lysat total ont été analysés par western blot (**Figure 17A**). Le rapport Cav1.1 dans la fraction biotinylée sur Cav1.1 dans le lysat total a été calculé pour évaluer la fraction membranaire de Cav1.1 dans chaque condition.

L'observation du lysat total montre l'expression des différentes sous-unités (**Figure 17A**). Dans la fraction biotinylée, on ne note pas de GAPDH, marqueur cytoplasmique, permettant de contrôler l'absence de contamination de la fraction biotinylée par du contenu intracellulaire.

La quantification du rapport Cav1.1 dans la fraction biotinylée sur lysat total montre une augmentation de 33% de l'expression membranaire de Cav1.1 dans la condition Cav1.1/ $\beta 1a$ comparée à Cav1.1 seul ($p=0.02$). On note une augmentation de 55% de l'expression membranaire de Cav1.1 avec l'ajout de $\alpha 2\delta$ -4 WT à la condition Cav1.1/ $\beta 1a$ ($p=0.005$). Ces résultats montrent que $\alpha 2\delta$ -4 WT favorise l'adressage à la membrane de Cav1.1 en présence de $\beta 1a$.

En revanche, l'étude des différentes mutations ne montre pas de différence significative avec la condition Cav1.1/ $\beta 1a$ / HA- $\alpha 2\delta$ -4 WT et donc il n'y a pas d'impact des mutations sur la fonction d'adressage de $\alpha 2\delta$ -4 (**Figure 17B**).

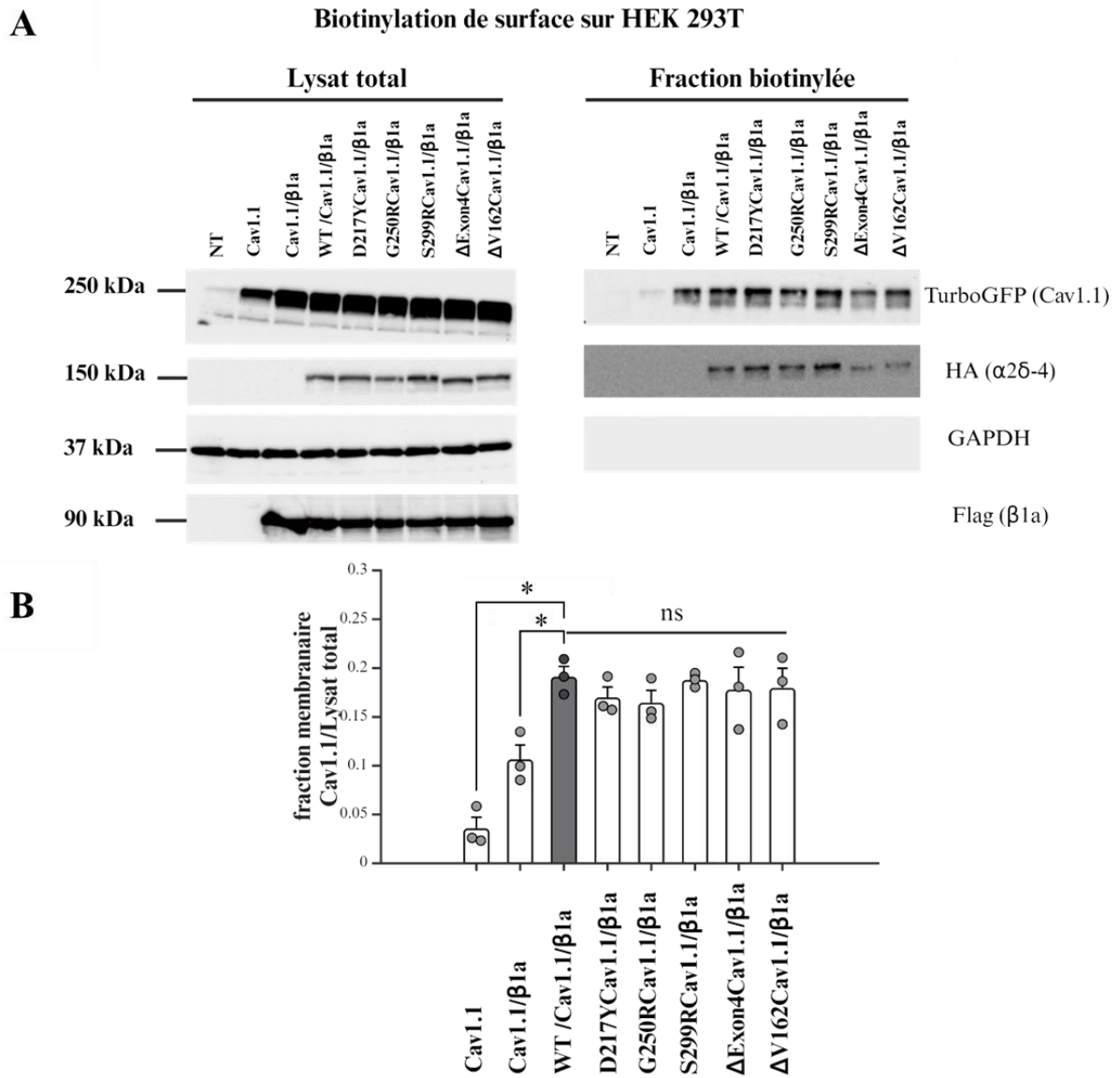


Figure 17 : Etude de l'impact des mutations sur l'adressage à la surface de Cav1.1. A. Western blot représentant le lysat total et la fraction membranaire biotinyliée avec GAPDH comme témoin d'absence de fraction intracellulaire. **B.** Histogramme de la quantification du ratio de Cav1.1 dans la fraction membranaire sur l'expression totale. Test U de Mann-Whitney sur $n=3$ (* $p < 0.05$).

Résultats et discussion

2. Etude en patch-clamp de l'impact de la mutation p.(Ser2299Arg) sur le canal DHPR

a) Sensibilité au voltage

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Amy Lee, Université du Texas, notamment par le Dr. Juan De la Rosa Vázquez. Cette étude a été faite sur l'isoforme $\alpha 2\delta-4$ canonique souris et sur l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta-4$ M identifiée chez la souris (**Etude détaillée dans la partie suivante**).

Il a étudié l'impact de la mutation p.(Ser306Arg) (équivalent souris de la mutation p.(Ser299Arg)) sur les potentiels d'activation, l'inactivation dépendant au voltage, les mouvements de charges et la sensibilité au pH du canal DHPR reconstitué sur des HEK293T coexprimant Cav1.1, $\beta 1a$, Stac3 avec $\alpha 2\delta-1$ WT, $\alpha 2\delta-4$ (FL souris) WT, $\alpha 2\delta-4$ M WT (souris) ou encore $\alpha 2\delta-4$ M avec la mutation S306R.

Dans cette étude, il montre que $\alpha 2\delta-4$ M S306R provoque une tension d'activation demi-maximale du canal plus dépolarisée ($V_h = 39,1 \pm 3,3$ mV) en comparaison à $\alpha 2\delta-1$ ($27,4 \pm 3,3$ mV) ou $\alpha 2\delta-4$ FL ($28,4 \pm 3,2$ mV). Aucune différence n'est observées entre $\alpha 2\delta-4$ M S306R et $\alpha 2\delta-4$ M WT (**Figure 18C**).

Par contre, l'étude du seuil de potentiel entraînant l'inactivation ($V_{h\text{ inact}}$) du canal montre que la mutation S306R sur $\alpha 2\delta-4$ M rend le canal Cav1.1 plus sensible à l'inhibition voltage-dépendante en diminuant le seuil d'inactivation à des potentiels plus faibles en comparaison avec $\alpha 2\delta-4$ M WT. Ce dernier entraîne, en comparaison à $\alpha 2\delta-4$ (FL), une résistance à cette inhibition (**Figure 18F**).

Résultats et discussion

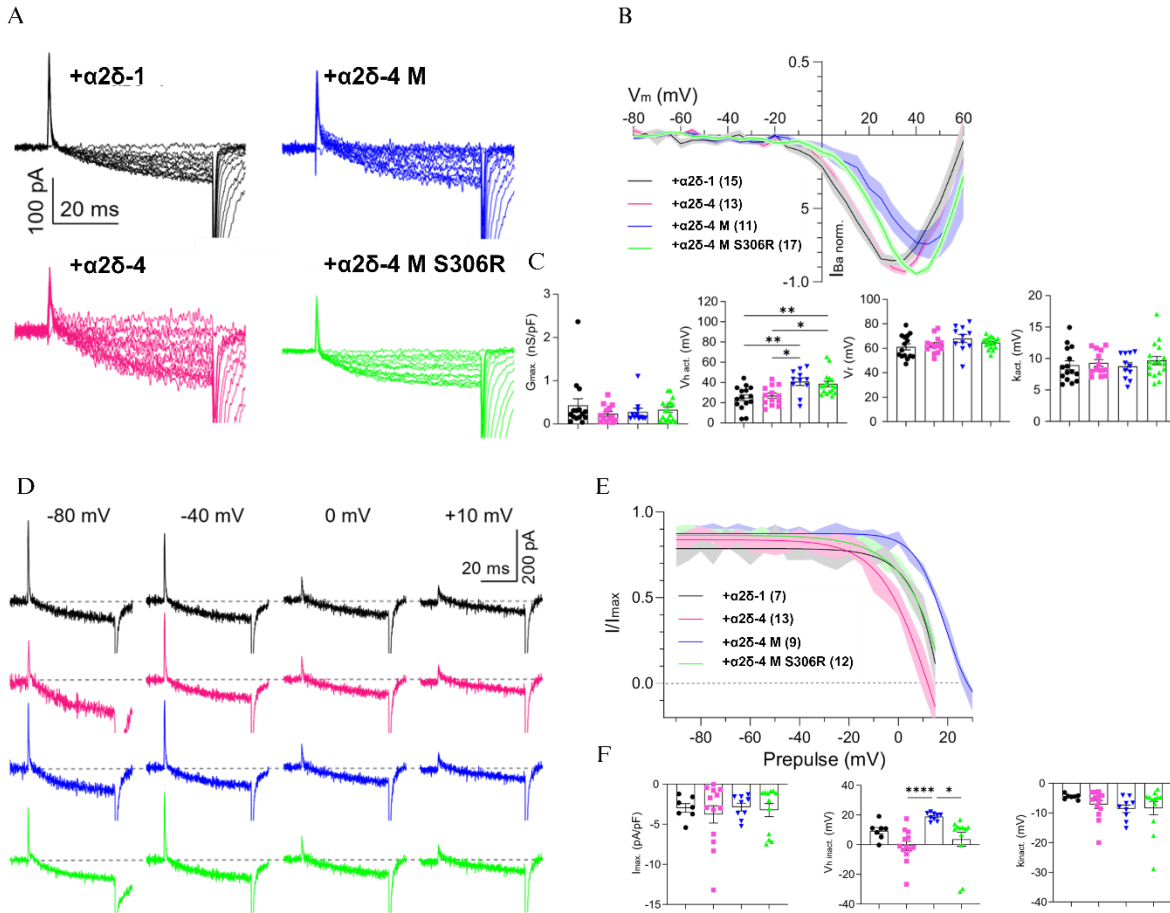


Figure 18 : Etude de l'impact de la mutation S306R sur les potentiels d'activation et de l'inactivation voltage-dépendant du canal Cav1.1. **A.** Courants ioniques mesurés pour différentes conditions expérimentales et potentiels appliqués. **B.** Les courbes représentent la relation entre le potentiel de membrane (V_m en mV) et le courant de barium normalisé (I_{Ba} norm.). **C.** Histogramme des différentes caractéristiques du canal Cav1.1 : G_{max} (nS/pF) : Conductance maximale normalisée par la capacité de la membrane, indiquant la conductivité des canaux par unité de surface de membrane, $V_{h\ act}$ (mV) : Potentiel de demi-activation, le potentiel de membrane auquel la moitié des canaux sont activés. K_{act} (mV) : Pente de la relation courant-tension autour du $V_{h\ act}$, indiquant la raideur de la courbe d'activation. V_r (mV) : Potentiel de repos, le potentiel de membrane stable d'une cellule au repos. **D.** Courant ionique mesuré à différents potentiels de préconditionnement (prepulse) de -80mV à +10mV. **E.** Courbe de mesure les potentiels de préconditionnement en fonction de l'intensité du courant normalisé (I/I_{max}) pour différentes conditions expérimentales. **F.** Histogramme des mesures de la densité de courant I_{max} (pA/pF), du potentiel de mi-inactivation $V_{h\ inact}$ et de la pente d'inactivation K_{inact} (mV). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Résultats et discussion

b) Etude des mouvements de charges

Il a également étudié l'impact de la mutation sur la relation entre le flux de charge à travers le canal et le potentiel de membrane afin d'évaluer la densité d'expression du canal à la surface et donc l'impact de la mutation sur l'adressage à la surface du canal DHPR. Il n'observe pas de différence entre $\alpha 2\delta$ -4 M S306R et $\alpha 2\delta$ -4 M WT en termes de densités de canaux à la surface (**Figure 42B dans la partie mise en évidence de l'isoforme musculaire**).

c) Etude de la sensibilité au pH du DHPR

La sensibilité au pH des canaux calciques voltage-dépendants est un processus permettant de réguler l'excitabilité des cellules.

Pour cette raison, l'impact du mutant *CACNA2D4* p.(Ser306Arg) sur l'inhibition médiée par les protons a été étudiée.

Les potentiels d'activation du canal DHPR ont été mesurés en fonction du pH extracellulaire (8, 7.5, 7.3, 6.7 et 6.3).

Les données confirment la sensibilité du canal DHPR au pH en présence des isoformes sauvages $\alpha 2\delta$ -1 ou $\alpha 2\delta$ -4 musculaire. A pH acide (6.3 et 6.5) le canal est inhibé et s'active à des potentiels plus dépolarisés qu'en milieu basique (8 à 7.5) où le canal s'active à de plus faibles potentiels (**Figure 19D graphique du milieu**).

De manière très intéressante, cette expérimentation montre que la mutation p.(Ser306Arg) diminue la sensibilité du canal au pH. Ainsi, en milieu acide le potentiel d'activation (ΔV_h) du canal en présence d' $\alpha 2\delta$ -4 mutée est plus faible qu'en présence d' $\alpha 2\delta$ -4 M sauvage (**Figure 19D graphique du milieu**).

Résultats et discussion

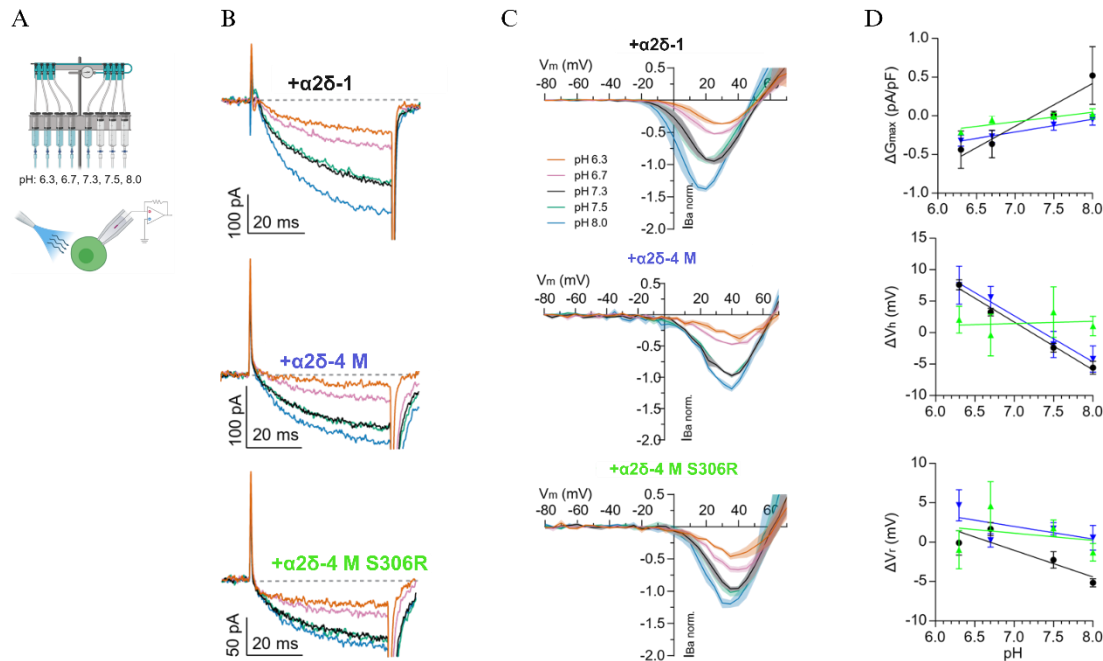


Figure 19 : Etude de l'inhibition dépendante au pH du canal Cav1.1. **A.** Schéma expérimental de patch clamp sur HEK293T avec plusieurs pH testés. **B.** Courbe des courants ioniques mesurés à différents pH (représentés par les couleurs) et à différents potentiels. **C.** Les courbes représentent la relation entre le potentiel de membrane (V_m en mV) et le courant de barium normalisé (IBa norm.) à différents pH. **D.** Quantification de la conductance en fonction du pH ΔG_{max} , du voltage de demi-activation ΔV_h et du potentiel de repos de Cav1.1 en fonction des sous-unités associées (représentées par les couleurs noire ($\alpha 2\delta$ -1), bleue ($\alpha 2\delta$ -4 M WT) et verte ($\alpha 2\delta$ -4 M S306R)).

En résumé, la mutation p.(Ser306Arg) est associée à de nombreuses altérations sur des modèles cellulaires de surexpression. Elle est responsable 1) d'un défaut de localisation de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -4 majoritairement retenue en intracellulaire (observée également pour les autres mutations, 2) d'une altération de l'interaction avec Cav1.1, 3) d'un abaissement du seuil du potentiel d'inactivation de DPHR et 4) d'une diminution de la sensibilité au pH du canal.

E. Discussion

L'objectif de cette partie de la thèse était d'analyser l'impact fonctionnel des variants génétiques des patients souffrants d'hyperthermie d'effort, sur la protéine $\alpha 2\delta$ -4 et de déterminer leur caractère pathogène. Des expériences *in vitro* utilisant des systèmes d'expression hétérologues ont démontré que, bien que l'expression de la protéine ne soit pas affectée par les mutations,

Résultats et discussion

celles-ci entraînent une altération de sa localisation intracellulaire, notamment une rétention périnucléaire et une réduction significative de la localisation à la membrane cellulaire.

Les analyses fonctionnelles révèlent que la mutation p.(Ser299Arg ; S299R), située dans un site clé pour l'interaction avec la sous-unité canalaire Cav1.x, réduit d'environ 25% cette interaction essentielle, tandis que les autres variants n'ont pas d'impact notable sur cette dynamique. De plus, les expériences montrent que les mutations n'affectent pas l'adressage de la sous-unité Cav1.1 à la membrane, mais elles altèrent les propriétés électrophysiologiques du canal, comme une plus grande sensibilité à l'inactivation voltage-dépendante et une moindre sensibilité aux variations de pH.

En conclusion, bien que les mutations ne modifient pas l'expression ou l'adressage à la surface de la sous-unité canalaire Cav1.1, elles impactent la localisation subcellulaire et les fonctions électrophysiologiques des canaux calciques, ce qui pourrait contribuer à la pathogénicité des variants identifiés chez les patients atteints d'hyperthermie d'effort.

Rétention périnucléaire et réduction significative de l'expression à la membrane cellulaire de $\alpha 2\delta$ -4 mutées

Les protéines $\alpha 2\delta$ sont modifiées afin d'être matures pour être adressées à la surface. La protéine synthétisée correctement repliée dans le réticulum est ancrée dans les radeaux lipidiques (DRM) avec une ancre GPI puis clivée en deux parties $\alpha 2$ et δ , maintenues par un pont disulfure, dans le Golgi pour être adressées à la membrane (Davies et al., 2010). Ce défaut d'adressage à la membrane comme effet fonctionnel d'une mutation de la protéine $\alpha 2\delta$ a déjà été identifié dans le cadre de l'encéphalopathie développementale précoce (DEE) sur la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 avec la mutation p.(Gly209Asp) dont la position est très conservée (Dahimene et al., 2022). Ainsi, cette mutation est l'équivalente de la p.(Gly250Arg ; G250R) sur $\alpha 2\delta$ -4, identifiée chez les patients hyperthermie d'effort, qui montre aussi ce même défaut en biotinylation de surface. La mutation Gly209Asp dans le gène *CACNA2D1* entraîne une substitution d'acides aminés qui affecte la structure de la protéine $\alpha 2\delta$ -1. Cette mutation perturbe la stabilité d'une structure en feuillet bêta à trois brins et altère la fonction de la protéine. Elle entraîne aussi une altération du processus de maturation avec des conséquences sur le clivage de la protéine $\alpha 2\delta$ -1. Les résultats montrent que la protéine mutée $\alpha 2\delta$ -1

Résultats et discussion

Gly209Asp subit un clivage protéolytique réduit par rapport à la forme WT $\alpha 2\delta$ -1. Ce clivage enzymatique, qui commence dans l'appareil de Golgi, est considérablement réduit dans le cas de la mutation. Cela suggère que la protéine mutée ne se déplace probablement pas au-delà du réticulum endoplasmique (RE) (Dahimene et al., 2022). Néanmoins, le clivage protéolytique ne semble pas être indispensable dans cette expression membranaire. L'altération du site clivage de $\alpha 2\delta$ -1, en le substituant par un site de clivage de la protéase 3C du Rhinovirus Humain (HRV), n'altère pas l'expression à la surface bien que les courants du canal Cav2.2 associé soient abolis (Kadurin et al., 2016).

La rétention périnucléaire des protéines $\alpha 2\delta$ -4 mutées suggère une altération du trafic RE – Golgi pendant un co-marquage Golgi- $\alpha 2\delta$ -4 avec le GM130 serait nécessaire pour confirmer cette observation. En effet, l'inhibition du trafic intracellulaire avec un dominant négatif Rab11(S25N) ou Rab4(S22N) entraîne ce défaut d'expression membranaire pour $\alpha 2\delta$ -1 et $\alpha 2\delta$ -2 (Meyer and Dolphin, 2021). Cette altération du trafic est également observée avec la liaison de la gabapentine sur le motif RRR du domaine dCache_1 en amont du site VWA (Von Willbrand Factor A), de même qu'avec les mutations R217A $\alpha 2\delta$ -1 et R282A $\alpha 2\delta$ -2 suggérant une implication du domaine dCache_1 N-terminal dans la régulation du trafic des $\alpha 2\delta$ (Tran-Van-Minh and Dolphin, 2010).

Au-delà de leurs fonctions au sein du canal, les sous-unités $\alpha 2\delta$ interagissent avec d'autres protéines de la matrice extracellulaire mais aussi en intracellulaire pouvant jouer sur ce trafic. Ainsi, l'interaction entre $\alpha 2\delta$ -1 et la protéine prion (PrP) se fait dans le réticulum et il a été montré que la mutation de PrP entraîne une rétention intracellulaire de $\alpha 2\delta$ -1 via la perturbation du trafic Rab11 dépendant (Dolphin, 2012; Senatore et al., 2012). Cette donnée montre ainsi que les sous-unités auxiliaires $\alpha 2\delta$ traditionnellement considérées comme des sous-unités auxiliaires qui améliorent le trafic des canaux, augmentent l'expression des canaux calciques fonctionnels à la membrane plasmique et influencent les propriétés biophysiques des canaux mais pourraient aussi avoir des rôles qui ne sont pas directement liés à la fonction des canaux calciques. Par exemple, certaines isoformes $\alpha 2\delta$ pourraient intervenir dans la synaptogenèse.

Résultats et discussion

L'ensemble de ces données montre que l'adressage à la surface de $\alpha 2\delta$ nécessite l'interaction avec des protéines partenaires qui restent à être pleinement identifiées et que le domaine dCache_1 en N-terminal semble jouer un rôle important dans ce processus.

Les mutations identifiées sur $\alpha 2\delta-4$ étant localisées près de ce domaine dCache_1 semblent jouer un rôle dans la régulation du trafic.

Il serait intéressant d'investiguer l'impact des mutations sur l'interaction entre $\alpha 2\delta-4$ et ses partenaires au-delà du canal calcique voltage-dépendant.

Les impacts sur l'interaction et adressage de la sous-unité Cav1.1 du canal DHPR

L'étude par co-immunoprécipitation et biotinylation de surface pour étudier respectivement l'impact des mutations sur la formation du complexe Cav1.1/ $\alpha 2\delta-4/\beta 1a$ et sur l'adressage à la membrane du canal ne montre pas d'altérations drastiques. Néanmoins, la mutation p.(Ser306Arg ; S306R) (Ser299Arg humain) semble réduire l'interaction Cav1.1 avec $\alpha 2\delta-4$ sans abolir cette dernière.

Ces résultats sont en accord avec l'étude des densités de courant qui ne montre pas d'impact sur l'expression membranaire. Dans le contexte de l'hyperthermie d'effort, une altération drastique du canal ne serait pas en accord avec le phénotype observé des patients qui sont des sportifs de haut de niveau en relative bonne santé en dehors des périodes de crises et qui ne présentent pas de myopathies sévères.

Cependant, la mutation p.(Ser306Arg) située sur le site MIDAS ne semble pas avoir sur $\alpha 2\delta-4$ le même un effet que son équivalent p.(Ser261Arg) sur $\alpha 2\delta-1$ où la mutation abolit l'interaction avec Cav1.2 et réduit de façon importante l'amplitude du courant (Briot et al., 2018). L'étude de l'implication du domaine MIDAS de $\alpha 2\delta-2$ sur l'adressage de Cav2.2 en mutant l'ensemble des résidus, ne montre qu'une altération partielle avec 50% de réduction de l'expression membranaire de Cav2.2 et pas d'altération du trafic de $\alpha 2\delta-2$ (Canti et al., 2005). Ces différences soulignent les propriétés intrinsèques de chacune de ces sous-unités mais aussi qu'elles ne sont pas interchangeables. Il est important de souligner que la séquence du domaine MIDAS est légèrement différente entre les sous-unités $\alpha 2\delta-1/ \alpha 2\delta-2$ qui sont dites complètes avec le motif AspXSerXSer (DXSXS) et les résidus discontinus Thr et Asp et $\alpha 2\delta-3/ \alpha 2\delta-4$ qui

Résultats et discussion

manquent et sont donc incomplètes (Canti et al., 2005). Ainsi, une modification du domaine MIDAS sur $\alpha 2\delta$ -1 semble avoir un impact plus important que sur $\alpha 2\delta$ -3 (Kadurin et al., 2016).

Par contre, l'impact observé sur la localisation membranaire de $\alpha 2\delta$ -4 en expression solitaire montrant un défaut d'adressage ne semble pas persister lorsqu'elle est exprimée au sein du canal (**Figure 17**). Cela montre que si les sous-unités $\alpha 2\delta$ aident à l'adressage du canal, la formation du complexe pourrait aider aussi au trafic vers la surface du $\alpha 2\delta$. La persistance avec les mutations de l'interaction $\alpha 2\delta$ -4 et Cav1.1 permettrait d'expliquer ce résultat. Si la nature du mécanisme par lequel $\alpha 2\delta$ aide à l'adressage de Cav1.x n'est pas bien compris, l'hypothèse privilégiée est une interaction pendant le trafic avec des boucles extracellulaires de Cav1.x qui prévient la dégradation protéosomale du canal (Dolphin, 2012). Les études sur le processus d'adressage des $\alpha 2\delta$ montrent la nécessité de protéines partenaires. Le Cav1.x en prenant la place de ces protéines chaperonnes pourrait aussi se substituer à elles dans leur fonction d'aide à l'adressage. C'est un nouveau concept jamais exploré et qui est très important pour mieux comprendre le fonctionnement du complexe canal calcique voltage-dépendant. De plus amples expériences seraient nécessaires pour investiguer cette observation notamment en abolissant l'interaction $\alpha 2\delta$ -4 mutée – Cav1.x et voir si l'adressage au sein du complexe se fait toujours.

L'impact de la mutations p.(Ser306Arg ; S306R) sur les propriétés électrophysiologiques du canal DHPR

Les études des propriétés électrophysiologiques du canal DHPR sur des HEK293T montrent que la mutation p.(Ser306Arg ; S306R) en condition de pH normal, n'altère pas l'activation voltage-dépendant mais rend le canal plus sensible à l'inactivation voltage-dépendant par rapport à la forme $\alpha 2\delta$ -4 WT mais se comportant comme $\alpha 2\delta$ -1WT (**Figure 18**).

Ces données sont en adéquation avec les résultats sur l'adressage à la surface du canal DHPR montrant la pleine expression à la membrane du canal comme le montre aussi l'étude des densités de courant (**Figure 41**). Ainsi, les mutations ne semblent pas altérer l'existence d'un canal fonctionnel à la membrane gardant ses fonctions de senseur du voltage important dans le couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique. Ce résultat très intéressant concorde avec le phénotype des patients qui ont un phénotype conditionné par la pratique du sport intensif. Néanmoins, le canal DHPR forme en endogène un complexe multiprotéique avec

Résultats et discussion

plusieurs protéines localisées au niveau des triades. Une expression hétérologue peut donc ne pas permettre d'apprécier toutes les implications notamment sur le couplage excitation - contraction.

Les sous-unités $\alpha 2\delta$ permettent de moduler les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal (Dolphin, 2012). Ainsi, l'interaction d'une sous-unité $\alpha 2\delta$ mature avec le canal ne joue pas seulement un rôle sur le trafic à la surface mais également permet de rendre fonctionnel le canal en lui conférant entre autres ses propriétés de senseur du voltage. L'absence de clivage protéolytique de la sous-unité $\alpha 2\delta$ -1 qui permet sa maturation n'entrave pas la fonction d'adressage mais exerce un effet inhibiteur sur le canal Cav2.2 le rendant non fonctionnel en abolissant les courants (Kadurin et al., 2016). L'absence de la protéase responsable du clivage protéolytique de $\alpha 2\delta$ -1, ADAM17, entraîne ainsi une réduction importante de l'amplitude des courants du canal Cav2.2 exprimé dans des cellules TSA (Kadurin et al., 2022b). Mais il semble aussi que l'impact que peut avoir la sous-unité $\alpha 2\delta$ dépend aussi de la nature de la protéine canal associée. Ainsi, l'association Cav1.1/ β 1a suffit pour avoir une activité optimale du canal (Mori et al., 1991) et les cellules C2C12 déficientes $\alpha 2\delta$ -1 n'ont pas d'altérations des courants calciques de type L (García et al., 2008). Même si sur ce dernier résultat, la réserve qu'on peut émettre est qu'il est établi que $\alpha 2\delta$ -1 n'est pas la seule isoforme $\alpha 2\delta$ exprimée dans le muscle squelettique (Nabhani et al., 2005).

La sous-unité $\alpha 2\delta$ joue un rôle important pour conférer sa fonctionnalité au canal calcique voltage-dépendant mais ce rôle est conditionné par le processus de maturation de $\alpha 2\delta$. On peut aussi souligner la singularité des complexes formés définissant le poids que peut avoir la fonction régulatrice de $\alpha 2\delta$. Nos résultats montrent donc que les mutations n'altèrent pas de façon drastique la fonction du canal DHPR mais le régule de façon subtile à pH normal concordant avec le phénotype des patients hyperthermie d'effort.

Sensibilité au pH du canal DHPR réduite par la mutation p.(Ser306Arg)

Les expériences de patch-clamp avec modulation du pH extracellulaire sur HEK293T montrent qu'en milieu acide on a un décalage plus polarisé des potentiels d'activation du canal calcique voltage-dépendant de type L, DHPR, et plus faible à pH basique comparé au pH 7.4, traduisant

Résultats et discussion

respectivement une réduction de l'amplitude du courant en milieu acide et une augmentation à pH basique. Cette régulation est atténuée par la mutation p.(Ser306Arg) qui rend le canal moins dépendant aux modifications de pH notamment levant l'inhibition induite par l'acidose. L'acidose métabolique est un phénomène très marqué chez les sujets hyperthermie d'effort avec une chute significative du pH à 6.5 lors d'un exercice en comparaison avec des contrôles (Bendahan et al., 2001).

La régulation des canaux calcique voltage-dépendant de type L par le pH a été étudiée dans les cardiomyocytes. Les effets des ions H^+ sur le courant calcique dans les cellules cardiaques ventriculaires ont été étudiés en détail. Il a été constaté que l'amplitude du courant est augmentée dans des solutions alcalines par rapport à un pH de 7,4, et réduite dans des solutions acides (Krafte and Kass, 1988). Des décalages de la modulation de l'ouverture des canaux calciques ont été observés. Ces décalages sont attribués à des changements de potentiel de surface causés par la liaison des ions H^+ à des charges négatives fixes sur la surface de la membrane. De plus, l'étude suggère qu'un mécanisme supplémentaire, tel qu'un blocage du canal par les ions H^+ , contribue à la modification de l'amplitude du courant. Ces résultats suggèrent que les canaux calciques sont susceptibles d'être impliqués dans les effets de l'acidose et de l'alcalose sur les propriétés cellulaires du myocarde intact (Krafte and Kass, 1988). Le site de protonation dans le canal calcique de type L a été identifié à la surface externe de la protéine du canal en dehors du canal de perméation indiquant que l'influence sur la conductance relève d'un mécanisme indirect (Pietrobon et al., 1989). Aujourd'hui avec l'identification des sous-unités régulatrices, on montre que cette régulation passe par l'intermédiaire des sous-unités $\alpha 2\delta$. Les domaines dCache_1 identifiés par homologie avec les domaines de chimiotaxie des bactéries sont connus pour réguler la capacité des bactéries à détecter les variations de pH dans leurs milieux (Manson, 2020).

Des mutations sur ce domaine ont été déjà associées à des situations pathologiques. Les mutations dans le domaine dCache_1 du gène *CACNA2D1* ont été associées à des troubles neurologiques et du développement, tels que l'épilepsie et l'atrophie cérébrale. Ces mutations ont également été liées à une insensibilité à la douleur. En résumé, les mutations dans le domaine dCache_1 des gènes *CACNA2D* ont des implications importantes sur la santé

Résultats et discussion

humaine, affectant à la fois le système nerveux et le système cardiovasculaire (Page et al., 2023).

En conclusion, on démontre le caractère pathogène des mutations sur *CACNA2D4* identifiées chez les patients de la cohorte Hyperthermie d'effort. Ces études apportent aussi une meilleure compréhension des fonctions des sous-unités $\alpha 2\delta$ et ouvrent le champ à des questions intéressantes à explorer.

Résultats et discussion

II. Phénotype clinique et cellulaire du modèle murin Knock-In *CACNA2D4*^{WT/S306R}

A. Développement du modèle murin Knock-In *CACNA2D4*^{WT/S306R}

La première étape a été la création d'un modèle murin portant une des mutations trouvées dans la cohorte de patients souffrants d'hyperthermie d'effort.

Dans le cadre de ce projet, un choix parmi les quatre mutations identifiées dans la cohorte a été fait pour générer une souris Knock-In. Le variant faux-sens *CACNA2D4* c.897G>G (p.Ser299Arg) a été retenu comme le plus intéressant, car il est situé dans le domaine fonctionnel d'interaction protéine-protéine MIDAS et une mutation en position équivalente dans la sous-unité $\alpha\delta$ -1 est associée à un phénotype pathologique (Dahimene et al., 2022).

L'alignement des isoformes *CACNA2D4* humain et murin a permis de montrer que l'acide aminé Arginine en position 299 était conservé chez la souris en position 306.

Il a donc été décidé de développer un modèle KI *CACNA2D4*^{WT/S306R} sur fond C57BL/6J (Figure 20).

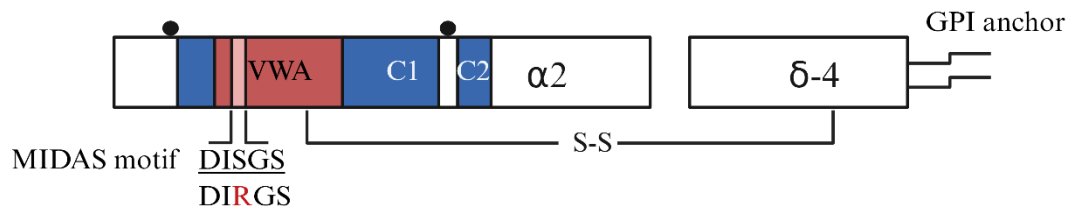


Figure 20 : Schéma de la protéine $\alpha\delta$ -4 avec la position de la mutation en rouge sur le motif MIDAS

Le modèle murin développé a servi dans plusieurs tests notamment pour mettre en évidence un phénotype d'hyperthermie d'effort avec un challenge d'exercice physique sur tapis roulant. Mais également sa sensibilité à la chaleur et à l'isoflurane, anesthésique halogéné, a été étudiée pour explorer le lien entre hyperthermie d'effort et l'hyperthermie maligne peranesthésique.

Résultats et discussion

Du tissu musculaire, des fibres et cellules satellites isolées issus du modèle murin ont également servi pour investiguer l'expression des protéines du complexe CRC, les mécanismes de relâchement de calcium et les propriétés électrophysiologiques du canal DHPR.

Le variant faux-sens *CACNA2D4* c.918C>G p.(Ser306Arg), équivalent c.897G>G p.(Ser299Arg) humain trouvé chez un patient de la cohorte d'hyperthermie d'effort, a été introduit par édition génique avec CRISPR Cas9 chez la souris C57BL/6J. Un site de restriction BamHI a également été inséré par l'introduction de mutations silencieuses c.921C>A p.(Gly307Gly), c.922A>T p.(Ser308Ser) et c.923G>C p.(Ser308Ser) afin de faciliter le génotypage des souris.

La genèse du modèle murin a été réalisée à l'ENS Lyon dans le plateau de biologie expérimentale de la souris.

La présence de la mutation p.(Ser306Arg) a été vérifié comme suit une fois le modèle obtenu.

Un prélèvement de queue de souris a été réalisé à l'ENS de Lyon et envoyé au laboratoire CMyPath. L'ADN a été extrait puis le génotypage en routine consiste en deux étapes : 1) Une PCR avec des amorces placées de part et d'autre de la région mutée puis 2) une digestion du produit PCR par BamHI. Un séquençage a été fait pour les souris fondatrices (**Figure 21AB**).

Résultats et discussion

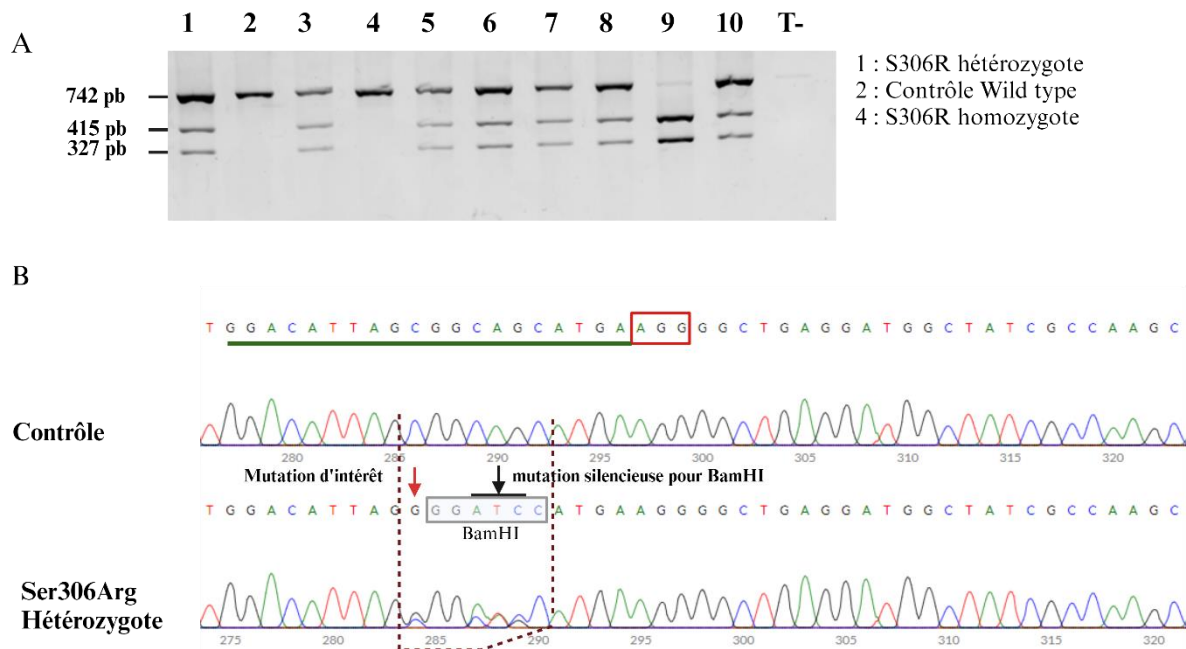


Figure 21 : Développement par CRISPR Cas9 du modèle murin *CACNA2D4*^{WT/S306R}. **A.** Protocole de génotypage par digestion des produits PCR avec BamHI dont un site unique a été introduit **B.** Chromatogramme montrant la mutation S306R (flèche rouge) et les mutations silencieuses (flèche noire) insérées pour introduire un site de restriction BamHI pour la stratégie de génotypage.

L'absence de mutations off target a également été vérifié. Les mutations dites off target sont des mutations introduites involontairement par la technique CRISPR Cas9 hors de la cible souhaitée (ici hors du variant p.(Ser306Arg ; S306R)).

Les mutations off-targets sont susceptibles de ne pas ségréger de la mutation d'intérêt (ici le variant p.(Ser306Arg)) lorsqu'elles sont situées sur le même chromosome à moins de 20 cM (CentiMorgan) de cette dernière (Teixeira et al., 2018b). Les off-targets potentiels situés sur cette zone ont été identifiés avec l'outil bio-informatique CRISPOR puis recherchés par PCR et séquencés (**Figure 22**).

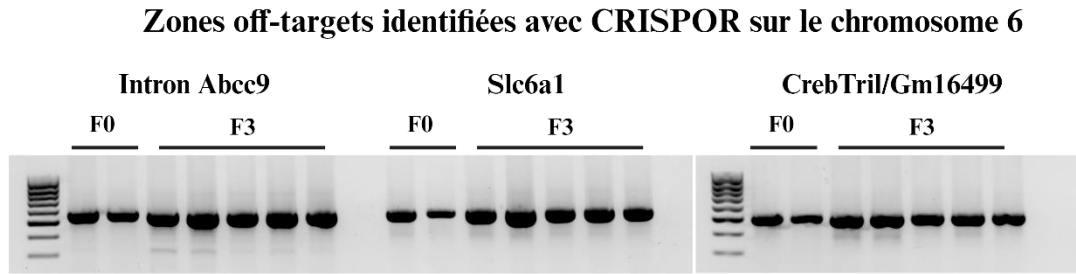


Figure 22 : Amplification par PCR des zones off-targets situées sur le même chromosome 6 que *CACNA2D4* et non ségréguées par backcross. Bandes purifiées par la suite et séquencées.

Par la suite, les souris fondatrices ont subi trois backcross pour éliminer les éventuels off targets situés ailleurs sur le génome.

Les souris hétérozygotes ainsi obtenues étaient fertiles et ne présentaient aucun phénotype comportemental observable évident.

B. Mise en évidence d'un phénotype d'hyperthermie d'effort

Pour établir l'implication du gène candidat *CACNA2D4* dans la survenue de l'HE, les souris Knock-In *CACNA2D4*^{WT/S306R} ont été soumises à un challenge physique et leurs performances comparées aux souris wild-types issues de la même portée.

Le protocole de stress physique pour la caractérisation d'un phénotype d'hyperthermie d'effort (HE) dans ce modèle murin a été basé sur ce qui a été mis en place pour entraîner un épuisement dû à l'effort chez la souris WT et qui constitue le meilleur modèle d'étude se rapprochant de l'Hyperthermie d'effort actuellement (Garcia et al., 2020).

Le modèle murin a été mis dans des conditions de stress physique similaires avec une course sur tapis roulant permettant de mettre en évidence la survenue éventuelle d'hyperthermie d'effort.

Des souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R} et WT, mâles (WT=7, KI-S306 = 8) et femelles (WT=15, KI-S306=15), des mêmes portées âgées de 2-3 mois ont été soumises à une course intense sur tapis à une vitesse de 10cm/s pendant 1h avec des conditions environnementales de

Résultats et discussion

37°C et une humidité de 40-60%. L'exercice a été arrêté avant 1h en cas d'épuisement, défini par plus de 10 secondes d'immobilité de la souris sur le tapis roulant. En fin de course, les souris ont été euthanasiées et un prélèvement de sang réalisé pour dosage des CPK (Créatine PhosphoKinase).

J'ai ainsi comparé les performances physiques des souris Knock-In *CACNA2D4*^{WT/S306R} et les WT, compagnons de portée. La tolérance à l'exercice est mesurée par le temps de course, les modifications de la température centrale par une sonde rectale en début et fin de course et la survenue de rhabdomyolyse par le dosage des taux plasmatiques de créatine phosphokinase a été évaluée.

1. Tolérance à l'exercice

Le temps de course a été analysé pour les souris wild-types et les hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R}. L'étude a été réalisée sur les deux sexes.

Chez les mâles, le nombre de souris ayant terminé l'épreuve (1h de course) est de 0/8 pour le groupe KI et 0/7 pour le groupe WT. Le temps moyen passé sur le tapis de course pour les souris est de 20,14 minutes ($\pm 2,18$ minutes) pour le groupe WT et 21,5 min ($\pm 2,64$ minutes) pour le groupe KI ($p=0.9966$) (**Figure 23**).

Chez les femelles grâce à cette tolérance à l'effort physique, on a pu mettre en évidence que les souris WT passent plus de temps sur le tapis avant arrêt soit en moyenne 53 minutes ($\pm 3,35$ minutes) contre 46 minutes (± 4 minutes) pour les *CACNA2D4*^{WT/S306R} ($p=0.0582$) qui passent moins de temps sur le tapis (**Figure 23**).

La comparaison des souris mâles avec les souris femelles WT montre une tolérance significativement supérieure des femelles avec un temps moyen de 53 minutes soit 2,63 fois le temps des souris mâle WT de 20,14 minutes pour atteindre l'un des point d'arrêts de l'exercice.

La comparaison chez les KI va dans le même sens avec 2,13 fois de temps pour les femelles KI-S306R comparées aux mâles.

En conclusion, ces résultats ne montrent pas de différences importantes de performance à l'exercice (temps de course) entre les souris wild-type et hétérozygotes quel que soit le sexe.

Résultats et discussion

Il est à noter que les souris mâles indépendamment du génotype montrent une faible tolérance à l'exercice dans le cadre de ce protocole de challenge physique intense. Cette différence sexe dépendant des performances physiques a déjà été décrite avec ce même protocole (Garcia et al., 2018a).

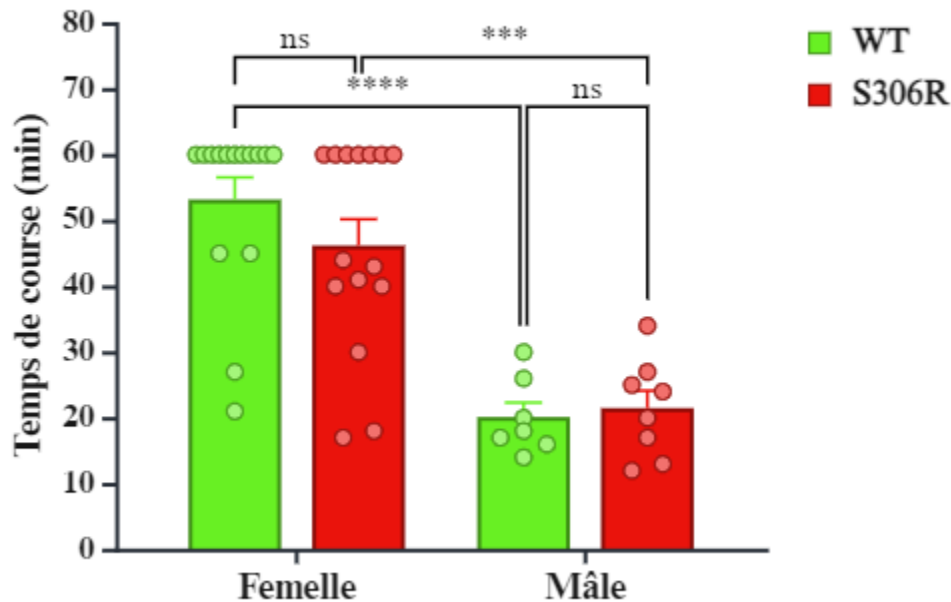


Figure 23 : Tolérance à l'effort. Histogrammes du temps moyen de course avant d'atteindre les points limites fixés pour mesurer la tolérance à l'effort. . *t-test* non apparié (mâle n=7 pour WT et 8 pour S306R , femelle n= 15 pour chaque génotype) (ns $p > 0.005$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

2. Etude des modifications de la température rectale : survenue d'une hyperthermie

L'hyperthermie d'effort se caractérise par une augmentation brusque de la température centrale corporelle au-delà de 40,5°C (Bouchama et al., 2022). La température rectale des souris a été relevée en début et en fin d'exercice.

Plusieurs informations sont ressorties de cette observation.

D'abord chez les mâles, on note une température rectale au début de la course significativement plus élevée ($p < 0.01$) chez les souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R} avec

Résultats et discussion

37,6°C ±0,13 en moyenne comparés aux souris WT avec 36,9°C±0,17 de moyenne. Cette observation va dans le sens d'un métabolisme basal plus élevé chez les hétérozygotes comme c'est le cas dans certaines pathologies métaboliques.

A la fin de l'exercice, les souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R} ont une température rectale moyenne de 44,23°C±0,12, évoquant une hyperthermie sévère (**Figure 24**). Néanmoins, on ne note pas de différence significative avec les souris WT qui présentent aussi une hyperthermie moyenne à 44,27°C±0,17.

Cette dernière observation est à mettre en lien avec la faible tolérance à l'exercice physique des souris mâles quel que soit leur génotype.

Chez les femelles, le temps de course moyen plus long a permis de suivre la montée en température sur un temps plus long.

Les souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R} et WT, ne présentent pas de différence de température rectale en début de course, respectivement 37,48°C±0,2 Vs 37,39°C±0,18 (p=0,9991). Les souris KI présentent en revanche une température en fin de course significativement plus élevée que les WT (43,49°C±0,3 vs 42,48°C±0,3 ; p=0,03517). Cette différence marque la survenue d'une hyperthermie plus sévère chez les souris femelles KI *CACNA2D4*^{WT/S306R} que les femelles WT (**Figure 24**).

En résumé, ces résultats montrent une hyperthermie plus importante (chez la femelle) de la souris mutée hétérozygote *CACNA2D4* p.(Ser306Arg), compatible avec une susceptibilité à l'hyperthermie d'effort de ce modèle murin.

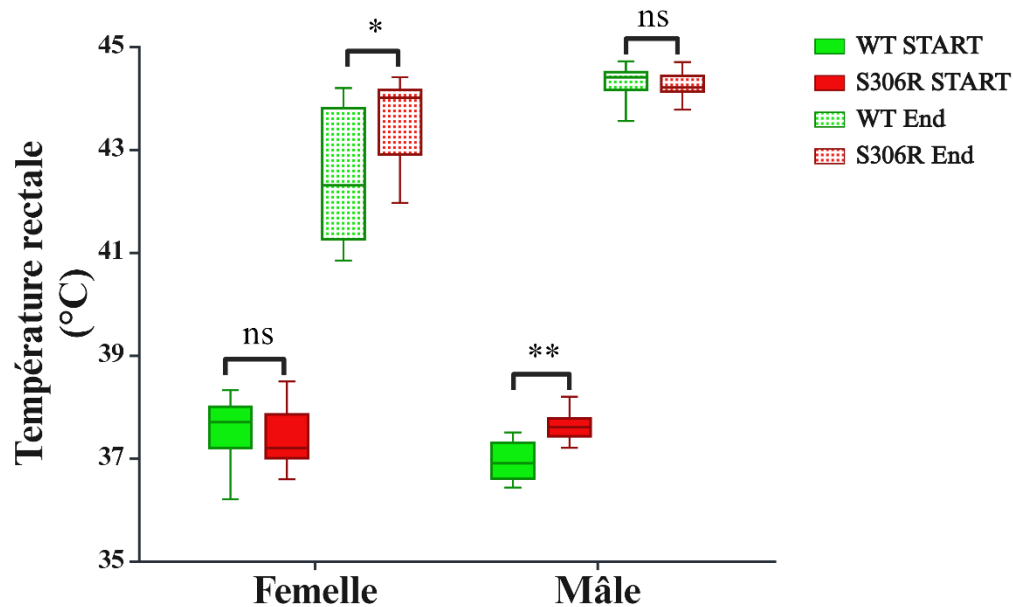


Figure 24 : Mesures de la température rectale en début et fin de course. Boxplot représentation au 95% percentile des relevés de température rectale avant et après course. *t-test* non apparié (mâle n=7 pour WT et 8 pour S306R , femelle n= 15 pour chaque génotype) (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

3. Etude du taux plasmatique de créatine phosphokinase (CPK)

Un des signes cliniques associés systématiquement à l'hyperthermie d'effort est la rhabdomyolyse. La CPK (créatine phosphokinase) est une enzyme présente dans les cellules musculaires. Lorsque des lésions musculaires se produisent, telles que celles observées dans la rhabdomyolyse, le taux de CPK dans le sang augmente (Kruijt et al., 2023).

L'évaluation de la rhabdomyolyse a été mesurée par le taux de CPK. Le taux de CPK a été évalué dans le plasma des souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R} et WT en fin d'exercice, ainsi que chez des souris WT n'ayant pas été soumis au stress physique.

Chez les mâles, le taux basal de CPK au repos chez les souris mâles WT sédentaires est de 752 mmol/L ±174,94. En fin de course, les valeurs de CPK atteignent 17604 mmol/L chez les WT et 29803 mmol/L en moyenne chez les souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R}. Les taux de CPK relevés ont une moyenne significativement plus élevée (+41%, p=0.0263) chez les KI

Résultats et discussion

que les WT de la même portée (**Figure 25**). Ceci témoigne d'une rhabdomyolyse plus importante chez les hétérozygotes que chez les WT.

Chez les femelles, le taux basal relevé chez les souris femelles WT sédentaires est de 2174 mmol/L \pm 583 en moyenne. En fin d'effort, les souris WT présentent un taux de CPK augmenté à 3375 mmol/L de moyenne, mais de manière non significative ($p=0,6725$). En fin d'effort, les hétérozygotes femelles *CACNA2D4*^{WT/S306R} ont en moyenne 9036 mmol/L de CPK, un taux significativement plus élevé que les WT (63%, $p=0.0420$) (**Figure 25**). Une rhabdomyolyse est donc observée en fin d'effort chez les souris femelles KI, avec un taux de CPK significativement plus élevée que chez les WT.

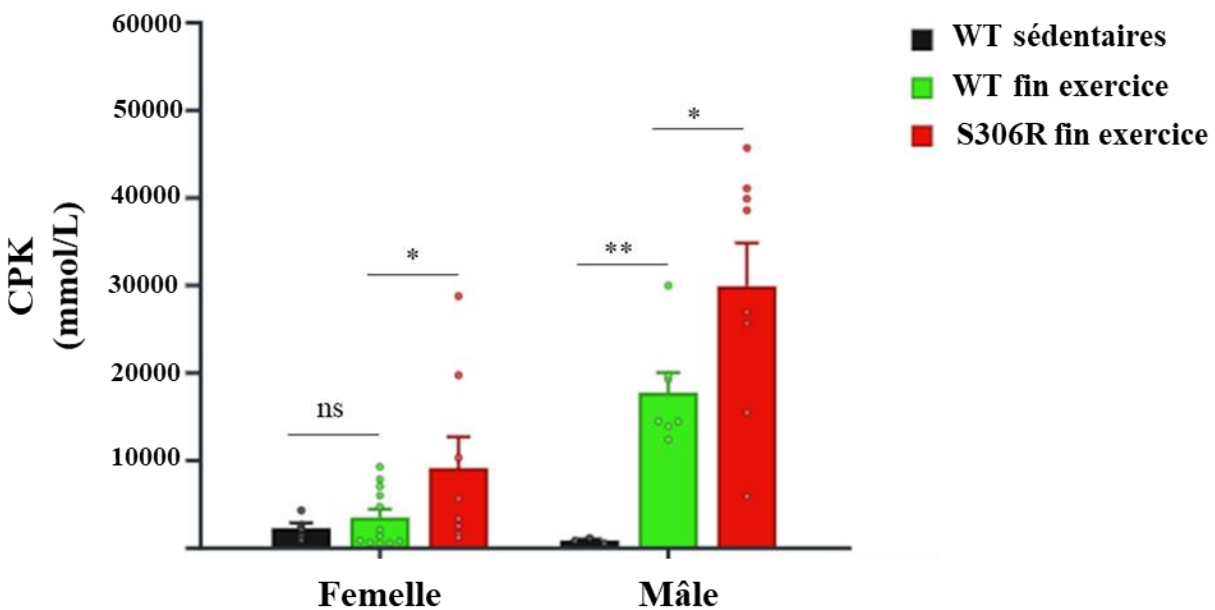


Figure 25 : Dosage des taux plasmatiques de CPK. Mesure des taux plasmatiques de créatine phosphokinase à la fin du protocole d'exercice. *t-test* non apparié (mâle n=7 pour WT et 8 pour S306R , femelle n= 15 pour chaque génotype) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Pour résumer, le modèle murin muté hétérozygote *CACNA2D4*^{WT/S306R} présente 1) une susceptibilité accrue à l'hyperthermie à l'effort intensif chez les femelles et 2) une rhabdomyolyse d'effort accrue chez les 2 sexes par rapport aux compagnons de portées, témoignant d'une atteinte musculaire

Résultats et discussion

Ces données pointent une implication du gène *CACNA2D4* dans la survenue de l'hyperthermie d'effort. La rhabdomyolyse témoigne d'une altération dans l'intégrité du muscle squelettique en lien avec la survenue du phénotype HE observée chez le modèle *CACNA2D4*^{WT/S306R}.

Les résultats pointent aussi des différences importantes entre les souris mâles et femelles, avec une tolérance à l'effort plus importante chez les femelles.

C. Sensibilité à l'isoflurane (anesthésique halogéné)

La proximité des mécanismes physiopathologiques entre l'hyperthermie d'effort et l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM) a toujours soulevé l'hypothèse de deux pathologies avec des étiologies communes.

La présence d'un test anormal de contracture musculaire *in vitro* à la caféine et/ou à l'halothane dans les deux pathologies, alimente cette controverse depuis plusieurs années.

Dans cette partie, nous avons voulu rechercher une éventuelle susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique chez le modèle murin d'hyperthermie d'effort, hétérozygote *CACNA2D4*^{WT/S306R}.

On a ainsi, en utilisant les mêmes protocoles mis en place pour les modèles murins HM (Protasi et al., 2009), testé la susceptibilité à l'isoflurane, un anesthésique halogéné, et à la chaleur.

Les souris *CACNA2D4*^{WT/S306R} et WT ont été soumises à une anesthésie générale avec 2% isoflurane dans l'air pendant 1h30 tout en surveillant la température rectale.

L'étude a été faite chez les souris femelles et mâles WT et *CACNA2D4*^{WT/S306R} (n= 9 pour chaque génotype).

Chez les mâles, la température en début d'anesthésie est 36,78°C±0,07 chez les souris WT et de 36,96°C±0,28 chez les KI (p=0,1455). En fin d'anesthésie, la température est de 33°C±0,56 chez les souris WT et de 33,45°C±0,66 chez les KI (p=0,321).

Les données sont similaires chez les femelles (T0 : WT 36,56°C / KI 36,74°C, T70 WT 32,57°C/ KI 33,12°C).

Résultats et discussion

Les courbes de suivi des moyennes de température sur 70 minutes d'anesthésie chez les souris WT et S306R se chevauchent parfaitement (**Figure 26AB**).

Aucune hausse de la température corporelle n'est observée durant l'anesthésie aussi bien chez les mâles que les femelles *CACNA2D4*^{WT/S306R}. Une baisse régulière est au contraire observée comme attendue lors d'une anesthésie à l'isoflurane.

L'ensemble de ces observations ne montre pas de sensibilité à l'isoflurane ainsi on ne note pas de mimétisme hyperthermie maligne peranesthésique avec ce modèle.

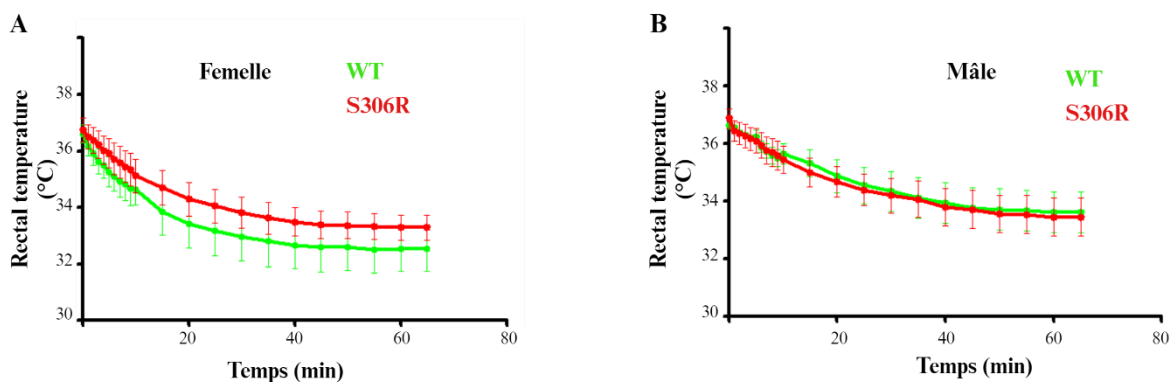


Figure 26 : Etude de la survenue d'hyperthermie maligne peranesthésique sur le modèle *CACNA2D4*^{WT/S306R}. Courbes de l'évolution de la température rectale au cours de l'anesthésie à l'isoflurane chez les femelles A (n=3 pour WT et n=4 pour S306R) et mâles B (n=4 WT et n=4 S306R). *t*-test non apparié (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

D. Sensibilité à la chaleur

L'exposition à de fortes températures est décrite pouvant favoriser la survenue de crises d'hyperthermie maligne peranesthésique chez la souris. Cela a notamment été rapporté pour les modèles murins KO *CASQ1* et *RYR1* Y522S (Dainese et al., 2009; Durham et al., 2008).

Nous avons donc regardé si la chaleur ambiante pouvait déclencher une hyperthermie chez les souris KI. Pour cela, des souris ont été placées dans une chambre climatique réglée à 41 °C pour 30 minutes avec une hygrométrie stable. La température corporelle (mesure rectale) a été mesurée avant de placer les souris dans la chambre climatique et à la fin de l'expérimentation.

Résultats et discussion

Chez les mâles, 12 souris WT et 13 souris KI ont été étudiées. Neuf souris pour chaque génotype ont été utilisées pour les femelles.

Chez les mâles WT, la température corporelle est de 37,08°C avant mise à la chaleur et monte à 42,41°C après 30 minutes à 40°C. Chez les mâles KI, la température corporelle est de 37,26°C avant mise à la chaleur et monte à 42,66°C après 30 minutes à 40°C.

Chez les femelles WT, la température corporelle est de 37,8°C avant mise à la chaleur et monte à 43,25°C après 30 minutes à 40°C. Chez les femelles KI, la température corporelle est de 37,83°C avant mise à la chaleur et monte à 43,49°C après 30 minutes à 40°C.

Une hyperthermie est bien observée lors de l'exposition à la chaleur dans tous les groupes.

Aucune différence statistiquement significative n'est observée entre les groupes WT et KI au niveau de la température corporelle, que ce soit à température ambiante ($T^{\circ}=22^{\circ}\text{C}$) ou après exposition à la chaleur (**Tableau 9**)

Tableau 9 : Les variations de la température au cours du test à la chaleur

Sexe	Génotype	Début (T0)	SEM	Fin (T30)	SEM	p-value Two-way ANOVA
Femelle	WT	37.8	0.1716	43.2552	0.4744	p>0.05
	KI-S306R	37.833	0.1333	43.4889	0.5048	
Mâle	WT	37.0833	0.1497	42.4167	0.7075	p>0.05
	KI-S306R	37.2615	0.1551	42.6692	0.5377	

En résumé, ce modèle murin génétique *CACNA2D4*^{WT/S306R} montre une hyperthermie d'effort (chez les femelles), une rhabdomyolyse accrue à l'effort, mais ne montre pas de susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique (test à l'isoflurane (anesthésique halogéné)), ni d'hyperthermie à la chaleur.

Ces résultats sont extrêmement encourageants pour l'implication du gène *CACNA2D4* comme gène candidat de l'hyperthermie d'effort.

Résultats et discussion

E. Etude de l'impact du variant p.(Ser306Arg) du gène *CACNA2D4* au niveau musculaire squelettique

L'impact du variant p.(Ser306Arg) a été étudié au niveau musculaire squelettique par des études cellulaires réalisées sur tissus musculaires ou myotubes de souris KI ou WT.

Plusieurs études ont été réalisées.

J'ai dans un premier temps investigué l'expression des acteurs (RyR1, Stac3 et Cav1.1) du CRC dans le muscle squelettique des souris *CACNA2D4*^{WT/S306R}.

J'ai ensuite regardé si le variant p.(Ser306Arg) avait un impact sur l'homéostasie calcique musculaire en fonction du pH. En effet, l'acidose métabolique, signe d'un défaut métabolique, est un des signes physiopathologiques mis en évidence dans l'hyperthermie d'effort avec une chute rapide et précoce du pH dans le muscle squelettique des patients (Bendahhan et al., 2001). Il est aussi connu que les canaux calciques voltage-dépendants de type L sont sujets à une inhibition proton dépendant (Klößner and Isenberg, 1994). J'ai donc étudié les flux de calcium du réticulum vers le cytosol en lien avec le complexe de relâchement du calcium (CRC) sur des myotubes issus de cellules satellites WT et provenant des souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R} en testant différents pH (6.3, 7.4 et 8).

Enfin, en collaboration avec Bruno Allard de l'INMG de Lyon, il a également été fait une étude électrophysiologique sur des fibres musculaires isolées *CACNA2D4*^{WT/S306R} et WT issus de compagnons de portées. Cette étude faite à pH physiologique a permis d'analyser les courants calciques de Cav1.1 et le couplage excitation-contraction en mesurant les libérations de calcium.

1. Etude de l'expression de Stac3, Cav1.1 et RyR1 chez les souris *CACNA2D4*^{WT/S306R}

L'expression des protéines formant le complexe de relâchement du calcium, RyR1, stac3 et Cav1.1, a été étudiée sur des lysats de quadriceps de souris hétérozygotes *CACNA2D4*^{WT/S306R}, quantifiée et comparée par rapport à des compagnons de portées WT.

L'analyse des expériences ne montre pas de différences d'expression pour RyR1 (n=3, **Figure 27B**). Mais de façon surprenante, on observe une hausse significative de l'expression de Cav1.1

Résultats et discussion

chez les souris hétérozygotes (20% $p=0.05$) (**Figure 27B**). Enfin, pour *Stac3* on observe de façon significative ($p=0.05$) une baisse de 10% de l'expression chez les souris *CACNA2D4*^{WT/S306R} hétérozygotes (**Figure 27B**).

Ces résultats nécessitent de plus amples investigations pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Néanmoins, c'est très intéressant car des mutations sur *Stac3* donnant la myopathie des Amérindiens sont associées à une susceptibilité à l'hyperthermie maligne, donc à une altération métabolique musculaire du calcium menant à une dérégulation de la balance thermorégulatrice. Mais on ne note pas d'altération dans l'expression de *RyR1*.

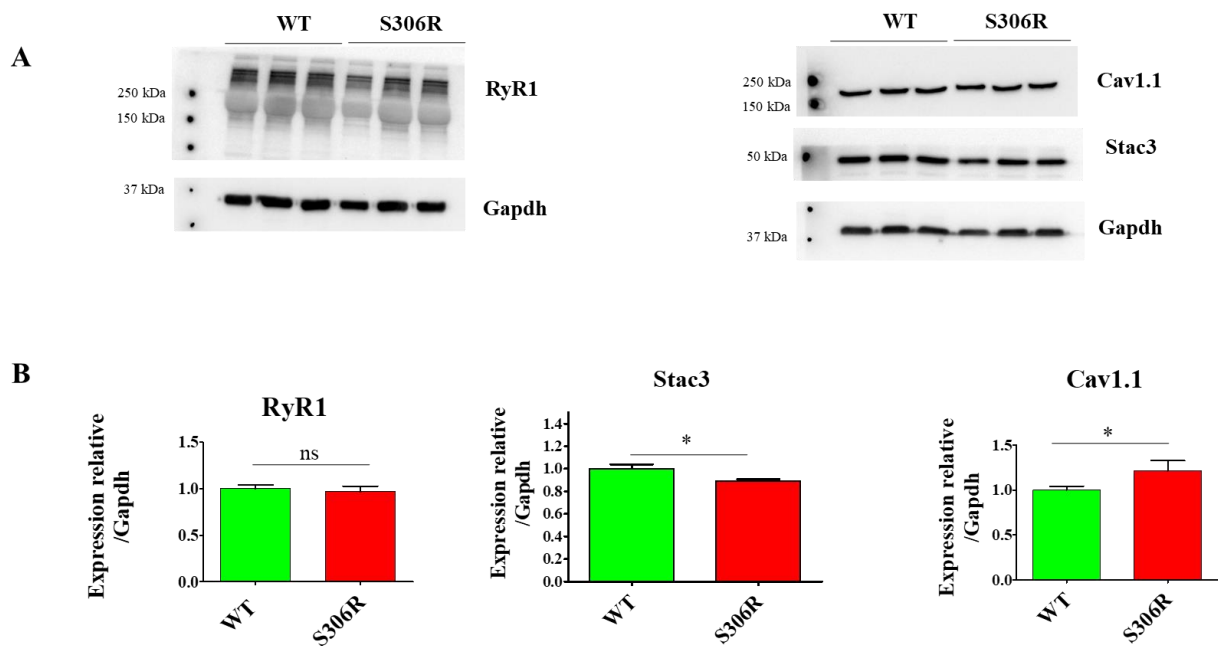


Figure 27 : Etude de l'expression de RyR1, Stac3 et DHPR. A. Western blot de l'expression des acteurs du CRC sur des lysats de quadriceps de souris *CACNA2D4*^{WT/S306R} et leurs compagnons de portés WT. **B.** les histogrammes de la quantification de l'expression rapportée au GAPDH (n=3). Test non paramétrique de Mann-Whitney U (* $p < 0.05$).

2. Etude des relâchements de calcium sur myotubes

Les cellules satellites issues des souris *CACNA2D4*^{WT/S306R} et WT ont été mises en différenciation pendant trois jours. Les myotubes placés dans du tampon KREBS ont été stimulés soit avec du KCl 140 mM à 3 pH différents (8 ; 7,4 et 6,3), soit avec un agoniste de *RyR1*, le 4 CMC, puis les relâchements de calcium ont été étudiés grâce à une sonde calcique,

Résultats et discussion

le Fluo-4 Direct qui fluoresce avec l'augmentation de calcium cytoplasmique. Le pic maximum de fluorescence a été mesuré.

- *Stimulation KCl 140 mM aux pH 6.3/7.4/8*

La quantification des pics maximums de calcium relargué par le canal RyR1 suite au stimulus KCl 140 mM montre les résultats suivants.

On observe que plus le pH est basique, plus la quantité de calcium libéré est importante (**Figure 28D**). Cette donnée est observée sur myotubes *CACNA2D4^{WT/S306R}* et WT. En d'autres termes, la libération de Ca²⁺ est sensible au pH.

Voici maintenant les résultats concernant la comparaison des deux génotypes en fonction du pH.

A pH 7.4, correspondant au pH physiologique, on ne note pas de différence entre les deux génotypes (**Figure 28ADG**).

A pH 8, on observe une augmentation significative de 10% des libérations de calcium sur myotubes *CACNA2D4^{WT/S306R}* comparés aux myotubes *CACNA2D4^{WT/WT}* ((p<0.0001) **Figure 28CDG**).

A pH acide 6.3, on note également une augmentation significative de 8% de calcium libéré chez les *CACNA2D4^{WT/S306R}* ((p=0.0094) **Figure 28ADG**).

L'augmentation des pics de calcium entre le pH 8 et 6.3 chez les myotubes WT montre une sensibilité au pH (**Figure 28G**) qui est levée dans les myotubes KI-S306R (**Figure 28G**). Cela met en exergue la perte de la sensibilité au pH dans les myotubes KI-S306R notamment l'inhibition induite par l'acidose.

Ces résultats montrent une altération du couplage excitation contraction en présence de la mutation p.(Ser306Arg) dans les conditions acides ou hyper-basique.

Résultats et discussion

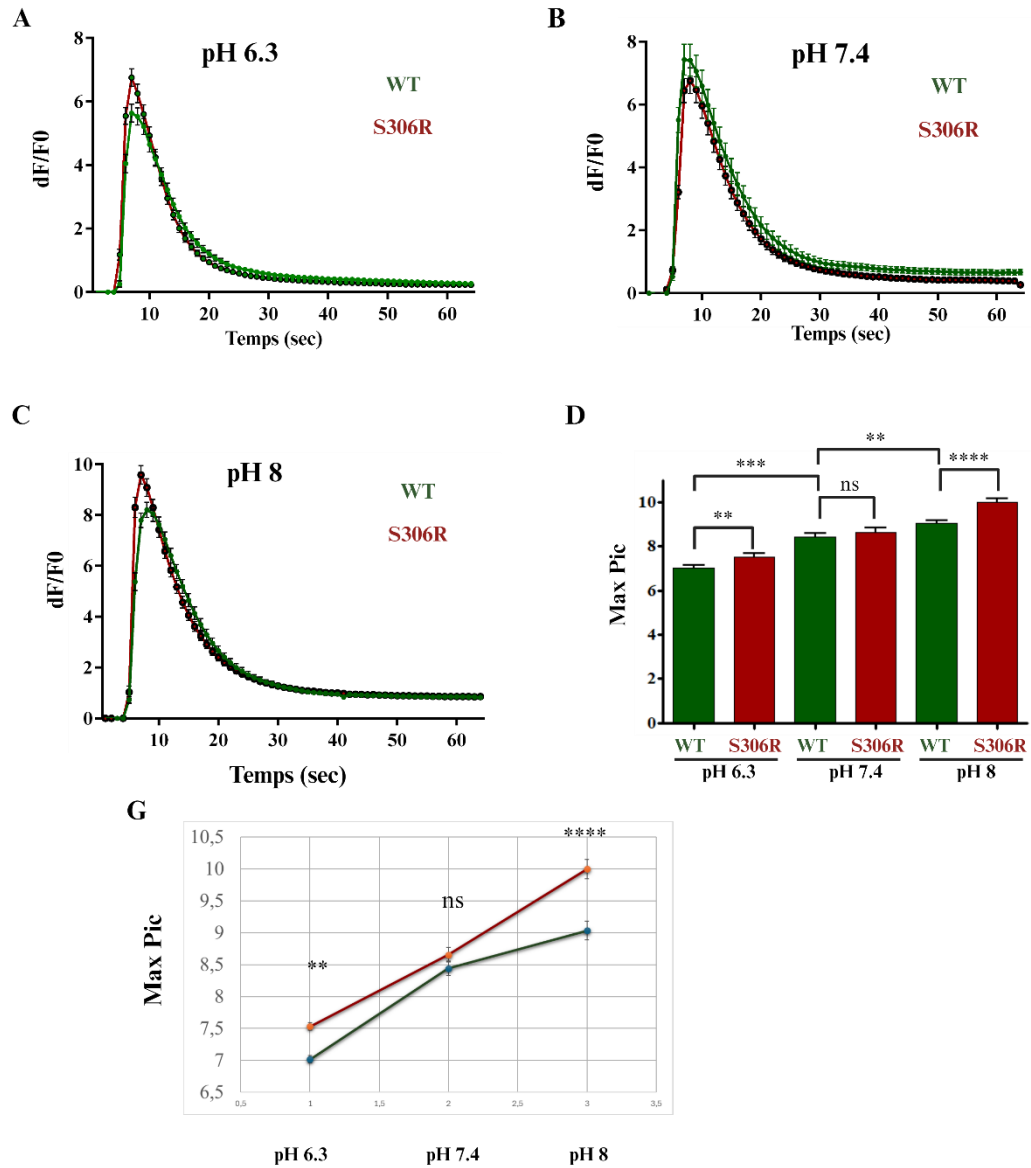


Figure 28 : Etude du couplage excitation-contraction chez les souris $CACNA2D4^{WT/S306R}$. Etude des relâchements de calcium avec une stimulation KCl 140mM grâce à une sonde calcique le Fluo4 en fonction du pH. **A.** pH 6.3 (n=156 pour WT et 194 pour S306R). **B.** pH 7.4 (n=135 pour WT et 174 pour S306R) et **C.** pH 8 (n=144 pour WT et 149 pour S306R). **D.** Histogramme des pics maximaux de libération de calcium en fonction du pH. **G.** Courbes des pics maximaux de libération de calcium en fonction du pH. *t-test non apparié* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Résultats et discussion

- Stimulation au 4 CMC

Pour étudier la libération de calcium via le canal RyR1, j'ai utilisé comme stimuli le 4-CMC (4-Chloro-m-cresol) 500 μ M, un agoniste du canal RyR1 et ainsi s'affranchir de l'effet du DHPR.

La comparaison entre les myotubes hétérozygotes KI et WT ne montre pas de différence dans la quantité de calcium relarguée du réticulum vers le cytosol par le canal RyR1 (**Figure 29**).

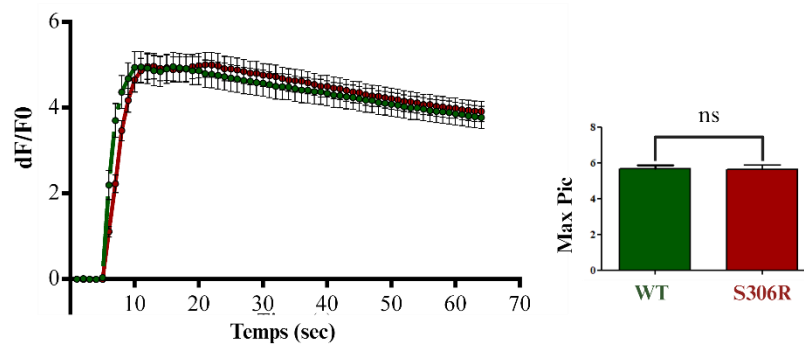


Figure 29 : Courbe des relâchements de calcium sous stimulus 4-CMC à pH 7.4 (n=113 pour WT et 132 pour p.(S306R)). *t*-test non apparié (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Ces observations ne montrent pas d'altération de la libération de calcium par le canal RyR1 à pH physiologique (pH 7.4). De plus amples investigations seraient nécessaires, comme des stimulations à l'halothane ou à la caféine pour déterminer ou pas une hypersensibilité du canal RyR1. Des études à différents pH permettraient aussi une meilleure comparaison avec l'étude au KCl.

3. Electrophysiologie sur fibres isolées à pH physiologique

Ces résultats sont le fruit d'une collaboration avec le Dr. Bruno Allard de l'INMG de Lyon afin d'étudier les courants calciques de Cav1.1 et les relâchements de calcium du réticulum.

- Etudes des courants calciques de Cav1.1

L'étude de la fonction de senseur du voltage du canal DHPR a été mesurée en étudiant la réponse du canal Cav1.1 (par mesure de la variation d'intensité) à une série de potentiels de membrane appliqués, allant de -80 mV à +30 mV. L'analyse ne montre pas de différences

Résultats et discussion

significatives entre les fibres isolées des souris WT et des hétérozygotes p.(Ser306Arg), même si la courbe courant-tension semble différente (**Figure 30B**). Ainsi, les différents paramètres mesurés, la conductance $G(S/F)$, le potentiel de réversion $E_{rev}(mV)$, la demi-tension d'activation $E_{1/2}$ et la pente de la relation courant-tension $k(mV)$ ne montrent pas de différences significatives malgré les tendances observées (**Figure 30C**).

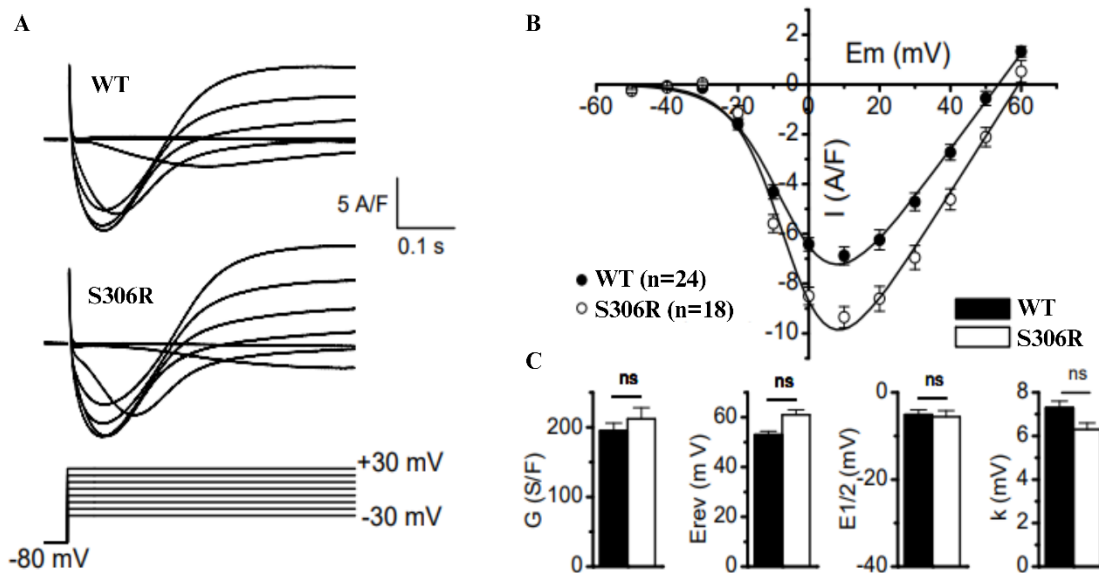


Figure 30 : Etudes des courants calciques de Cav1.1 entre les fibres issues de souris WT et hétérozygotes pour la mutation S306R sur CACNA2D4. **A.** Courbes de courant-tension pour des canaux ioniques dans des fibres de type WT (WT) et mutants (S306R). Les courbes illustrent la réponse des canaux ioniques à une série de potentiels de membrane appliqués, allant de -80 mV à +30 mV. **B.** Le graphique représente une courbe courant-tension où l'axe des ordonnées (y) indique le courant ionique (I) en picoampères par femtofarad (pA/F) et l'axe des abscisses (x) indique le potentiel de membrane (E_m) en millivolts (mV). Les points noirs représentent les données pour les WT et les cercles ouverts pour les fibres S306R. **C.** En dessous du graphique de courbe, il y a quatre graphiques à barres qui comparent les paramètres électrophysiologiques entre les cellules WT et mutantes. De gauche à droite, ces paramètres sont la conductance maximale (G) en siemens par farad (S/F), le potentiel de réversion (E_{rev}) en millivolts (mV), la demi-tension d'activation ($E_{1/2}$) en millivolts (mV), et la pente de la relation courant-tension (k) en millivolts (mV). Les barres noires représentent les cellules WT et les barres blanches les cellules mutantes. Les annotations "ns" indiquent qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes WT et mutantes pour ces paramètres. (ns>p=0,05).

Résultats et discussion

- *Etude des relâchements de calcium voltage-dépendant du réticulum*

Une étude des relâchements de calcium voltage-dépendant par le réticulum a également été faite. Les mesures sont celles du transitoire calcique dans des fibres WT et hétérozygotes p.(Ser306Arg).

Les tracés illustrent la réponse en calcium à différents potentiels de membrane, indiqués par les valeurs -40 mV, -50 mV et -80 mV (**Figure 31A**).

La constante de la pente courant-tension (k), paramètre qui mesure la sensibilité du canal à la tension est significativement plus faible pour les fibres S306R (**Figure 31C**).

En revanche, le pic de la vitesse de changement de la concentration de calcium (peak dCa/dt) ne montre pas de différence sur la quantité totale de calcium libéré (**Figure 31B**). L'étude de la vitesse maximale d'activation (max), la vitesse maximale à laquelle un canal ionique s'ouvre en réponse à un stimulus, et le potentiel de demi-activation ne montrent pas de différences significatives (**Figure 31C**).

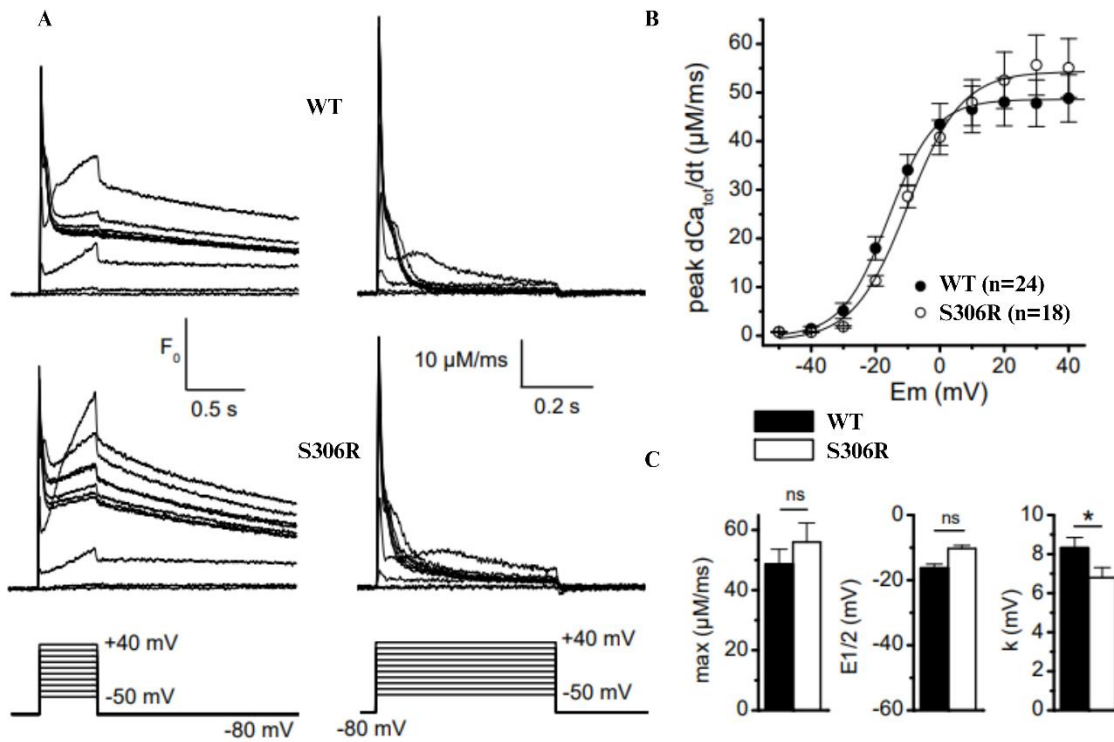


Figure 31 : Etude des relâchements de calcium voltage-dépendant du réticulum. A. L'image montre des tracés représentant des mesures de calcium transitoire dans des fibres de type WT (WT) et portant la mutation S306R. Les tracés illustrent la réponse en calcium à différents potentiels de membrane, indiqués par les valeurs -40 mV, -50 mV et -80 mV. B. La relation entre le pic de la vitesse de changement de la concentration de calcium (noté "peak dCa/dt") et le potentiel de membrane (Em). C. Histogrammes pour trois paramètres mesurés : la vitesse maximale d'activation (max), le potentiel à mi-activation (E1/2) et la constante de temps d'activation (k). (ns>p=0,05).

Pour résumer, l'étude de l'expression des partenaires du CRC et des relâchements de calcium sur myotubes de souris *CACNA2D4*^{WT/S306R} montre plusieurs différences intéressantes par rapport aux souris *CACNA2D4*^{WT/WT} reflétant une modification du CRC.

Premièrement, on note une diminution de l'expression de stac3.

Ensuite, les études d'imagerie calcique montrent pour la première fois dans des myotubes la sensibilité du couplage excitation-contraction au pH. Les relargages de calcium du réticulum vers le cytosol augmentent avec le pH.

Résultats et discussion

Surtout, les myotubes *CACNA2D4*^{WT/S306R} montrent une perte de sensibilité à la régulation due au pH. Une augmentation significative du flux calcique est constatée à pH acide et basique comparée aux myotubes WT.

On ne note pas d'altération du canal RyR1. Ni la fonction canal, ni l'expression ne semblent altérées par la mutation. Ceci fait penser que la dérégulation du couplage est en amont, au niveau du DHPR.

L'étude sur fibres isolées à *pH physiologique* ne montre pas de différences significatives sur le niveau des flux de calcium vers le cytosol. L'absence d'altération à pH physiologique est cohérente avec l'imagerie calcique sur myotubes à pH 7,4 et est cohérente avec la clinique de l'hyperthermie d'effort dont le déclencheur est le stress physique intense.

F. Discussion

Cette première partie de mon travail de thèse explore un modèle murin génétiquement modifié pour étudier la survenue de l'hyperthermie d'effort (HE). La mutation ciblée est le variant faux-sens p.(Ser306Arg) *CACNA2D4*, équivalent à la mutation humaine p.(Ser299Arg) *CACNA2D4* retrouvée chez un patient HE. Après l'introduction de cette mutation chez la souris via CRISPR-Cas9 et la vérification de l'absence d'effets hors cible (off-targets), des tests phénotypiques ont été effectués. Ces tests incluaient l'évaluation de la tolérance à l'exercice, des changements de la température corporelle et des taux de créatine phosphokinase (CPK) pour mesurer la rhabdomyolyse, une destruction des fibres musculaires.

Les souris mutantes montrent une moindre tolérance à l'exercice, une hyperthermie plus sévère et des taux de CPK élevés, indiquant une rhabdomyolyse marquée.

Les études *in vitro* mettent en lumière les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Les tests sur les myotubes de souris hétérozygotes ont démontré une sensibilité au pH du couplage excitation-contraction avec une inhibition à pH acide et une suractivation à pH basique. La mutation sur *CACNA2D4* entraîne une augmentation significative des relâchements de calcium à pH acide (6.3) et alcalin (pH 8) comparée au contrôle. De plus, une réduction de l'expression de la protéine Stac3 a été constatée chez les souris hétérozygotes.

Résultats et discussion

L'étude électrophysiologique sur fibres isolées n'a pas montré de différence significative entre les souris WT et mutantes à pH physiologique.

Enfin, l'étude a examiné le potentiel rapprochement entre l'HE et l'HM en testant la sensibilité des souris mutantes aux anesthésiques halogénés et à la chaleur, deux déclencheurs connus de l'HM. Les résultats n'ont pas montré de sensibilité accrue, ce qui suggère que, les variants sur *CACNA2D4* pourraient être responsables d'HE mais non d'HM peranesthésique. La question se pose de savoir si, malgré des similitudes, l'HE et l'HM pourraient être des entités pathologiques distinctes. Ces découvertes ouvrent la voie à une meilleure compréhension des mécanismes de l'HE.

Prédisposition génétique dans l'HE avec l'implication de *CACNA2D4*, sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants de type L.

La mise en évidence d'une prédisposition génétique dans le cadre de l'hyperthermie d'effort, en lien avec un défaut dans l'homéostasie calcique, résultant de ces travaux de thèse et de travaux antérieurs du laboratoire, vient valider les nombreuses études et hypothèses postulées dans ce sens (Abriat et al., 2014; Endo et al., 2022; Hopkins et al., 1991b; Sagui et al., 2015a).

Les travaux du laboratoire montrent, dans une cohorte de soldats, ayant fait une hyperthermie d'effort bien caractérisée avec une température rectale au moment de la crise supérieure à 40°C accompagnée d'une rhabdomyolyse et un test de contracture *in vitro* du muscle anormal à l'halothane et à la caféine, une prévalence de 10% des mutations sur *CACNA2D4* chez 4 patients non apparentés. Cela a établi un lien génétique fort avec la possible implication de ce gène dans la survenue de l'HE (Bosson, 2020). Donc nous avons postulé l'existence d'une prédisposition génétique dans l'HE avec l'implication de *CACNA2D4*, sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants de type L.

La population à risque d'hyperthermie d'effort est des jeunes en relative bonne forme physique avec une pratique régulière d'une activité sportive de haute intensité (Alele et al., 2020). Donc, on a choisi des souris âgées de 2 à 3 mois représentatives de la population à risque de HE. Les conditions environnementales de l'étude ont été choisies pour favoriser la survenue d'une crise

Résultats et discussion

de HE comme il est établi que les fortes températures et taux d'humidité sont des facteurs de risque (Laitano et al., 2019b).

L'hyperthermie d'effort est une situation critique avec des symptômes sévères, un développement rapide qui s'accompagne d'une forte mortalité si absence de prise en charge rapide (Alele et al., 2020). Si la sensibilisation a permis une meilleure prise en charge des patients permettant de baisser de la mortalité, 75% des sujets ont des séquelles notamment avec des atteintes multi-organes (Leon, 2004). On constate aussi une hausse de l'incidence qui a doublé passant de 0,21 à 0,45/1000 personnes/an entre 2011 et 2019 (Alele et al., 2020). Une hausse de la participation des femmes dans des événements sportifs de haute intensité et l'augmentation du recrutement dans l'armée font aussi augmenter l'incidence dans ce groupe (Garcia et al., 2018b).

Comprendre les mécanismes prédisposant à la pathologie permettrait une meilleure prévention. Aujourd'hui, les connaissances sur la génétique de l'hyperthermie d'effort sont très limitées. Avec cette étude, on fait une avancée importante dans la compréhension de cette pathologie en montrant une prédisposition génétique, avec l'implication du gène *CACNA2D4*. Ainsi, on reproduit avec ce modèle murin hétérozygote KI-S306R *CACNA2D4*, les principaux critères de la pathologie : une hyperthermie avec une température rectale de plus de 43°C et une rhabdomyolyse avec des taux plasmatiques de CPK de 2 fois plus élevés que chez les souris WT reproduisant ainsi le phénotype observé chez les patients.

La clinique de l'hyperthermie d'effort se caractérise aussi par une hausse des CPK avec 92% des patients avec des taux élevés anormaux supérieur à 5000 U/L (Abriat et al., 2014; Warren et al., 2002). Ce modèle murin montre un phénotype d'hyperthermie d'effort qui reproduit plus fidèlement la clinique de la maladie notamment une rhabdomyolyse plus marquée que le modèle d'étude utilisé dans la littérature avec le double des taux de CPK chez les hétérozygotes.

Nos résultats montrent aussi une différence marquée entre mâles et femelles, avec chez les femelles une plus grande tolérance au protocole de stress physique. Cette différence a été étudiée en détails par (Garcia et al., 2018b) qui montre qu'avec les mêmes paramètres de test, les femelles montrent une plus grande tolérance à l'exercice dans des conditions de chaleur, courent plus de distance et sont capables de supporter des charges thermiques internes plus

Résultats et discussion

élevées. On note des taux de CPK à l'effort moins élevés montrant une sorte de protection à la rhabdomyolyse liée au sexe (**Figure 25**). On parle d'effet protecteur des œstrogènes à la rhabdomyolyse (Warren et al., 2002).

Vue l'importance du diagnostic et de la prévention face à l'augmentation de l'incidence de l'hyperthermie d'effort, ce résultat est important et pourrait permettre chez les sujets HE ayant un test IVCT anormal d'intégrer la recherche de mutations sur ce gène dans un visé préventif.

Défaut de l'homéostasie calcique chez le modèle KI-S306R *CACNA2D4*

CACNA2D4, sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendant, est impliquée dans la voie de régulation de l'homéostasie calcique. L'altération du métabolisme calcique dans le muscle squelettique a été souvent évoquée dans l'hyperthermie d'effort du fait de sa ressemblance avec l'hyperthermie maligne peranesthésique et de tests IVCT anormaux dans le HE (Sagui et al., 2015b). C'est donc logiquement qu'on a étudié cette voie de signalisation. On montre ici l'altération des relâchements de calcium dans des myotubes des souris hétérozygotes conditionnée par les variations de pH. On note une augmentation significative ($p < 0.01$) des relâchements de calcium du réticulum vers le cytosol au pH 6.4 (**Figure 28**).

On montre pour la première fois un mécanisme à déclenchement conditionné permettant d'expliquer l'effet initiateur de l'exercice physique avec l'acidose métabolique comme point de départ. Les mécanismes physiopathologiques finaux communs de la rhabdomyolyse comprennent une augmentation incontrôlée du calcium intracellulaire libre et l'activation de protéases dépendantes du calcium, conduisant à la destruction des myofibrilles et à la digestion lysosomale des contenus des fibres musculaires (Warren et al., 2002). Ainsi, l'altération de l'homéostasie calcique constatée sur le modèle murin *CACNA2D4* KI-S306R pourrait permettre d'expliquer la survenue de la rhabdomyolyse.

Ce défaut du calcium intracellulaire dans les myotubes hétérozygotes semble passer par une perte de sensibilité au pH acide du canal DHPR.

On note aussi une baisse de 10% significative ($p < 0.05$) de l'expression de *Stac3* chez le modèle murin. Cette protéine adaptatrice dans le couplage DHPR-RyR1 a été associée à des défauts de l'homéostasie calcique musculaire notamment dans la myopathie des natifs amérindiens

Résultats et discussion

conférant une susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique (Grzybowski et al., 2017).

Mais d'autres mécanismes, pouvant expliquer les défauts de l'homéostasie calcique, peuvent aussi être évoqués avec l'implication d'autres canaux comme le canal chlore activé par le calcium, *ANO1/TMEM16a*. Chez les souris KO *CACNA2D4*, la localisation du canal *ANO1* dans les photorécepteurs est altérée se localisant au niveau des corps cellulaires et non dans les terminaisons synaptiques (Caputo et al., 2015). Cette localisation du canal *ANO1* est importante dans le processus de myogenèse. Sa localisation au niveau de la membrane du réticulum régule l'inhibition des canaux calciques IP3 (Récepteur à l'inositol triphosphate), qui participent aux relâchements de calcium du réticulum vers le cytosol (Yuan et al., 2022). Pour finir, il a aussi été montré dans le muscle squelettique du poisson zèbre que le canal chlore *ANO1* localisé sur le sarcolemme joue un rôle dans la contraction musculaire en accélérant la vitesse de repolarisation grâce à l'influx de chlore et augmente le train de potentiel d'action (Dayal et al., 2019).

Une altération du métabolisme basal chez les souris KI-S306R mâles ayant subi le protocole d'entraînement d'une semaine ?

Un autre résultat très intéressant et surprenant, est la température basale, relevée chez les souris mâles hétérozygotes incluses dans le protocole de course, qui est significativement ($p < 0.01$) plus grande avec un différentiel d' 1°C comparée aux souris WT (**Figure 24**). Cela peut traduire un métabolisme basal plus élevé comme cela a été montré dans l'hyperthermie maligne peranesthésique chez les souris *RYR1 Y524S* qui présentent un défaut métabolique du calcium musculaire (Wang et al., 2020). De façon surprenante, cette différence n'est pas présente chez les femelles (**Figure 24**) ni chez les souris mâles des autres études réalisées.

Le métabolisme musculaire pendant l'exercice est modifié par une série de réactions biochimiques et de régulations physiologiques qui s'adaptent pour répondre aux demandes énergétiques spécifiques de l'activité physique en cours (Hargreaves and Spriet, 2020).

Lien entre hyperthermie d'effort et hyperthermie maligne peranesthésique

Des gènes impliqués dans l'homéostasie calcique ont récemment été mis en cause dans la survenue d'hyperthermie d'effort. Des études récentes, dont une au sein de notre laboratoire, a mis en évidence un lien entre des mutations survenues sur des gènes impliqués dans l'homéostasie calcique, *TRPV1* et *ASPH*, dans la survenue de l'HE (Bosson et al., 2020; Endo et al., 2022). Si la voie de signalisation est la même impliquant des défauts dans les relâchements de calcium, toutefois les mécanismes restent différents. *TRPV1* est un canal cationique non sélectif perméable aux ions calcium et impliqué dans la thermosensation. Les mutations identifiées altèrent la fonctionnalité du canal mais l'implication physiopathologique dans l'HE reste à déterminer (Bosson et al., 2020). Le gène *ASPH* code par épissage alternatif la junctine qui est une des régulatrices de RyR1 et ainsi les mutations identifiées dans l'étude entraînent une altération de ce canal avec une sensibilité à l'halothane et à la chaleur rappelant plus l'HM (Endo et al., 2022).

Les similarités entre l'hyperthermie d'effort et l'hyperthermie maligne peranesthésique ont amené à l'hypothèse d'une altération de l'homéostasie calcique comme cause commune (Laitano et al., 2020b). Dans l'hyperthermie maligne, une hypersensibilité du canal RyR1 est en cause (Papapetrou and Ferguson, 2023). Sur notre modèle, on n'a pas décelé une altération du canal RyR1 avec l'étude des relâchements de calcium utilisant le 4-CMC agoniste RyR1 comme stimulus, ni une sensibilité à l'isoflurane ou à la chaleur avec les tests comportementaux.

En conclusion, nous avons montré l'implication directe de *CACNA2D4* dans la survenue de l'hyperthermie d'effort. Le modèle murin hétérozygote pour la mutation p.(Ser306Arg) montre un phénotype HE avec une rhabdomyolyse importante. Ce phénotype semble être en lien avec un défaut de l'homéostasie calcique. Une altération du couplage excitation-contraction est observée en pH acide ou alcalin dans les myotubes entraînant une libération de calcium plus importante qui peut stimuler le métabolisme et mener donc à une thermogenèse supplémentaire anormale. Cette altération semble être en lien avec la levée de sensibilité aux protons du DHPR induite par la mutation S306R. Ainsi, le mécanisme de l'acidose métabolique qui est censée inhiber le canal au cours d'un effort physique ne marche plus et entraînerait une activation

Résultats et discussion

anormale du DHPR. Mais cette hypothèse très intéressante nécessiterait de plus amples investigations afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. L'expression neuronale de *CACNA2D4* pose aussi la question d'une implication du système nerveux central. Ainsi, l'HE pourrait être une maladie à double composante, musculaire et neuronale. Une étude comportementale sur l'habilité des souris à réguler leur température interne pourrait permettre d'investiguer cette hypothèse.

On montre aussi que si dans ce modèle l'HE et l'HM impliquent la même voie de signalisation avec le calcium comme pierre angulaire, elles n'empruntent peut-être pas le même chemin et donc seraient deux entités bien distinctes.

Partie 2 : Identification et caractérisation d'une isoforme musculaire *CACNA2D4*

Résultats et discussion

Ce projet s'appuie sur les résultats de séquençage exomique de 16 patients ayant présenté une crise d'HE avec un test de contracture *in vitro* sur biopsie musculaire positif. Ces données ont abouti à l'identification de variants rares du gène *CACNA2D4* chez 4 patients permettant de définir le gène *CACNA2D4* comme un excellent gène candidat pour l'HE.

Les travaux présentés en première partie de ce manuscrit montrent que le modèle murin *CACNA2D4*^{S306R/WT} présente une altération de l'homéostasie calcique au niveau du muscle squelettique. A cela s'ajoute la présence d'un test de contracture *in vitro* du muscle squelettique anormale chez les patients présentant les mutations sur *CACNA2D4*.

Ces données suggèrent une implication du muscle squelettique dans la survenue du phénotype observé.

Dans cette partie de ce travail de thèse, j'ai donc cherché à caractériser l'expression tissulaire de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique. La distribution tissulaire de cette sous-unité, régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants de type L, n'est pas complètement connue. Les données de la littérature montrent qu'elle est exprimée dans la rétine où elle est liée à la survenue de la dystrophie rétinienne et régule la synaptogenèse des photorécepteurs (Kerov et al., 2018a), mais sa distribution dans les autres tissus reste à définir.

Dans un premier temps, j'ai cherché à mettre en évidence l'expression musculaire de *CACNA2D4* en investiguant la présence du transcrit par RT(q)PCR dans différents muscles des membres inférieurs chez la souris, puis caractérisé le transcrit musculaire par RACE-PCR et l'expression protéique par Western blot et spectrométrie de masse.

En clonant le transcrit musculaire, j'ai aussi, caractérisé fonctionnellement ce transcrit à l'aide de systèmes d'expression hétérologues

I. Mise en évidence d'une isoforme musculaire *CACNA2D4*

La présence du transcrit *CACNA2D4* dans le muscle squelettique a été investiguée par RT (q)PCR et RACE-PCR sur des extraits d'ARN totaux de souris C57BL/6J WT. Les ARN totaux ont été extraits de différents types de muscles (quadriceps, tibialis antérieur, le soléus, l'EDL) et de l'œil pour ces différentes investigations.

Résultats et discussion

A. RT-(q)-PCR

Pour étudier le transcrit musculaire de *CACNA2D4*, il a été décidé de choisir différents types de muscles avec des répartitions différentes en types de fibres chez la souris.

J'ai également utilisé différentes paires d'amorces ciblant différentes parties du transcrit canonique décrit au niveau de l'œil pour détecter le transcrit de *CACNA2D4* au niveau musculaire. Des couples d'amorces couvrant les exons 8 à 13 et 16 à 17 ont été utilisés en RT PCR classique et des couples d'amorces couvrant les exons 1 à 2, et 10 à 11 ont été utilisés en RT PCR quantitative.

La RT PCR ciblant les exons 8 à 13, montre la présence d'un amplicon dans le quadriceps, l'EDL, le soleus et le tibialis antérieur à la taille attendue de 500 pb en se basant sur la forme canonique *CACNA2D4* (**Figure 32A**).

Cette bande découpée, purifiée et séquencée confirme la présence du transcrit *CACNA2D4* dans le muscle squelettique. Ce résultat confirme une expression musculaire du transcrit *CACNA2D4* déjà rapportée dans la littérature (Qin et al., 2002; Katharina A. Wycisk et al., 2006). Mais pour la première fois, on montre une étude tissulaire sur la distribution dans les muscles des membres inférieurs chez la souris.

L'étude par RT-qPCR avec les amorces ciblant les exons 10-11 permet également d'amplifier un transcrit (**Figure 32B**). En revanche, les amorces ciblant les exons 1 et 2, ont échoué à amplifier cette région dans le muscle (**Figure 32B**). Les amorces placées dans les exons 16 – 17 ont échoué à amplifier un transcrit dans le muscle mais donnent un amplicon dans l'œil (**Figure 32C**).

Résultats et discussion

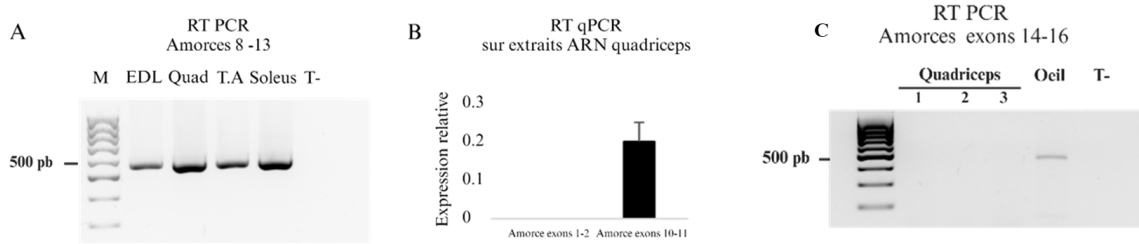


Figure 32 : Etude de l'expression d'un transcrite *CACNA2D4* dans le muscle squelettique de souris. **A.** RT PCR avec amorces ciblant les exons 8-13 invariants *CACNA2D4* sur différents types de muscles de la patte de souris et un témoin négatif (H_2O). **B.** Expression relative de *CACNA2D4* par RT qPCR en ciblant deux régions différentes. Les exons 1 et 2 connus pour être sujets à l'épissage alternatif et les exons 10 – 11 qui sont invariants. Quantification avec le logiciel BioRad CFX Maestro sur tripliqua avec GAPDH comme gène de ménage. **C.** RT PCR avec amorces ciblant les exons 16-17, l'exon 16 sujet à épissage sur le muscle quadriceps de souris et un témoin positif (Œil). Témoin négatif (H_2O).

Ces données indiquent la présence d'un transcrite *CACNA2D4* dans le muscle squelettique avec une partie 5' qui semble différer de la forme canonique.

Les différences sur le transcrite observées par RT-(q)PCR dans le muscle squelettique a donné lieu à une étude de caractérisation du transcrite musculaire par 5'/3'RACE-PCR.

B. 5'/3' RACE-PCR et clonage

Les résultats de RT-(q)-PCR ont fait évoquer la possibilité d'un transcrite musculaire avec une partie 5' différente de la forme canonique. J'ai décidé d'explorer la présence d'un transcrite alternatif de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique par 5'/3'RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) sur des extraits d'ARNm provenant de quadriceps et d'yeux de souris WT C57BL/6J.

Des amorces spécifiques de *CACNA2D4*, placées sur les exons 26 et 24 respectivement pour la 5' et 3' RACE associées à des amorces universelles reconnaissant les parties 3' et 5' UTR, ont permis d'isoler et d'amplifier les séquences d'initiation et de terminaison du transcrite.

La 5' RACE-PCR a permis de détecter un amplicon unique de 2299pb dans le muscle plus petit que celui amplifié dans l'œil de 2673pb en adéquation avec la taille attendue (**Figure 33A**). La 3' RACE a donné des amplicons de la même taille dans l'œil et le muscle. Ces résultats

Résultats et discussion

confirment l'existence d'un transcrit musculaire avec une partie 5' différente de la forme canonique exprimée dans l'œil.

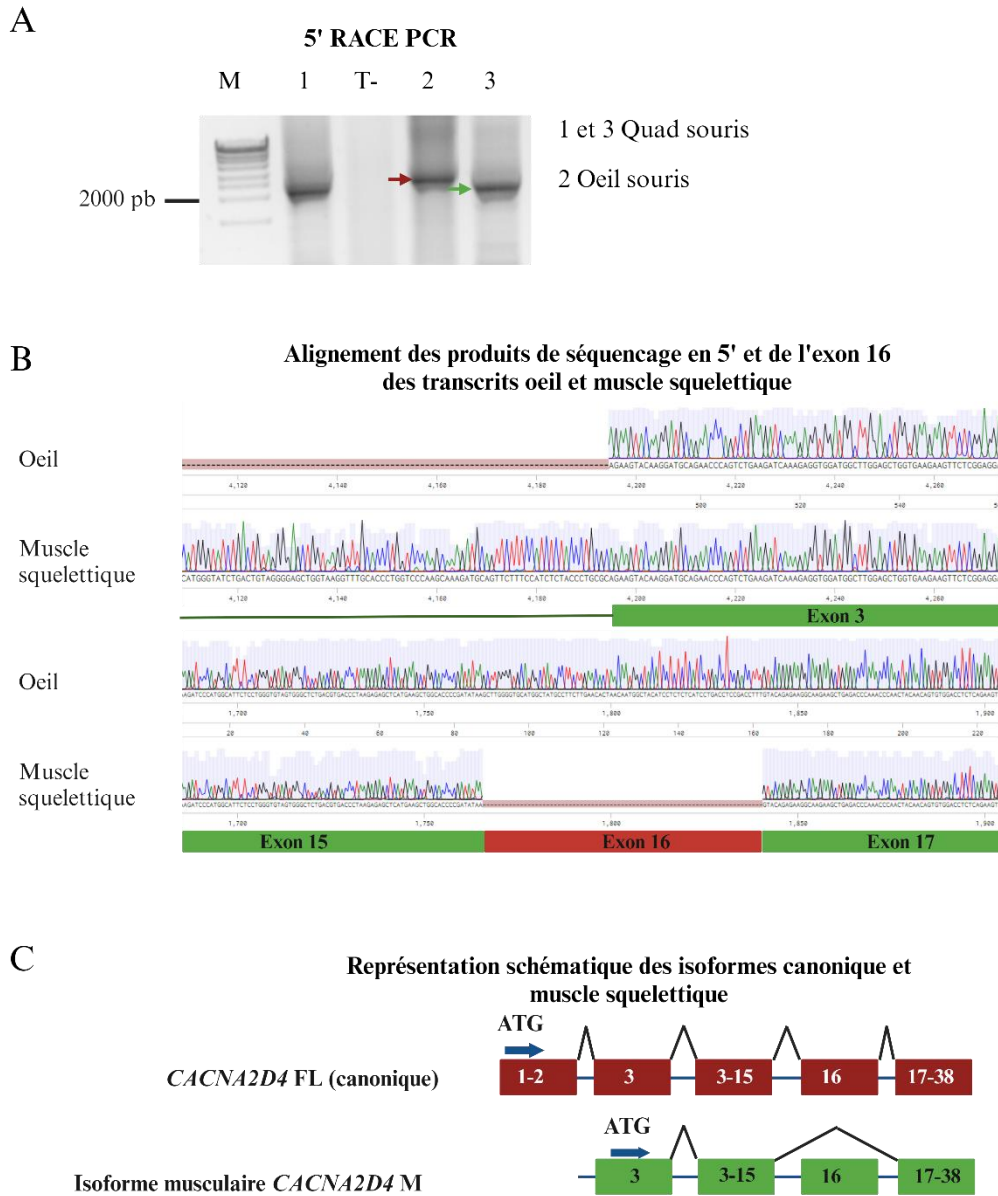


Figure 33 : Caractérisation du transcrit *CACNA2D4* dans le muscle squelettique de souris **A.** 5' RACE PCR sur des extraits quadriceps pour la caractérisation du transcrit musculaire de *CACNA2D4* avec une amorce gène spécifique sur l'exon 26. Les pistes 1 et 3 sont des échantillons de muscle 2299pb comparés à l'œil où la forme canonique est exprimée 2673pb. **B.** Chromatogramme du séquençage des clones issus du muscle et de l'œil montrant les différences en 5' et l'exclusion de l'exon 16 sur le transcrit musculaire. **C.** Schéma comparatif des transcrits musculaire *CACNA2D4* M et canonique *CACNA2D4* FL.

Résultats et discussion

Les produits de la 3' et 5' RACE ont été clonés dans un plasmide pRACE. La digestion des produits de minipreps des clones issus de la 5' RACE du muscle a donné majoritairement un seul profil de digestion (9/10). Ce profil est différent de la prédiction théorique attendue pour la forme canonique.

Le séquençage des 9 clones, (présentant un profil de digestion similaire), a permis l'identification d'une nouvelle isoforme d'épissage alternatif de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique jamais rapportée (**Figure 33B**). La comparaison de cette nouvelle isoforme nommée *CACNA2D4* M (M pour musculaire) avec la forme canonique (full length notée FL) permet de souligner des différences en 5' avec l'absence des exons 1 et 2, la rétention d'une partie de l'intron 2, mais aussi, l'exclusion de l'exon 16, (en phase, codant pour 25 acides aminés) (**Figure 33B.C**). L'exclusion de l'exon 16 en phase vient raccourcir le domaine dCache_1 en C-terminal. L'extrémité carboxyle-terminale est la même que sur la forme canonique avec un codon stop TGA dans l'exon 38.

La 3' RACE-PCR par contre ne montre aucune différence par rapport à la forme canonique.

- *Analyse bio-informatique de la séquence du transcrit musculaire*

L'analyse de la séquence nucléotidique par l'outil de bio-informatique ATGpr du *CACNA2D4* M, permet d'identifier deux ATG, en phase aux positions (194 et 203) en partant de la première base du transcrit musculaire, mais seul le premier ATG possède une séquence KOZAK presque parfaite (GXXATGG) (**Tableau 10**). Cet ATG en position 194, sert donc de site d'initiation de la traduction de cette isoforme de 2949 pb codant une protéine de 983 acides aminés pour 111 kDa au lieu des 127 kDa de la forme FL.

Résultats et discussion

Tableau 10 : Etude des sites d'initiation de la traduction en phase sur l'isoforme musculaire.

No. of ATG from 5' end	Reliability	Frame	Identity to Kozak rule A/GXXATGG	Start (bp)	Finish (bp)	ORF Length (aa)	Stop codon found?	Sequence
6	0.34	2	GXXATGG	194	455	87	No	METMLRRKVEAVESLVEAAEEADLNHEFNASLVFNYYNSVLINEKDDKGM YVELGAEFLLESDAHFSNLRVNVSMSSVQLPTNVYNK
3	0.13	1	AXXATGc	85	228	48	Yes	MQFFPSLPCAEVQGCRTQSEDRGGWLGAGEEVLGGHGDHASEESRGC
7	0.11	2	AXXATGc	203	455	84	No	MLRRKVEAVESLVEAAEEADLNHEFNASLVFNYYNSVLINEKDDKGNVVE LGAEFLLESDAHFSNLRVNVSMSSVQLPTNVYNK
4	0.04	3	AXXATGc	126	140	5	Yes	MQNPV
5	0.04	3	tXXATGG	159	173	5	Yes	MAWSW

L'analyse bio-informatique de cette isoforme avec Promoter2.0 prédisant les sites de départ de la transcription des promoteurs PolII des vertébrés dans les séquences d'ADN montre la présence de deux régions promotrices et d'initiatrices de la transcription possible dans l'intron 2 (les exon2 + 600 et exon2 + 1200).

L'alignement des isoformes musculaire et canonique montre 88% de similarité entre les deux. L'absence de l'exon 1 pose la question de la perte du peptide signal codé par l'exon 1. Une analyse bio-informatique à l'aide du logiciel SignalP a été faite à la recherche d'une séquence correspondant à un peptide signal sur l'extrémité N-terminale de l'isoforme musculaire. Aucune séquence signal n'a été identifiée par l'analyse bio-informatique. La probabilité de l'existence d'un peptide signal est quasi-nulle (**Figure 34**).

Résultats et discussion

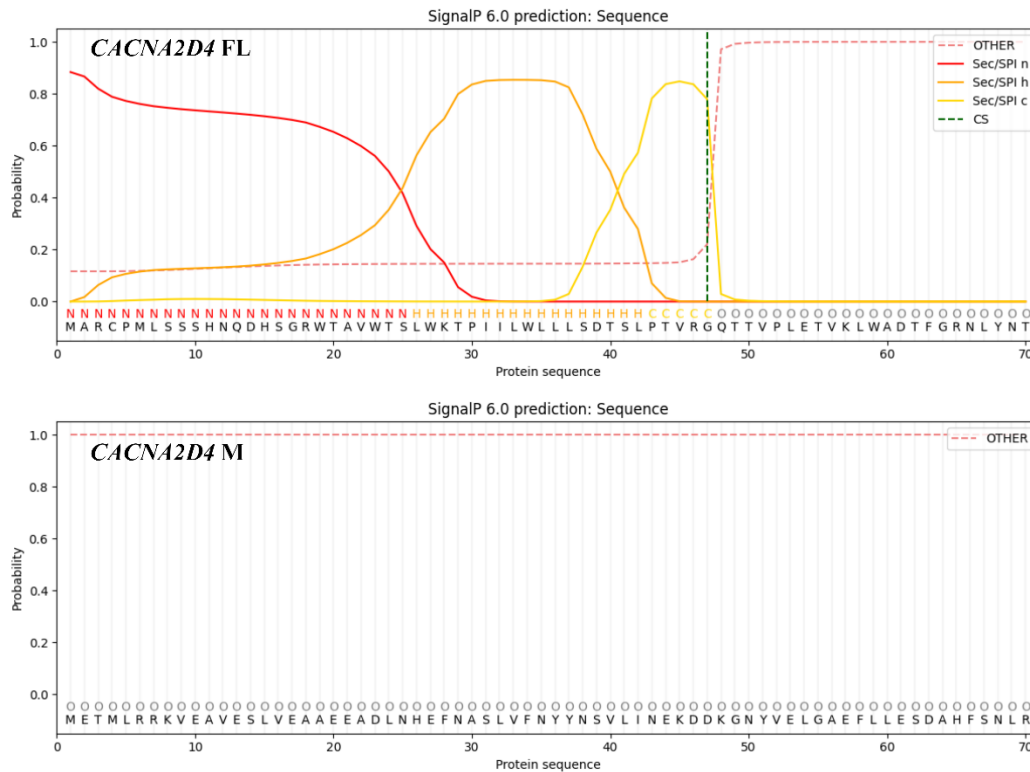


Figure 34 : Prédiction avec SignalP de la présence d'un peptide signal sur *CACNA2D4 M*. En haut la séquence N-terminal de la forme canonique avec une probabilité de 0,88 (Max à 1) d'une séquence peptide signal en rouge et en bas la prédiction pour la forme musculaire ne prédisant pas de peptide signal.

Les séquences où se localisent les différents variants trouvés chez les patients sont aussi conservées dans l'isoforme musculaire *CACNA2D4 M*.

- Clonage et étude d'expression

Le transcrit *CACNA2D4 M* a été cloné, à partir des produits de la 5' et 3' RACE PCR, dans pcDNA3.1 avec un tag HA interne localisé dans l'exon 14 à la position 1104. Le tag interne évite l'impact sur les extrémités N (peptide signal) et C (ajout de l'ancre GPI) terminales de la protéine qui sont censées jouer un rôle fonctionnel dans la localisation membranaire. La position du tag est basée sur l'alignement avec le plasmide codant pour le transcrit de rat du *CACNA2D1 HA pMT2* (58729 addgene).

La construction a été contrôlée par séquençage et son expression par western blot. L'expression du transcrit a donc été étudiée par réexpression dans un système hétérologue, HEK293T. La

Résultats et discussion

surexpression montre la production d'une protéine à la taille attendue (bande juste au-dessus de 100 kDa) pour ce transcrit musculaire (**Figure 35**).

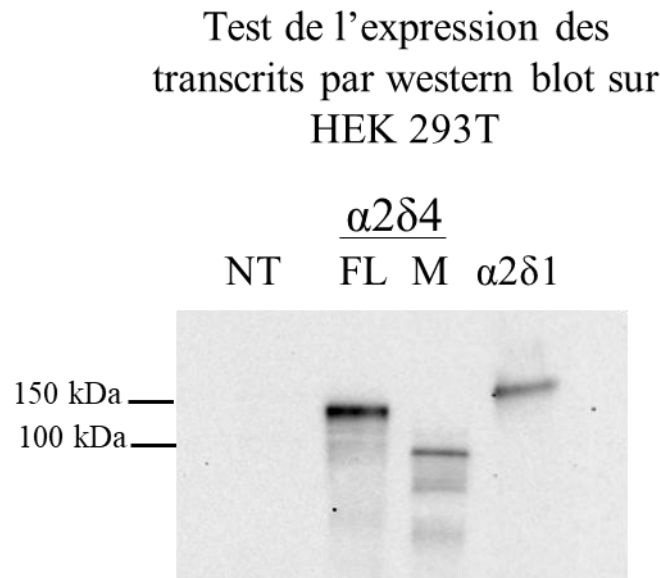


Figure 35 : Western blot de l'expression du transcrit musculaire M, canonique FL et de $\alpha 2\delta$ -1 grâce au tag HA.

- *Expression de l'isoforme musculaire dans l'œil*

J'ai étudié la présence du nouveau transcrit identifié dans l'œil. Pour cela, j'ai utilisé des amorces spécifiques de ce transcrit ciblant en 5' la partie de l'intron 2 retenue. On peut observer une amplification dans le muscle aussi bien que dans l'œil (**Figure 36**).

Ces résultats nous indiquent que l'isoforme identifiée dans le muscle chez la souris est également présente dans l'œil.

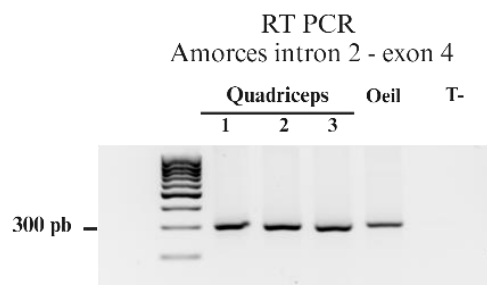


Figure 36 : RT PCR couvrant la partie intronique 2 et l'exon 4 spécifique de l'isoforme musculaire

Résultats et discussion

II. Caractérisation fonctionnelle de l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M

Ce transcrit musculaire a fait l'objet d'une caractérisation sur différents paramètres. La localisation subcellulaire potentiellement altérée par la perte du peptide signal en N-terminal a été étudiée, ainsi que son interaction avec la sous-unité Cav1.1 des canaux calciques de type L et sa régulation de la sensibilité au voltage et au pH.

A. Localisation subcellulaire

- *Immunofluorescence*

Les protéines $\alpha 2\delta$ à ancre GPI sont synthétisées dans le réticulum. Cette voie de synthèse est dictée par la présence du peptide signal. La perte de ce dernier sur l'isoforme musculaire *CACNA2D4* M pose la question de la voie de synthèse de la protéine et donc de sa localisation intracellulaire.

Afin d'étudier la localisation de l'isoforme musculaire et la comparer à l'isoforme canonique, les deux isoformes ont été réexprimées dans des cellules COS7 et leurs localisations étudiées par immunofluorescence. Le réticulum est marqué par Climp63 et $\alpha 2\delta$ -4 grâce au tag HA. Ce co-marquage a permis d'étudier la localisation réticulaire de l'isoforme musculaire. Nos résultats montrent une localisation dans le réticulum de l'isoforme musculaire HA- $\alpha 2\delta$ -4 M (**Figure 37**), malgré l'absence d'un peptide signal typique.

Ainsi, HA- $\alpha 2\delta$ -4 M se comporte comme la forme canonique HA- $\alpha 2\delta$ -4 FL en empruntant la même voie de synthèse malgré la perte du peptide signal.

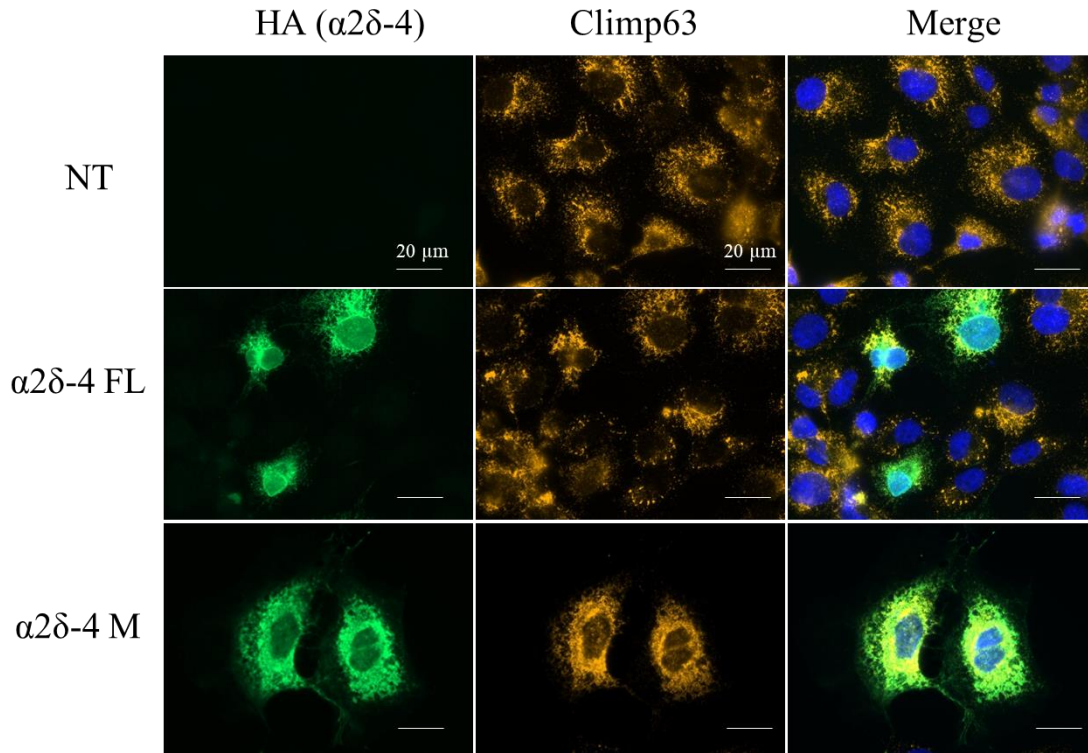


Figure 37 : Etude de la localisation intracellulaire de l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta -4 M$ par immunofluorescence. Les cellules COS7 ont été fixées au PFA, perméabilisées puis co-marquées avec un anticorps anti-Climp63 (réticulum endoplasmique) et un anti-HA ($\alpha 2\delta -4 FL/\alpha 2\delta -4 M$). Les noyaux sont marqués par le hoechst. Les images ont été prises au microscope à fluorescence avec objectif X40. (Clara Charpentier)

- ***Biotinylation de surface***

Les sous-unités $\alpha 2\delta$ sont des protéines à ancre GPI associées aux radeaux lipidiques. L'adressage membranaire des protéines à ancre GPI nécessite la présence d'un peptide signal orientant la synthèse dans le réticulum. Du réticulum, la protéine débarrassée de son peptide signal est adressée au Golgi où des vésicules de transports l'amènent à la membrane.

Afin de vérifier la localisation membranaire de cette nouvelle isoforme privée de peptide signal, j'ai fait une biotinylation de surface des protéines membranaires dans des cellules HEK293T exprimant la forme musculaire et canonique.

L'isolation des protéines membranaires par biotinylation de surface montre dans la fraction biotinylée la présence grâce à l'anticorps anti-HA de $\alpha 2\delta -4 M$ et $\alpha 2\delta -4 FL$ (**Figure 38**). La fraction biotinylée est contrôlée avec l'absence de GAPDH, marqueur cytoplasmique. Un autre

Résultats et discussion

contrôle est la condition non-biotinylée (NB) qui permet de tester les liaisons non spécifiques aux billes streptavidine. Ces résultats montrent l'expression à la membrane de l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M malgré l'absence d'un peptide signal typique.

Ainsi, en résumé, la perte du peptide signal sur cette nouvelle isoforme n'entrave pas sa localisation membranaire ni sa traduction dans le réticulum. Elle se comporte comme la forme canonique posant la question du mécanisme directeur en absence du peptide signal. Des études plus poussées seront nécessaires afin d'élucider ce mystère. Ainsi, le clonage de la partie N-terminale de $\alpha 2\delta$ -4 M sur une protéine rapportrice permettrait de savoir si elle possède un peptide signal pas encore découvert.

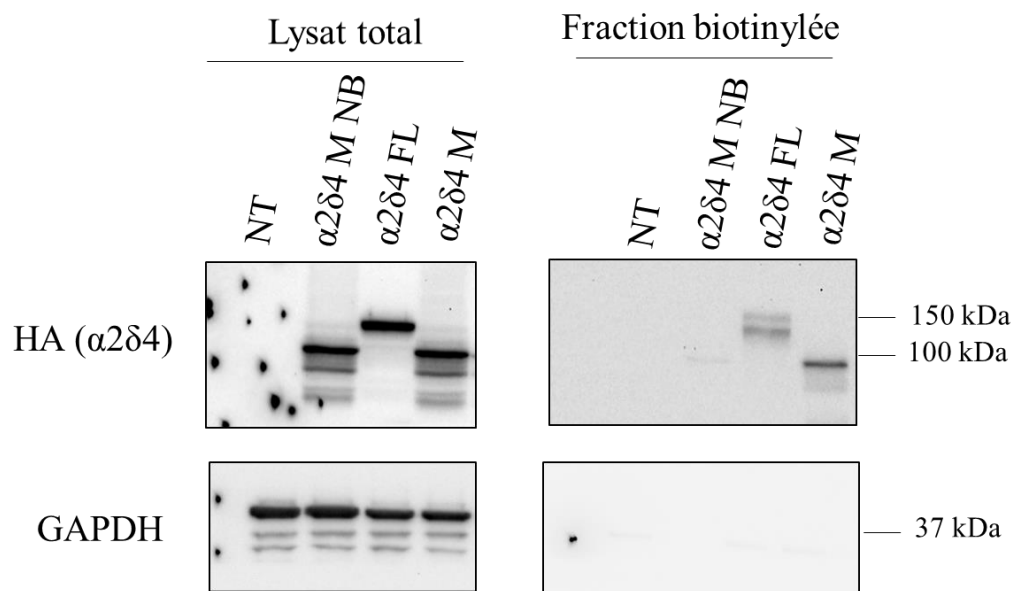


Figure 38 : Etude de la localisation membranaire par biotinylation de surface de l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M. A droite le lysat cellulaire total, et à gauche la fraction membranaire soit les protéines biotinylées. Les niveaux d'expression de la protéine d'intérêt $\alpha 2\delta$ -4 sont révélés grâce à son tag HA et la protéine de charge GAPDH sert de contrôle dans la fraction membranaire d'absence de contamination intracellulaire. $\alpha 2\delta$ -4 M NB est la condition non biotinylée servant de contrôle de la spécificité des billes streptavidine.

Résultats et discussion

B. Etude de l'interaction Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 M (*CACNA2D4* M)

Les différences observées entre la forme canonique et la forme musculaire de *CACNA2D4* posent la même question de sa fonctionnalité comme sous unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants de type L. J'ai donc voulu savoir si la forme musculaire présentait également une capacité d'interaction et de régulation du canal, comme la forme canonique. J'ai étudié la présence de l'isoforme musculaire dans le complexe canalaire par co-immunoprécipitation sur des HEK293T et par immunofluorescence en co-marquant Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 M dans des myotubes transduits.

- *Etude de l'interaction entre Cav1.1 et le nouvel isoforme musculaire par co-immunoprécipitation sur HEK293T*

J'ai co-exprimé dans des cellules HEK293T les sous-unités $\beta 1a$, Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 M WT. Grâce à des billes magnétiques anti-HA, j'ai immunoprécipité $\alpha 2\delta$ -4 M WT.

Nos résultats montrent dans la fraction immunoprécipitée, anti-HA $\alpha 2\delta$ -4 M, la présence de Cav1.1 (**Figure 39**). La condition $\beta 1a$ /Cav1.1 sert de contrôle négatif d'absence de liaison non spécifiques des billes. Ces résultats mettent en évidence la capacité de l'isoforme musculaire à interagir avec la sous-unité Cav1.1.

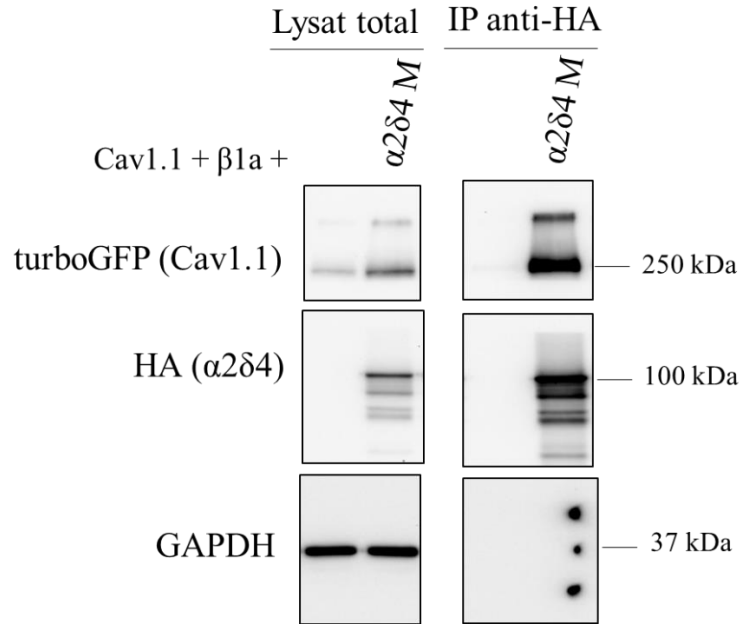


Figure 39 : Etude de l'interaction entre Cav1.1 et l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M par co-immunoprécipitation de lysats protéiques de HEK293T co-exprimant $\beta 1a$ /Cav1.1/ $\alpha 2\delta$ -4 M. $\alpha 2\delta$ -4 M est immunoprécipitée grâce à des billes magnétiques anti-HA. La condition $\beta 1a$ /Cav1.1 sert de contrôle de spécificité des billes anti-HA.

- **Immunofluorescence sur myotubes**

La co-localisation avec Cav1.1 a été étudiée sur des myotubes WT de souris différenciés sur une semaine. Les myoblastes ont été transduits avec des lentivirus permettant l'expression de $\alpha 2\delta$ -4 FL et $\alpha 2\delta$ -4 M puis mis en différenciation.

Le co-marquage de Cav1.1 endogène et de $\alpha 2\delta$ -4 avec le tag HA montre des différences sur la localisation de $\alpha 2\delta$ -4 M et FL. $\alpha 2\delta$ -4 FL montre une localisation majoritairement périphérique. L'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M montre une localisation plus homogène (**Figure 40**). La quantification du coefficient de Pearson (R), sur n = 3 champs d'observation, donne pour $\alpha 2\delta$ -4 FL un R = -0.007 et R= 0.264 pour $\alpha 2\delta$ -4 M.

Ces résultats semblent montrer sur des myotubes pas entièrement matures des comportements différents des isoformes canonique et musculaire. La forme musculaire en surexpression semble plus interagir avec le canal Cav1.1 que la forme canonique au cours de la différenciation.

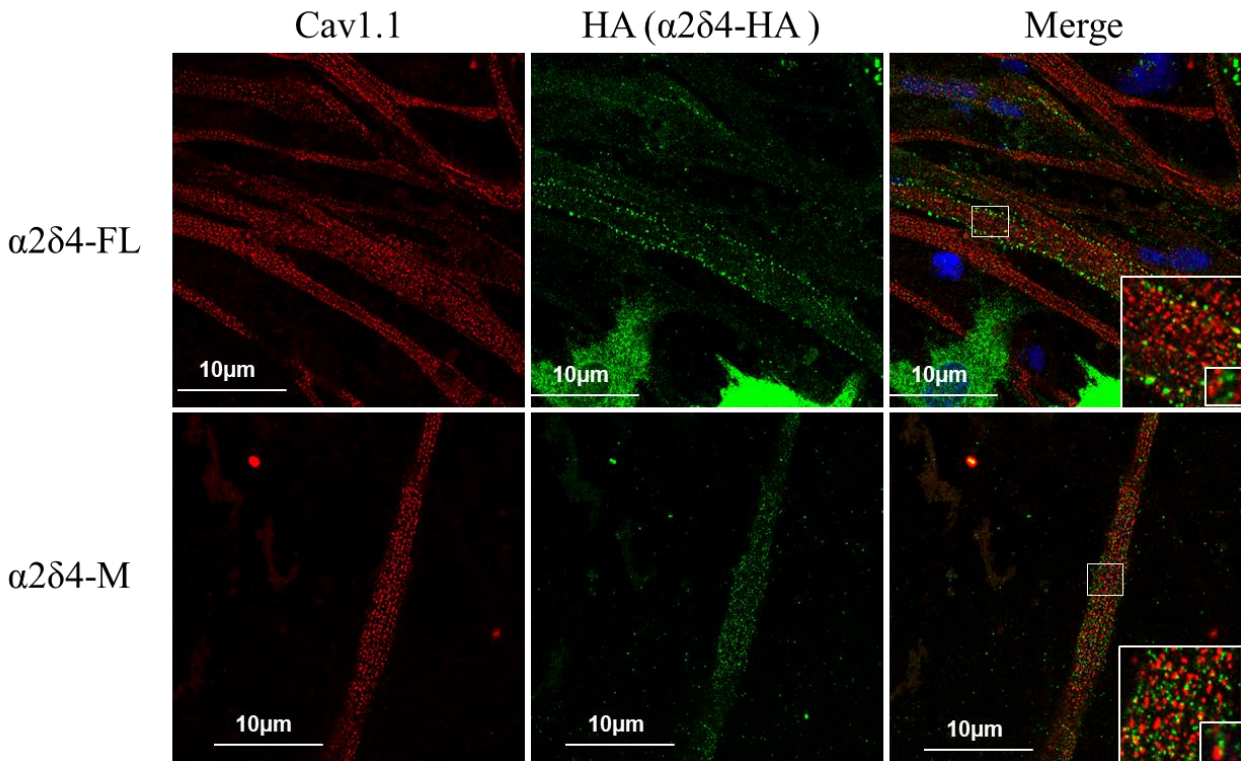


Figure 40 : Etude de la co-localisation Cav1.1 et $\alpha 2\delta$ -4 (FL et M) sur des myotubes. Des myoblastes transduits avec des lentivirus codant pour $\alpha 2\delta$ -4 FL et M sont mis en différenciation une semaine. Les myotubes fixés sont perméabilisés puis Cav1.1 endogène a été marquée et $\alpha 2\delta$ -4 grâce au tag HA. Les images sont prises au microscope confocal. La colocalisation des canaux rouge (Cav1.1) et vert ($\alpha 2\delta$ -4) a été fait avec Image J.

C. Régulation de Cav1.1 par l'isoforme $\alpha 2\delta$ -4 M

Les expériences ci-dessous de patch-clamp sur des HEK293T coexprimant $\beta 1a$, Cav1.1, Stac3 et $\alpha 2\delta$ -4 M ou $\alpha 2\delta$ -4 FL ont été réalisées en collaboration avec Juan De la Rosa Vázquez de l'Université du Texas dans l'équipe de Amy Lee.

- *Etude des densités de canaux à la surface par patch-clamp*

Une expérience de patch clamp a été faite sur des HEK2293T coexprimant Cav1.1, Stac3, $\beta 1a$ et différents isoformes $\alpha 2\delta$ ($\alpha 2\delta$ -1, $\alpha 2\delta$ -4 FL, $\alpha 2\delta$ -4 M et $\alpha 2\delta$ -4 M avec la mutation du domaine MIDAS S306R). L'équipe a quantifié la relation Q_{on}/Q_{max} , rapport entre la charge électrique à l'état actif (Q_{on}) et la charge électrique maximale (Q_{max}) qu'une cellule peut supporter (**Figure 41B**). Ce ratio permet de déterminer les mouvements de charges en fonction du potentiel appliqué rapportés sur la capacité membranaire et ainsi d'estimer la densité de canaux

Résultats et discussion

à la surface. L'étude comparative montre que $\alpha 2\delta$ -4 M permet d'avoir une densité de canaux Cav1.1 à la surface identique aux isoformes $\alpha 2\delta$ -4 FL et $\alpha 2\delta$ -1 (**Figure 41B.C**).

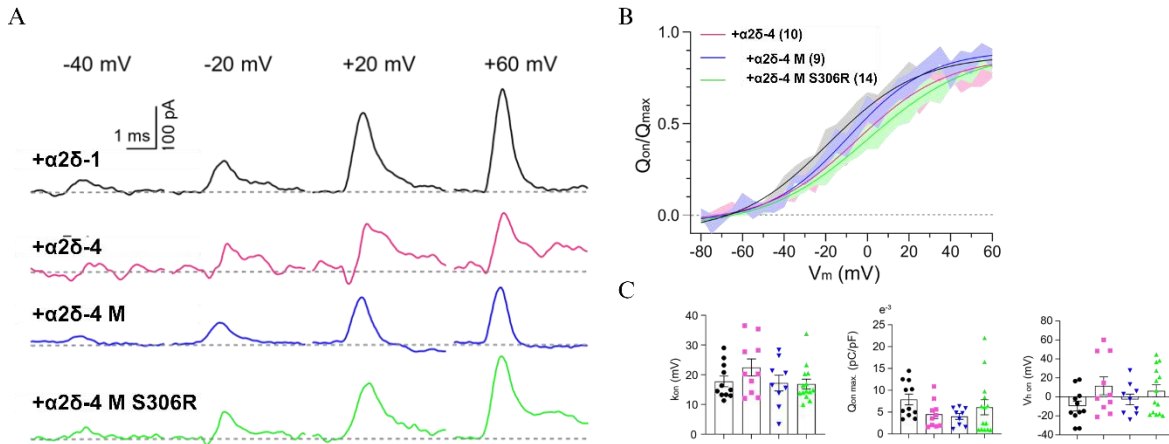


Figure 41 : Etude de la densité de courant par la relation charge active $Q(\text{on})$ et charge maximale $Q(\text{max})$ en fonction du voltage appliqué sur des HEK293T coexprimant Cav1.1/Stac3/ $\beta 1a$ + les différents $\alpha 2\delta$. **A.** Chaque trace représente la réponse à des potentiels de membrane appliqués, allant de -40 mV à +60 mV. Il y a cinq groupes de traces correspondant à différentes isoformes ou mutants de la protéine $\alpha 2\delta$ ($\alpha 2\delta$ -1, $\alpha 2\delta$ -4, $\alpha 2\delta$ -4 M, $\alpha 2\delta$ -4 M S306R). **B.** Un graphique de relation $Q(\text{on})/Q(\text{max})$ montrant les mouvements de charge en fonction des potentiels appliqués. Plusieurs courbes sont superposées pour les différentes isoformes/mutants de $\alpha 2\delta$. L'ombrage autour des courbes représente l'erreur standard. **C.** Histogrammes de la quantification de la pente de la relation courant-tension k_{on} (mV), de la densité de courant Q_{on} (en picoampères par picofarad, pA/pF), donnant une mesure de l'activité du canal par unité de surface de membrane et du voltage d'activation V_{on} (mV). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

- *Sensibilité au voltage*

L'équipe a également mesuré la relation entre le potentiel de membrane V_m (mV) et le courant de barium normalisé (IBa norm.). Les résultats présentent le courant de barium, en réponse à une stimulation électrique, sur une échelle de temps de 20 ms et de courant de 100 pA. Cette étude montre que l'isoforme $\alpha 2\delta$ -4 M déplace le potentiel d'activation V_{hact} (mV) de Cav1.1 vers des potentiels plus polarisés en comparaison avec $\alpha 2\delta$ -4 (canonique) et $\alpha 2\delta$ -1 (**Figure 42B**) mais ne modifie pas la conductance G_{max} (**Figure 42A**). Autrement dit, le canal s'active avec des potentiels plus élevés en présence de l'isoforme musculaire.

L'autre paramètre étudié est l'inactivation voltage-dépendant. Ce dernier est un phénomène physiologique qui se produit au niveau des canaux ioniques voltage-dépendant. Lorsque le

Résultats et discussion

potentiel de membrane d'une cellule excitable atteint un certain seuil, les canaux ioniques se ferment, empêchant ainsi le passage des ions à travers la membrane. Cela entraîne une diminution de l'excitabilité notamment des cellules nerveuses, ce qui peut avoir un impact sur la transmission de l'influx nerveux. L'étude de ce paramètre en présence de $\alpha 2\delta$ -4 M en comparaison avec $\alpha 2\delta$ -4 (canonique) et $\alpha 2\delta$ -1 montre que l'isoforme musculaire rend le canal Cav1.1 plus résistant à l'inactivation dépendante au voltage (**Figure 42D**) et pas de différence de densité de courant I_{max} (**Figure 42C**).

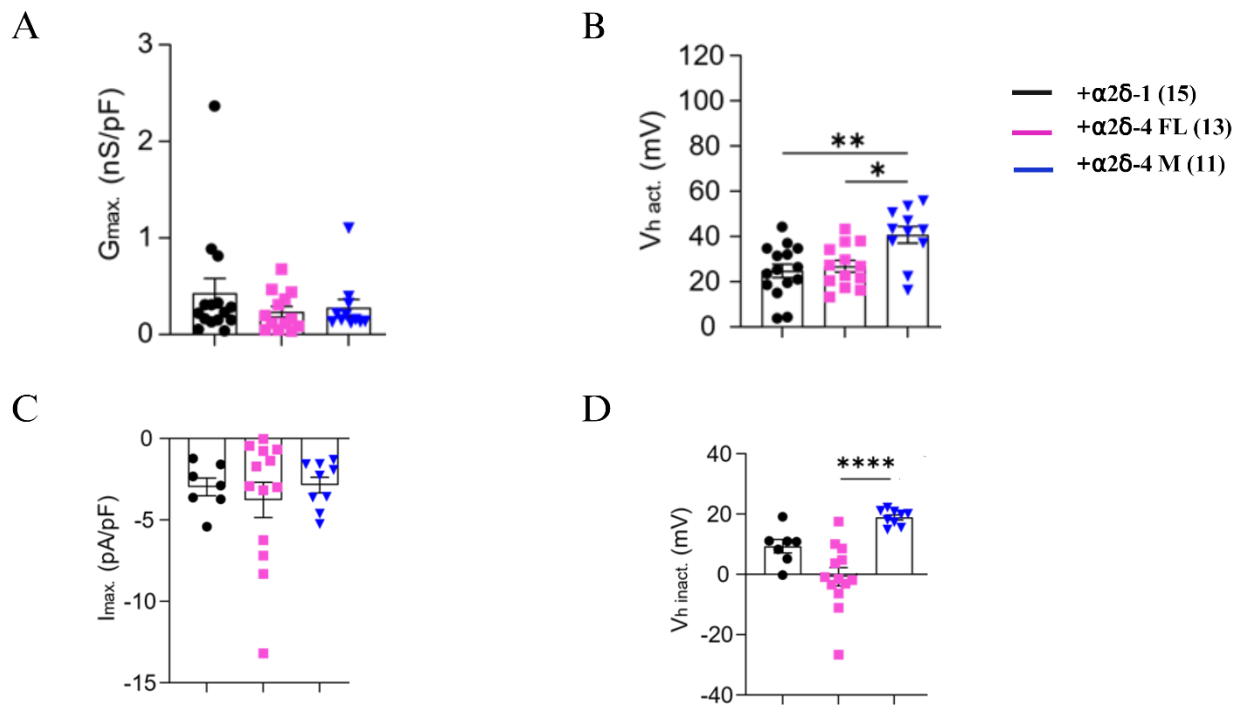


Figure 42 : Sensibilité au voltage du canal DHPR reconstitué chez des HEK293T co-exprimant Cav1.1/Stac3/β1a avec les différentes $\alpha 2\delta$ ($\alpha 2\delta$ -1, $\alpha 2\delta$ -4 FL et $\alpha 2\delta$ -4 M). A.B. Etude des potentiels d'activation : Histogramme des différentes caractéristiques du canal Cav1.1 : G_{max} (nS/pF) : Conductance maximale normalisée par la capacité de la membrane, indiquant la conductivité des canaux par unité de surface de membrane, $V_{h\ act}$ (mV) : Potentiel de demi-activation, le potentiel de membrane auquel la moitié des canaux sont activés. C.D. Etude de l'inhibition dépendante du voltage : Histogramme des mesures de la densité de courant I_{max} (pA/pF) et du potentiel de mi-inactivation $V_{h\ inact}$. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

En résumé, l'isoforme musculaire n'altère pas l'adressage à la surface du canal Cav1.1 et forme avec un canal fonctionnel mais offre une régulation différente du canal. Ainsi, elle confère au

Résultats et discussion

canal des potentiels d'activation plus polarisés et une résistance à l'inhibition voltage-dépendant.

III. Etude de l'expression de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 dans le muscle squelettique

A. Western blot

Après avoir identifié et caractérisé l'existence d'un transcrit musculaire de *CACNA2D4*, j'ai recherché la présence de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 dans le muscle squelettique par western blot et spectrométrie de masse.

L'étude par western blot a été faite avec l'anticorps polyclonal anti- $\alpha 2\delta$ -4 développé par Amy Lee, de l'Université du Texas, par sensibilisation avec le peptide unique (KVSDRKFLTPEDASVC) situé dans les exons 24-25. Cet anticorps a été caractérisé dans les publications (Kerov et al., 2018a; Qin et al., 2002) sur des extraits protéiques de rétine de souris WT et knock-out *CACNA2D4* avec un stop prématuré dans l'exon 2. Il reconnaît une bande vers 150 kDa identifiée comme $\alpha 2\delta$ -4 FL (canonique) et trois bandes secondaires de plus petits poids moléculaires identifiées comme non spécifiques (Kerov et al., 2018a; Qin et al., 2002).

- Tests de détection de l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4, d'absence de réactivité croisée et développement de contrôles tissulaires positif et négatif.

Dans un premier temps, j'ai réalisé des contrôles pour vérifier les performances (sensibilité, spécificité) de l'anticorps, polyclonal anti- $\alpha 2\delta$ -4 (don de Amy Lee, Texas).

J'ai vérifié la capacité de l'anticorps à détecter les isoformes canonique $\alpha 2\delta$ -4 FL (expression dans l'œil), et musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M (expression muscle et œil), et l'absence de réactivité croisée avec l'isoforme musculaire majoritaire $\alpha 2\delta$: $\alpha 2\delta$ -1.

Pour cela, des extraits protéiques de HEK293T transfectées avec le cDNA de $\alpha 2\delta$ -4 FL, $\alpha 2\delta$ -4 M et $\alpha 2\delta$ -1, tous taggués avec un HA, ont été testés par western blot et révélés par l'anti- $\alpha 2\delta$ -4 et anti HA (**Figure 43**)

Résultats et discussion

Ce résultat montre la spécificité de l'anticorps pour $\alpha 2\delta$ -4 et sa capacité à reconnaître la forme canonique aussi bien que la forme musculaire et l'absence de réactivité croisée avec $\alpha 2\delta$ -1.

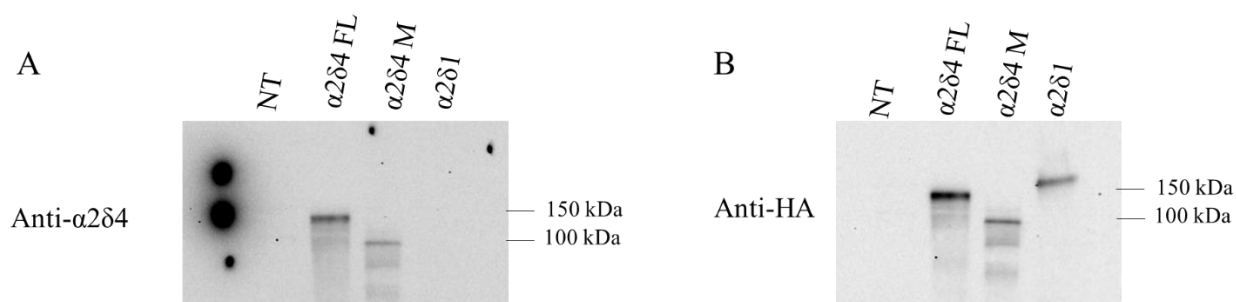


Figure 43 : Expression des constructions codant pour *CACNA2D4* M et FL dans des HEK293T et test de l'habilité de l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4 à reconnaître l'isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M. A. Western blot sur extraits HEK293T transfectées avec pcDNA3.1 codant $\alpha 2\delta$ -4 M, $\alpha 2\delta$ -1 et $\alpha 2\delta$ -4 FL (tous taggué HA). Révélation faite avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4. **B.** La même membrane qu'en A en révélée avec un anticorps anti-HA. La même membrane incubée avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4 montre une bande de 150 kDa dans le puits $\alpha 2\delta$ -4 FL et une bande d'environ 100 kDa pour $\alpha 2\delta$ -4 M. On n'a pas de signal sur les puits $\alpha 2\delta$ -1 et le contrôle négatif sans transfection (Figure 44A). La même membrane incubée avec l'anticorps dirigé contre le tag HA, laisse apparaître la bande d'environ 150 kDa dans la condition avec $\alpha 2\delta$ -1 (Figure 44B).

Dans un deuxième temps, j'ai réalisé des tests sur des homogénats d'œil de souris WT comme contrôle positif tissulaire *alpha2delta4* et sur œil de souris $\alpha 2\delta$ -4^{KO/KO} comme contrôle tissulaire négatif.

Dans ce contexte, un modèle murin knock-out *CACNA2D4* a été développé invalidant l'isoforme canonique et l'isoforme musculaire. Ce modèle a été généré par CRISPR Cas9 par l'insertion d'une délétion d'un nucléotide responsable d'un décalage du cadre de lecture et d'un codon stop prématuré au niveau de l'exon 8, commun aux transcrits canonique et musculaire. Ce modèle murin vient pallier le besoin de tissus contrôles négatifs afin de faire l'investigation dans le muscle.

Les tissus, quadriceps et œil, de souris WT et KO *CACNA2D4* homozygotes ont été étudiés en western blot.

Résultats et discussion

Cinquante μg d'homogénat d'yeux ont été déposés sur gel gradient 5-15% acrylamide. La révélation avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4 montre la présence de plusieurs bandes dans le puits œil WT, comme décrit dans les publications (Kerov et al., 2018a; Qin et al., 2002). On note la présence de la bande vers 150 kDa (flèche rouge) pour la forme canonique qui est absente dans le puits KO (**Figure 44A**). On retrouve aussi la deuxième bande vers 125 kDa absente aussi chez les KO *CACNA2D4* (**Figure 44A**). Cette dernière n'a jamais été rapportée. Par contre les autres bandes (astérisques) persistent dans les deux puits et donc semblent non spécifiques.

Ces résultats confirment d'une part le KO *CACNA2D4* avec l'absence d'une expression protéique dans l'œil provenant de la souris KO *CACNA2D4* homozygote. Par contre, on rapporte ici, pour la première fois, dans l'œil la présence d'une deuxième forme plus courte de la protéine (flèche noire).

La quantification des deux formes, longue et courte, sur 3 expériences ne montre pas de différence de niveaux d'expression (Mann-Whitney U test $p=0.2$) (**Figure 44A**).

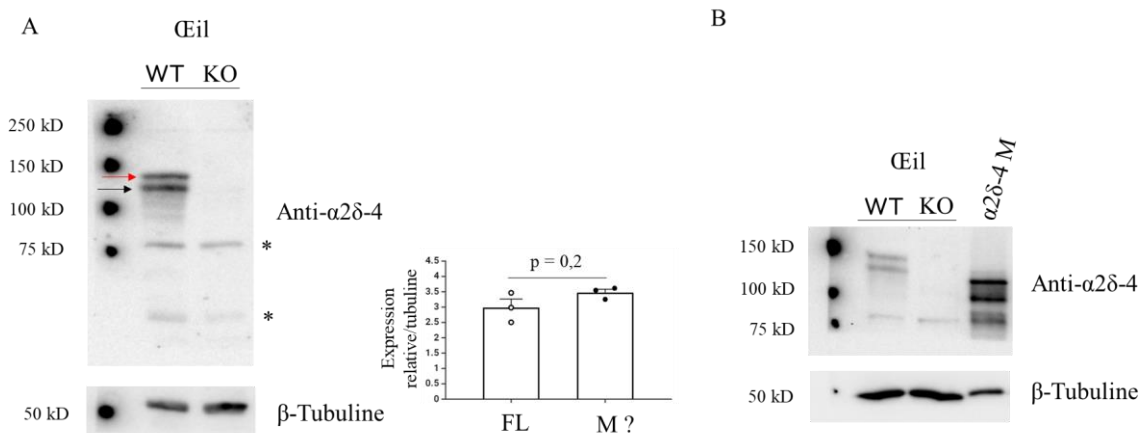


Figure 44 : Etude de l'expression endogène de *CACNA2D4* dans l'œil de souris WT et KO pour ce gène par western blot. A. Western blot sur homogénats d'yeux entiers de souris WT et KO *CACNA2D4*. Révélation avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4 montrant deux bandes spécifiques indiquées avec les flèches et des bandes non spécifiques (astérisques). Le signal des deux bandes a été quantifié et rapporté à la tubuline (témoin de charge). **B.** Western blot sur homogénats d'yeux entiers de souris WT, KO *CACNA2D4* et d'extraits de surexpression de $\alpha 2\delta$ -4 M dans des HEK293T. Révélation avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4. N=3 Mann-Whitney U test.

Dans la publication (Kerov et al., 2018a) caractérisant l'anticorps, cette forme plus courte persiste chez leur KO *CACNA2D4*. Leur modèle murin KO a été généré par un indel dans

Résultats et discussion

l'exon 2 entraînant un stop prématuré dans l'exon 2. Cette forme courte semble donc ne pas posséder l'exon 2 comme notre isoforme musculaire $\alpha 2\delta$ -4 M.

La taille de cette forme courte semble correspondre à celle de $\alpha 2\delta$ -4 M (**Figure 44B**), dont j'ai mis en évidence la présence du transcrit dans l'œil (**Figure 36**). Cette observation suggère l'expression dans l'œil d'une isoforme d'épissage avec absence de l'exon 2 comme dans la forme musculaire *CACNA2D4* M.

- *Investigation de l'expression dans le muscle squelettique de souris*

L'étude de la protéine dans le muscle squelettique a été faite à plusieurs niveaux.

Sur lysat total brut

Dans un premier temps, 50 μ g d'homogénat brut, obtenus par broyage par minilyse, de quadriceps de souris wild-type et de KO *CACNA2D4* ont été déposés sur un gel 5-15% acrylamide et révélés avec l'anti $\alpha 2\delta$ -4.

La révélation de la membrane montre un nombre important de bandes dans tous les puits, KO comme wild-type. A la taille attendue pour l'isoforme musculaire, on note une bande contaminante intense, aux alentours de 100 kDa (**Figure 45A**).

L'élimination des débris cellulaires avec une centrifugation 10 minutes à 1000g, montre une réduction du bruit de fond de l'anticorps avec une diminution de l'intensité de la bande contaminante à 100 kDa. Néanmoins, aucune bande spécifique pouvant correspondre à une détection d' $\alpha 2\delta$ -4 n'est retrouvée sur les tissus musculaires wild-type (**Figure 45B**).

Dans le muscle, l'anticorps semble manquer de spécificité donnant de nombreuses bandes non spécifiques rendant difficile la mise en évidence de la protéine $\alpha 2\delta$ -4.

Résultats et discussion

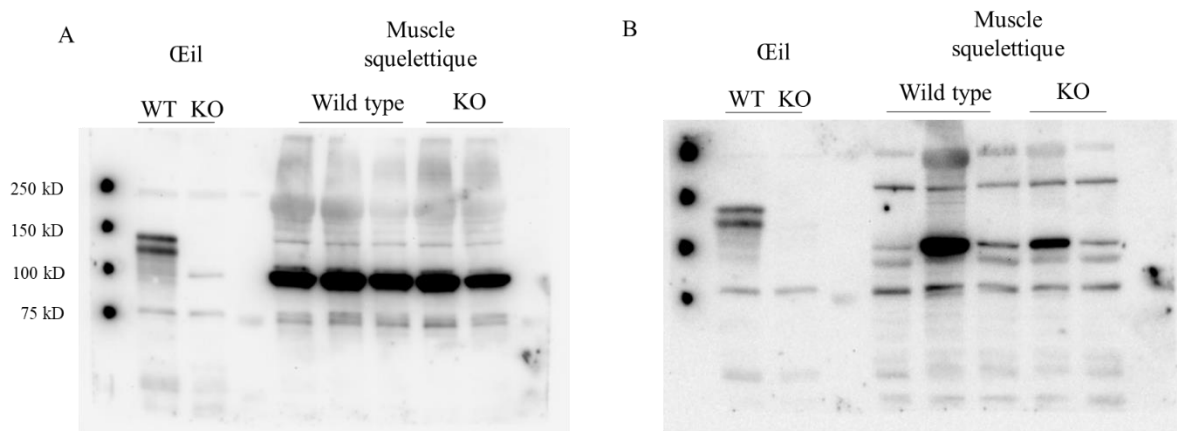


Figure 45 : Etude de l'expression endogène de *CACNA2D4* sur des homogénats de muscle squelettique de souris WT et KO pour ce gène par western blot. A. Western blot (Gel 6%) sur homogénats de muscles squelettiques bruts et d'yeux de souris WT et KO *CACNA2D4*. Révélation avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4. **B.** Western blot sur homogénats de muscles squelettiques et d'yeux de souris WT et KO *CACNA2D4*. Les échantillons ont été centrifugés à 1000g pour 10 minutes afin d'éliminer les débris. Révélation avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta$ -4. Les points noirs indiquent la position des marqueurs de taille.

Sur fractionnement subcellulaire

Dans un second temps, j'ai réalisé un fractionnement subcellulaire pour tenter de concentrer la protéine étudiée et réduire le bruit de fond observé sur homogénat brut. Différentes fractions, nucléaires, mitochondriales, microsomales et cytosoliques ont été obtenues à partir de 50 mg de quadriceps de souris WT et KO *CACNA2D4*. Les échantillons ont été broyés avec le minilyse puis homogénéisés avec un potter et passés à l'ultracentrifugation pour séparer les différentes fractions.

Sur les fractions nucléaire, cytosolique et mitochondriale, on ne trouve aucune bande spécifique, c'est-à-dire présente sur le tissu murin sauvage et absente sur le tissu KO (**Figure 46**).

Résultats et discussion

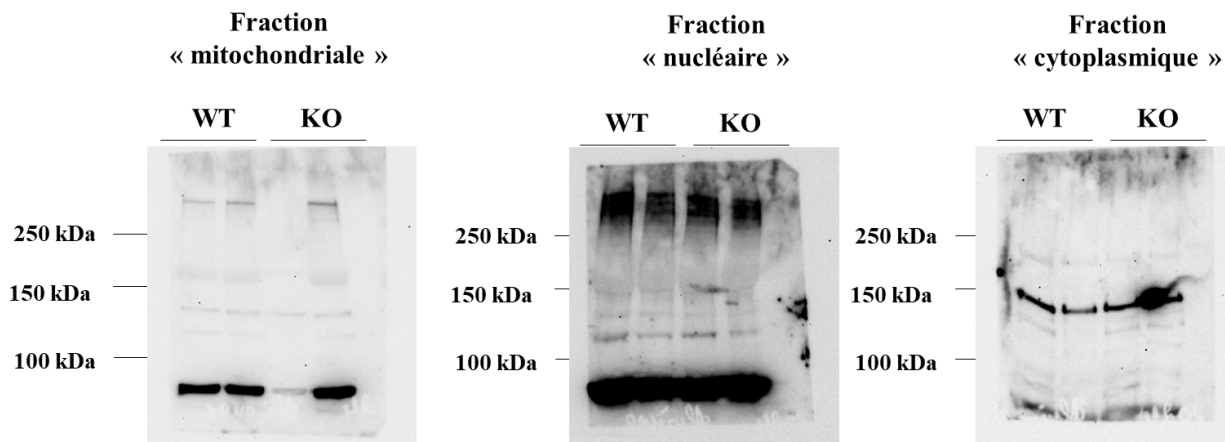


Figure 46 : Etude de l'expression endogène de *CACNA2D4* sur des fractions nucléaire, mitochondriale et cytosolique de muscle squelettique de souris WT et KO pour ce gène par western blot.

L'analyse s'est concentrée sur la fraction microsomale, regroupant les membranes, vu l'expression membranaire de $\alpha 2\delta$ -4. Deux expériences indépendantes ont été faites pour deux observations différentes :

L'expérience 1 montre la présence d'une bande vers 150 kDa dans les échantillons wild-type qui sont absentes chez les KO (**Figure 47A**).

L'expérience 2 cette bande est plus faible et semble présente aussi chez les KO (montrée par la flèche noire) (**Figure 47B**).

Ces deux observations contradictoires dans le muscle rendent impossible une conclusion sur cette expérimentation.

En conclusion, ces différentes expériences n'ont pas permis de prouver l'existence au niveau protéique d' $\alpha 2\delta$ -4 dans le muscle sur modèle murin. La mise en évidence de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 se heurte au manque de spécificité de l'anticorps dans le muscle et peut-être aussi à une faible expression de la protéine. La spectrométrie de masse, méthode plus sensible et plus spécifique pourrait aider à détecter la protéine $\alpha 2\delta$ -4 dans le muscle.

Résultats et discussion

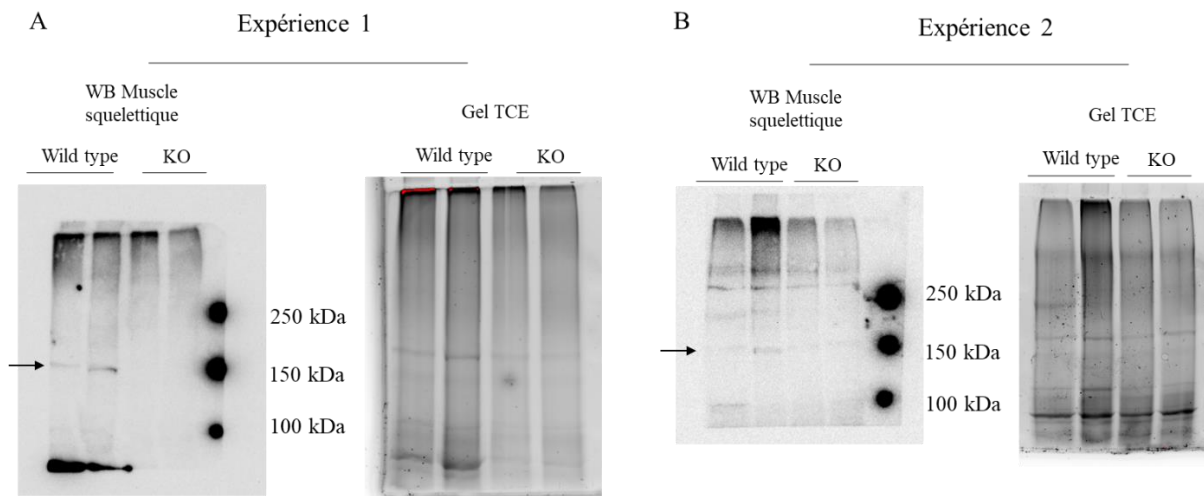


Figure 47 : Etude de l'expression endogène de *CACNA2D4* sur des fractions microsomales de muscle squelettique de souris WT et KO pour ce gène par western blot. A.B. Expérience 1 et 2 : Western blot (Gel 6%) sur fractions microsomales de muscle squelettique bruts de souris WT et KO *CACNA2D4*. Révélation avec l'anticorps anti- $\alpha 2\delta -4$. Le Gel TCE avant le transfert des protéines sur membrane visualise les dépôts de protéines.

B. Spectrométrie de masse

Nous avons donc décidé de rechercher $\alpha 2\delta -4$ en spectrométrie de masse.

La méta-analyse des bases données de protéomique n'a pas permis de répondre à la question, ne retrouvant aucune trace de la protéine. Aucune expérience ne montre de peptide appartenant à $\alpha 2\delta -4$, même dans l'œil. Ceci traduit certainement une certaine difficulté inhérente à la protéine et aux conditions expérimentales.

En collaboration avec le Laboratoire Biosciences et bio-ingénierie pour la santé (BGE) au CEA de Grenoble, nous avons mis en place un projet pour explorer par spectrométrie de masse l'expression de $\alpha 2\delta -4$.

- Etude dans l'œil chez la souris

Une première partie de mise au point a été faite dans l'œil afin de déterminer les meilleures conditions pour détecter $\alpha 2\delta -4$. J'ai déposé 50 μg d'extraits protéiques d'œil de souris wild-type en triplicata sur le même gel (**Figure 48**). Un des puits a servi pour faire un western blot afin de déterminer la zone à découper. Ensuite, j'ai découpé les zones du gel aux tailles attendues des isoformes $\alpha 2\delta -4$ FL et $\alpha 2\delta -4$ M dans l'œil (**Figure 48**). Les bandes découpées

Résultats et discussion

ont été transmises au Laboratoire Biosciences et bioingénierie pour la santé pour analyse en spectrométrie de masse.

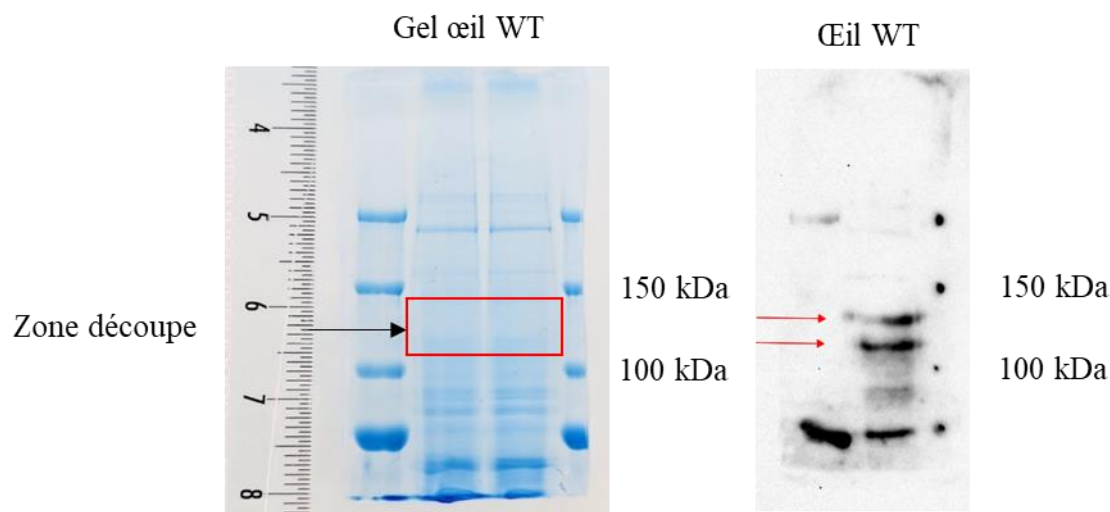


Figure 48 : Préparation échantillons d'yeux de souris wild types pour analyse en spectrométrie de masse. Gauche : gel coloré au FastGene Q-stain (analogue bleu de coomassie) avec la zone de découpe pour analyse. Droite : western blot d'une partie du gel à droite permettant de déterminer la zone de découpe.

L'analyse de ces bandes de gel a permis d'identifier dans l'œil deux peptides (ASTAVTVTVDGK et QASEQPPGSFVFNLR) appartenant à *CACNA2D4*. Ces deux peptides sont localisés dans les parties communes aux isoformes canonique et musculaire (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Spectrométrie de masse identifiant deux peptides *CACNA2D4* spécifiques dans l'œil

Gene name	Coverage	Molecular Weight	Sequence Specific	FALL1_PRM			
				Pep	SC	SSC	WSC
Cacna2d4	2.42	125991	2	2	6	6	6
Tdrd7	1.38	122174	1	1	8	8	8
Eftud2	1.34	109361	1	1	7	7	7
Kirrel1	2.03	87176	1	1	4	4	4
Supt16h	1.43	119825	1	1	7	7	7

Specific peptide CA2D4_MOUSE	PSM Score
ASTAVTVTVDGK	50.45
QASEQPPGSFVFNLR	37.25

Résultats et discussion

Une deuxième analyse a été réalisée pour déterminer les conditions de fragmentation en déterminant le meilleur score PSM. Un Peptide Spectrum Match (PSM) est une correspondance entre un spectre de masse obtenu expérimentalement et un peptide théorique. L'énergie de fragmentation fait référence à l'énergie utilisée pour provoquer la fragmentation des ions précurseurs (ou molécules ionisées) en ions fragments plus petits. L'objectif est de déterminer un spectre énergétique spécifique aux peptides *CACNA2D4*. Ainsi, trois peptides ont été retenus pour la partie analyse dans le muscle squelettique (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Conditions de fragmentation visant à optimiser la détection dans le muscle squelettique

Peptide	FALL1bis					
	Asc PRM-Stepped		Asc PRM-27		Asc PRM-24	
	PSM Score	RT	PSM Score	RT	PSM Score	RT
LSQLEAVVR	54.83	29.72	52.16	29.72	53.23	29.72
LLGEADGALMK	54.16	32.66	46.13	32.67	55.29	32.67
ASTAVTVTVDGK	51.49	21.72	64.25	21.72	48.77	21.72
QASEQPPGSFVFNLR	26.18	44.56				
QLLSMGVFSR						
VFTYLIGR						
SLFVGSEK						
NLYNTVTR						

- Dans le muscle squelettique de souris

Les études sont actuellement en cours sur ce tissu et j'espère pouvoir vous les présenter durant la soutenance.

IV. Discussion

Les études de caractérisation de l'expression musculaire de *CACNA2D4* ont permis la découverte d'un nouveau transcrit, jamais rapporté, qui confère au canal DHPR des fonctionnalités différentes comparées à l'isoforme $\alpha 2\delta$ -1 majoritaire dans le muscle.

On rapporte aussi pour la première fois dans l'œil une forme courte de la protéine qui partage de similarités avec l'isoforme musculaire.

L'étude de l'expression d'une protéine endogène dans le muscle squelettique n'a pas permis de montrer sa présence. Cependant, les analyses par spectrométrie de masse, faites dans l'œil par le laboratoire BGE, ont permis de mettre au point un setup qui permettra une analyse ciblée dans le muscle squelettique.

Une nouvelle isoforme d'épissage *CACNA2D4* M exprimée dans le muscle squelettique

L'étude du transcrit dans le quadriceps de souris a montré l'expression d'une nouvelle isoforme jamais rapportée de *CACNA2D4* avec des différences importantes avec la forme canonique, notamment l'absence des exons 1, 2 et 16. Cette mise en évidence musculaire d'un transcrit *CACNA2D4* vient confirmer des données de la littérature sur une expression dans le muscle squelettique de cette isoforme comme l'ont déjà montré sur des homogénats totaux sans précision sur le type de muscle utilisé dans leurs analyses (Qin et al., 2002; Katharina A. Wycisk et al., 2006). Par contre, sur une autre étude, (Nabhani et al., 2005) n'a pas réussi à amplifier un transcrit musculaire en utilisant des fibres isolées à partir du soleus. Ce dernier est un muscle majoritairement sinon exclusivement chez la souris composée de fibres lentes de type I. En effet, la composition passe de mixte pendant le développement à 100% de fibres de type I à maturité (Komiya et al., 2017). Ceci pose la question de l'hypothèse d'une expression différentielle en fonction du type de fibre ou du stade de développement pour *CACNA2D4* pouvant expliquer la contradiction entre les différentes études. Cette expression différentielle est observée pour certains gènes impliqués dans l'homéostasie calcique musculaire comme les protéines ATPase de recapture du calcium (SERCA) avec une isoforme SERCA1 dans les fibres rapides II et SERCA2 dans les types I. Cette répartition a des implications sur la fonction

Résultats et discussion

musculaire, le métabolisme énergétique au repos et la thermogenèse en raison des différences dans les propriétés de recapture d'ions Ca^{2+} vers le réticulum sarcoplasmique (SR). Ils confèrent des différences de capacités de recapture entre les fibres musculaires humaines. Ainsi, les fibres de type I ont une meilleure efficacité de recapture (pCa 6.8) que les type II (pCa 6.6) (Lamboley et al., 2014). Une expression différentielle de *CACNA2D4* pourrait avoir aussi des implications métaboliques.

On peut donc souligner la nécessité d'une quantification absolue par RT qPCR de l'expression de *CACNA2D4* sur des fibres isolées de différents types afin de dessiner la carte complète de la distribution du transcrite dans le muscle squelettique.

Un autre point intéressant dans les résultats obtenus sur cette investigation musculaire du transcrite *CACNA2D4* est cette isoforme d'épissage jamais rapportée caractérisée par une rétention d'une partie de l'intron 2, l'absence des exons 1, 2 et 16. L'analyse bio-informatique de cette isoforme avec Promoter2.0 prédisant les sites d'initiation de la transcription des promoteurs PolIII des vertébrés dans les séquences d'ADN montre la présence de deux régions promotrices et initiatrices de la transcription possibles dans l'intron 2 (les exon2 + 600 et exon2 + 1200). L'étude de la séquence de l'exon 16 en utilisant SpliceAid 2, une base de données de données des facteurs d'épissage alternatifs montre des sites de liaison des protéines Fox1/Fox2 et HnRNP H1 en amont de l'exon16. Les facteurs d'épissage alternatif FOX1/2 jouent un rôle crucial dans la régulation de l'épissage alternatif (**Figure 49**). Ils se lient spécifiquement à l'élément d'ARN UGCAUG et régulent l'épissage alternatif de manière positive ou négative dépendante de la position du site de liaison. En se liant à l'intron en aval, ils favorisent l'inclusion de l'exon, tandis qu'en se liant à l'intron en amont, ils favorisent le saut de l'exon. Ces facteurs sont principalement exprimés dans le cerveau et le muscle squelettique, et leur mécanisme d'action implique des interactions spécifiques avec d'autres protéines telles que hnRNP H1. Ces interactions modulent l'activité d'épissage de RBFOX1/2, suggérant un rôle clé dans la régulation de l'épissage alternatif (Sun et al., 2012). Ainsi, ces informations apportent un début d'explication pour l'épissage alternatif de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique. Cette exclusion de l'exon 16 est aussi rapportée sur des isoformes humains dans le cerveau.

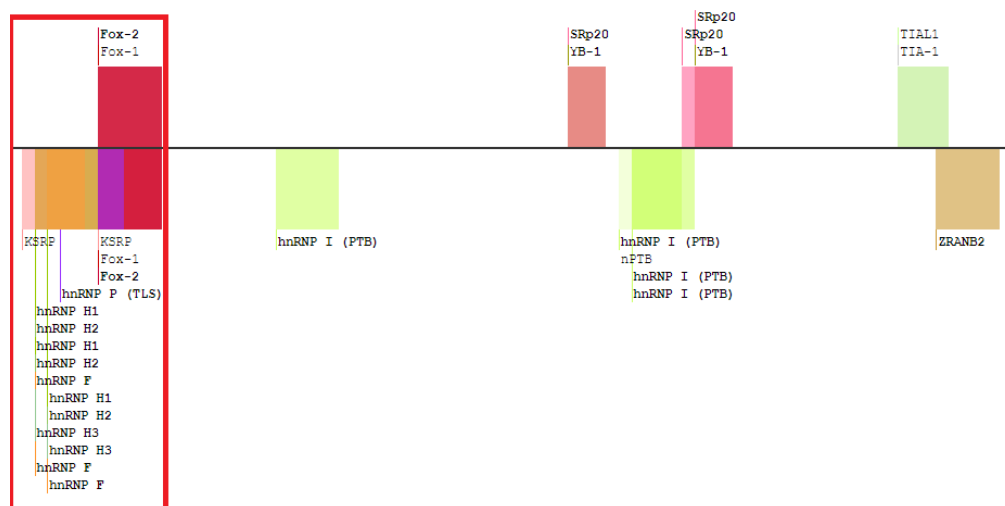


Figure 49 : L'étude de la séquence de l'exon 16 en utilisant SpliceAid 2, un outil de bioinformatique permettant de prédire les sites de liaisons des facteurs d'épissage alternatifs

En résumé, l'expression de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique pourrait être en lien avec le type de fibre et un rôle dans la régulation de l'inhibition médiée par le pH des canaux calciques voltage-dépendants grâce au domaine Cache. L'augmentation de son expression par le stress physique renforce cette hypothèse comme une adaptation à l'acidose métabolique induite par le sport. Néanmoins, cette hypothèse nécessite des investigations plus approfondies qui pourront être faites chez le modèle murin KO *CACNA2D4* comme les soumettre à un protocole d'entraînement intensif et étudier les phénomènes de rhabdomyolyse mais aussi les relâchements de calcium et les propriétés biophysiques du DHPR en conditions acides sur des fibres isolées de différents types.

Etude de l'expression protéique dans le muscle

La mise en évidence de la protéine dans le muscle squelettique chez la souris n'a pas permis de la montrer de façon équivoque malgré les tentatives d'optimisation des techniques d'approche en western blot. Les études par western blot sur lysats totaux ou après fractionnement subcellulaire d'échantillons de quadriceps n'ont pas permis de mettre en évidence la protéine dans le muscle. Néanmoins, certaines de nos données sont encourageantes. Le transcrit musculaire cloné et exprimé dans des cellules HEK293T montre l'expression d'une

Résultats et discussion

protéine stable et fonctionnelle. Les études de caractérisation de ce transcrit ont montré en effet sa capacité à interagir et réguler la sous-unité canalaire, Cav1.1.

Cette impossibilité de la mettre en évidence dans le muscle mène à plusieurs interprétations.

La première est une expression faible ou que la protéine codée par *CACNA2D4* est peut-être absente du muscle. Bien que le quadriceps soit un tissu mixte, si l'expression basale de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 est faible, la sensibilité d'un western blot peut être limitant pour la mettre en évidence. On peut aussi ajouter à cela le manque de spécificité de l'anticorps utilisé avec de nombreuses bandes non spécifiques notamment à la taille attendue de 118 kDa pour l'isoforme musculaire (**Figure 45**).

La deuxième hypothèse, c'est la modulation de l'expression au cours du développement. L'étude dans le cerveau de souris, notamment l'hippocampe, des profils d'expression des différents isoformes des sous-unités $\alpha 2\delta$ montre que l'expression varie en fonction du temps ainsi l'expression de *CACNA2D4* subit des changements significatifs au cours du développement. Pendant la période de développement, l'expression de *CACNA2D4* augmente d'environ 20 fois dans les neurones hippocampiques entre l'état embryonnaire à 8 semaines postnatal, bien que les niveaux d'expression totaux restent relativement faibles (Schlick et al., 2010).

La dernière hypothèse concerne une expression modulée par l'exercice physique. (Vessey et al., 2005). Dans la littérature, on peut noter que l'expression musculaire de *CACNA2D4* est conditionnée par la pratique d'effort physique intense avec des données transcriptomiques aussi bien chez l'homme que la souris montrant une augmentation de l'expression de cette sous-unité (Andonian et al., 2021; Murray et al., 2024). Ainsi, ce serait intéressant d'étudier l'évolution de l'expression du transcrit musculaire sur des souris soumises à un exercice forcé.

Cependant, on montre dans l'œil, où le transcrit du nouvelle isoforme d'épissage *CACNA2D4* est présent, l'expression d'une protéine endogène qui répond aux caractères du transcrit identifié dans le muscle.

L'étude de l'expression par la spectrométrie de masse semble être le moyen le plus adapté pour répondre à la question d'une protéine musculaire $\alpha 2\delta$ -4.

Résultats et discussion

En conclusion, nos résultats semblent montrer une expression et des fonctions musculaires pour $\alpha 2\delta-4$ avec des différences avec $\alpha 2\delta-1$ en termes de régulation du canal DHPR mais tout en conservant sa capacité à réguler un canal fonctionnel. Certaines des particularités du nouveau transcrit comme l'absence de peptide signal interroge sur les mécanismes qui soutendent son expression membranaire et une caractérisation approfondie sera nécessaire.

Projets annexes : *CACNIAS* et
STAC3 dans l'homéostasie
calcique

Partie 1 : Caractérisation fonctionnelle
d'un nouveau variant d'épissage sur
CACNAIS

Projets annexes

I. Contexte de l'étude

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu à travailler sur des projets annexes dans le même champ d'investigation que mon sujet de thèse à savoir la caractérisation fonctionnelle de mutations sur des gènes impliqués dans l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique.

Le couplage excitation contraction dans le muscle squelettique est à la base de l'homéostasie calcique musculaire. Par ce processus, la contraction musculaire est mise en place grâce à la libération de calcium du réticulum vers le cytosol. Le canal DHPR joue un rôle important dans ce mécanisme en formant un complexe macromoléculaire avec le canal calcique sarcoplasmique RyR1. Chez l'homme, des mutations identifiées sur *CACNA1S*, la sous-unité canalaire de DHPR, sont associées à des pathologies autosomiques dominantes incluant l'hyperthermie maligne peranesthésique et la paralysie périodique hypokaliémique (Flucher, 2020).

J'ai participé à une étude qui décrit l'identification et les conséquences de mutations hétérozygotes composites, dont un nouveau variant d'épissage du gène *CACNA1S*, chez deux femmes non apparentées atteintes de myopathie congénitale.

Les caractéristiques cliniques communes des deux patientes non apparentées atteintes de myopathie congénitale, causée par les mêmes variants hétérozygotes dans le gène *CACNA1S*, incluent une hypotonie précoce, un retard du développement moteur, une faiblesse musculaire progressive et une légère atteinte faciale. Ces symptômes sont cohérents avec les caractéristiques cliniques généralement associées aux myopathies liées au gène *CACNA1S* (Flucher, 2020).

Les deux mutations identifiées, c.2970G>A et c.5104C>T, sont prédites pour générer des codons STOP prématurés et donc une invalidation du gène.

La mutation c.5104C>T génère en théorie un codon STOP induisant un canal Cav1.1 fonctionnel sans son extrémité C-terminale. Cependant, les études menées par l'équipe en RNASeq à partir de biopsie musculaire d'une patiente montrent que l'ARNm portant la mutation c.5104C>T subit en fait une dégradation par NMD (Nonsense-mediated mRNA decay) (**données pas encore publiées**).

Projets annexes

La même analyse de l'ARNm montre que la mutation c.2970G>A dans l'exon 24 conduit en fait à l'activation d'un site donneur cryptique (GUGAGU) et à l'élimination de 87 paires de bases à l'extrémité 3' de l'exon. Cette mutation provoque une délétion en phase de 29 acides aminés dans la sous-unité Cav1.1 du récepteur dihydropyridine (DHPR), incluant l'acide glutamique en position E1014 qui joue un rôle essentiel dans le filtre de sélectivité du canal (**données pas encore publiées**).

L'étude de l'expression montre que, malgré les mutations, l'expression de la sous-unité Cav1.1 est maintenue dans les cellules musculaires de la patiente, avec probablement une prédominance de la forme tronquée de 29 acides aminés de la protéine (**données non publiées**). Les conséquences fonctionnelles de ces mutations incluent une altération potentielle de la sélectivité ionique du canal, car les résidus supprimés font partie du pore et du filtre de sélectivité du canal. Les études antérieures suggèrent que des mutations similaires peuvent modifier la perméabilité du canal à divers ions, mais les expériences d'électrophysiologie réalisée par l'équipe jusqu'ici n'ont pas révélé de changements significatifs dans les courants ioniques après une surexpression du canal mutant.

Les mutations des résidus glutamates du filtre de sélectivité dans les canaux Cav2.1 et Cav2.2 entraînent une diminution significative du trafic des canaux vers la membrane plasmique cellulaire et dans les neurites et terminaux présynaptiques des neurones hippocampiques (Meyer et al., 2019).

Dans le cadre de ce projet, j'ai étudié les conséquences des mutations sur *CACNA1S* dont la perte du glutamate E1014 sur l'adressage du canal $\alpha 1S$ (Cav1.1) à la surface.

II. Résultats et discussion

A. Etude de l'adressage à la surface de Cav1.1 sur des cellules musculaires immortalisées de la patiente

Les myoblastes immortalisés de la patiente (dénommés cellules PAT) et des cellules contrôles, provenant d'un patient sans altérations sur *CACNA1S*, ont été mis en différenciation pendant 7 jours. Les myotubes ont ensuite été utilisés pour isoler les protéines membranaires par biotinylation de surface. Différentes protéines ont été investiguées : la chaîne lourde de la

Projets annexes

myosine MyHC pour la qualité de la différenciation, le GAPDH comme marqueur cytoplasmique et Cav1.1 afin d'étudier son adressage à la surface.

La révélation par western blot montre dans le lysat total l'expression des formes clivées et longues de *CACNAIS* avec les deux bandes observées. On note aussi l'expression de la chaîne lourde de la myosine dans les cellules PAT de la patiente et contrôles (**Figure 50A**).

Cela montre l'expression d'une protéine Cav1.1 dans les myotubes PAT malgré la mutation et aussi que les myotubes immortalisés du patient se différencient correctement. La quantification (n=3) dans le lysat total du ratio Cav1.1 (α 1S) sur la myosine ne montre pas de différence significative avec les contrôles (**Figure 50B**).

La quantification du ratio de Cav1.1 exprimée à la surface rapportée sur son expression totale montre une diminution significative ($p=0,0158$) de 50% de l'adressage de Cav1.1 dans les myotubes portant les mutations (PAT) comparées aux contrôles (**Figure 50C**).

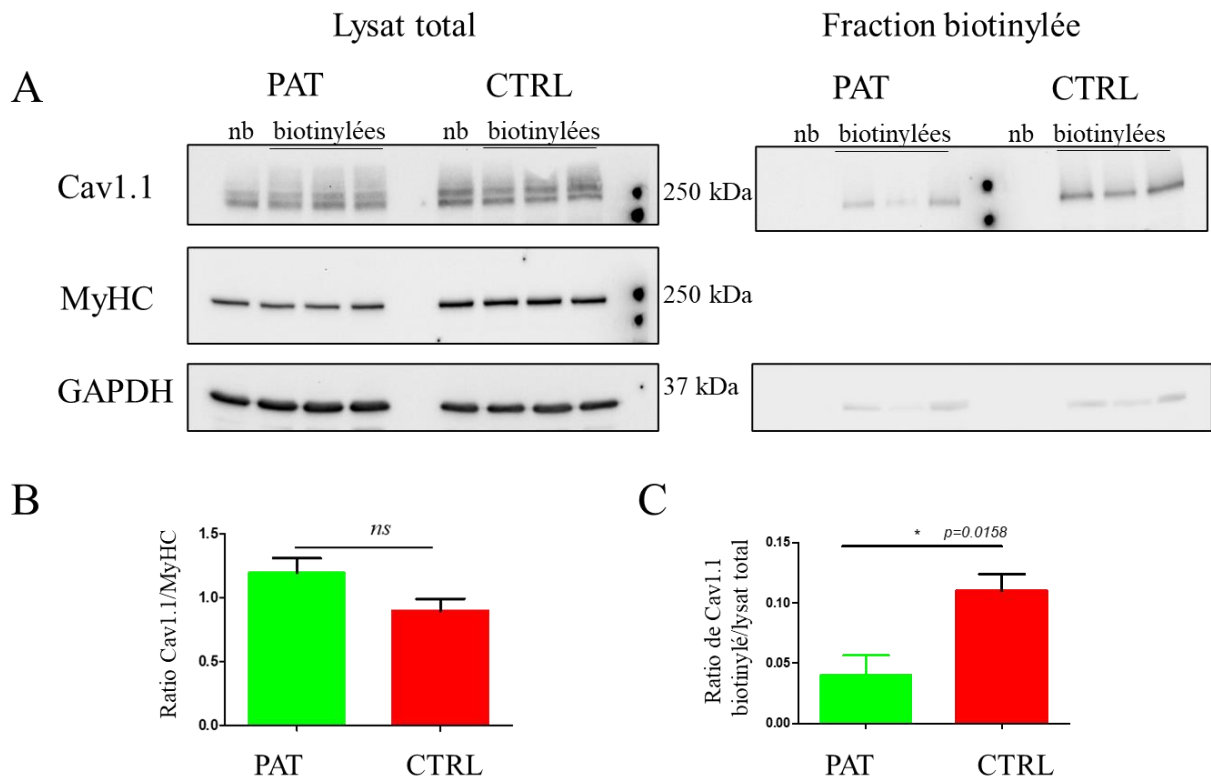


Figure 50 : Etude de l'impact des mutations dans *CACNAIS* sur l'adressage à la surface du canal. A. Western blot de la biotinylation de surface sur myotubes de la patiente différenciés 7 jours. Le lysat total avant élution des protéines biotinylées avec des billes agaroses streptavidine. La fraction biotinylée contient les protéines membranaires

Projets annexes

biotinylées. La chaîne lourde de la myosine sert de contrôle de différenciation et le GAPDH marqueur cytoplasmique. **B.** Histogrammes de quantifiant le niveau de différenciation par le ratio Cav1.1 total sur la MyHC. **C.** Histogrammes quantifiant l'expression membranaire de Cav1.1 par le ratio Cav1.1 biotinylé sur Cav1.1 du lysat total. N = 3 t-test non apparié (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001). PAT (patient) : myotubes immortalisés de la patiente CTRL : myotubes contrôles issus d'un patient ne présentant pas d'altération sur *CACNA1S*. nb : non biotinylées servant de contrôle de spécificité de la biotinylation

Ces résultats montrent une altération de l'adressage membranaire de la sous-unité $\alpha 1S$ (Cav1.1) dans les myotubes immortalisés de la patiente portant les mutations c.2970G>A et c.5104C>T. La mutation c.5104C>T menant à une dégradation de l'ARNm par NMD, l'impact observé est probablement dû à la mutation c.2970G>A qui entraîne l'épissage de 29 acides aminés dans l'exon 24 incluant le glutamate E1014 du filtre de sélectivité.

B. Discussion

La clinique des patientes est conforme aux descriptions, dans la littérature, des myopathies liées à *CACNA1S* (Flucher, 2020). Les variants identifiés c.2970G>A et c.5104C>T ont été prédits comme menant à des stops prématurés.

L'analyse du variant c.5104C>T, situé dans l'exon 41, a pour conséquence la dégradation de l'ARNm par le mécanisme NMD. Par contre le variant c.2970G>A, situé dans l'exon 24, entraîne l'activation d'un site donneur d'épissage cryptique et le saut de 87 paires de bases à l'extrémité 3' de l'exon, ce qui conduit à une délétion en phase de 29 acides aminés dans la sous-unité Cav1.1 du récepteur dihydropyridine, affectant potentiellement le pore du canal et le filtre sélectif des ions.

L'analyse par biotinylation de surface dans le cadre de mon travail de thèse a révélé une forte réduction de l'expression de la sous-unité Cav1.1 mutée à la surface cellulaire, suggérant un impact des mutations sur l'adressage ou la stabilité de la protéine à la membrane. Ce résultat est cohérent avec la littérature. La mutation en alanine des quatre résidus glutamate situés entre les segments S4-S5 des quatre domaines ($E_{I-II-III-IV}A$) sur Cav2.2 entraîne l'absence de courants entrants et sortants, indiquant une perte significative de la fonction du canal. De plus, l'expression en surface cellulaire du canal Cav2.2 muté sur ses résidus $E_{I-II-III-IV}A$ est extrêmement réduite par rapport au canal non muté, ce qui suggère que la mutation compromet

Projets annexes

gravement la capacité du canal à être correctement acheminé vers la membrane plasmique (Meyer et al., 2019).

Ce résultat permettrait d'expliquer pourquoi les travaux réalisés par nos collaborateurs indiquent que la surexpression de la forme mutée dans des fibres musculaires de souris n'affecte pas les mesures d'électrophysiologie effectuées à la surface de ces mêmes fibres. Par ailleurs, les études réalisées au sein du laboratoire montrent que le couplage excitation-contraction est réduit, dans des myotubes en culture issus d'une biopsie du patient (**données pas encore publiées**). Un défaut d'adressage de Cav1.1 permettrait d'expliquer ce résultat.

Ces découvertes suggèrent que les mutations dans *CACNA1S* contribuent à la pathogénie de la myopathie congénitale observée chez les patientes par des mécanismes affectant la stabilité et la fonction de la sous-unité Cav1.1 du récepteur dihydropyridine.

Cette étude apporte un nouvel éclairage sur les mécanismes pathogéniques des myopathies congénitales liées à *CACNA1S* et souligne la nécessité de poursuivre les recherches pour comprendre pleinement les répercussions de ces mutations sur la fonction musculaire et la pathologie.

Partie 2 : Myopathie congénitale en lien
avec des variants *STAC3* chez un patient
non-amérindien

Projets annexes

I. Contexte de l'étude

J'ai aussi, au cours de ma thèse, travaillé sur la caractérisation fonctionnelle de mutations sur un autre gène du complexe de relâchement du calcium, *STAC3*.

STAC3 est une protéine adaptatrice qui participe à la modulation du complexe du récepteur de la ryanodine (RyR1). C'est un composant vital du couplage excitation-contraction, facilitant la signalisation entre les canaux calciques DHPR et RyR1, ce qui est crucial pour la libération de calcium et une contraction musculaire efficace. *STAC3* détermine aussi les cinétiques lentes des courants calciques du DHPR et inhibe spécifiquement l'inactivation dépendante du voltage (VDI) des courants calciques (Tuinte et al., 2022).

Des mutations sur ce gène sont impliquées dans des myopathies comme la myopathie des natifs amérindiens (NAM) avec comme conséquences l'altération du couplage ECC et une réduction de la libération de Ca^{2+} par le canal RyR1. Cette myopathie se caractérise par une faiblesse musculaire congénitale, une hypotonie et une susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique (Grzybowski et al., 2017; Telegrafi et al., 2017).

Le cas index de l'étude est un nourrisson de 3 mois avec un syndrome polymalformatif, des malaises à répétition sur reflux gastro-œsophagien, une hypotonie axiale et périphérique, un déficit des ceintures, cyphose, hypomimie et EMG (Electromyogramme) en faveur d'une pathologie musculaire primitive.

Les études moléculaires sur un panel de 150 gènes impliqués dans les myopathies ont permis d'identifier deux mutations hétérozygotes composites sur *STAC3* : c.88_91del p.L30fs classée pathogène prédite délétère avec un codon STOP prématuré et la mutation intronique c.334+15G>C de signification inconnue. Les études d'ARNseq montrent que le variant c.334+15G>C est à l'origine de différents *transcrits* :

- Un premier transcrit porteur d'une rétention intronique de 13 nucléotides à l'origine d'un décalage de cadre de lecture aboutissant à l'apparition d'un codon STOP prématuré
- Un second transcrit porteur d'une rétention intronique totale de 237 nucléotides codant pour une séquence comportant la présence de codons STOP.

Projets annexes

La présence d'un transcrit normal en très faible quantité n'a cependant pas été exclue. Ainsi, l'objectif de cette étude était de connaître l'impact de ces mutations sur l'expression de la protéine et les relâchements de calcium via le complexe de couplage excitation – contraction sur des myotubes issus de myoblastes immortalisés du patient (PAT).

II. Résultats et discussion

A. Etude de l'impact des mutations sur l'expression de la protéine *STAC3*

Afin d'évaluer la pathogénicité des variants, j'ai réalisé des études fonctionnelles sur les cellules musculaires issues du patient.

J'ai étudié par western blot sur des myotubes différenciés pendant 7 jours, l'expression de la protéine *Stac3*. Les lysats des myotubes du patient (PAT) et des contrôles (issus de sujets sans mutation sur *Stac3*) sont déposés sur un gel acrylamide.

La révélation du western blot montre une expression normale de la chaîne lourde de la myosine, témoin de la différenciation, aussi bien dans les cellules mutées que les contrôles. Néanmoins, on peut voir un niveau d'expression plus important dans les cellules PAT (**Figure 51A**) traduisant une meilleure différenciation.

L'analyse montre une réduction importante de l'expression de *Stac3* dans les cellules du patient comparé aux cellules contrôles. Néanmoins, une expression résiduelle de la protéine persiste au même poids moléculaire que chez les contrôles (**Figure 51A**). La quantification de l'expression relative rapportée au niveau de différenciation (MyHC) montre une réduction significative ($p = 0,0068$) de 90% de *Stac3* dans les cellules PAT sur $n=4$ expériences (**Figure 51AB**). Ces résultats confirment les données d'ARNseq sur les conséquences des mutations identifiées concernant l'expression de *Stac3*.

De façon surprenante, on observe aussi une réduction de l'expression de *RyR1* dans les myotubes mutés (**Figure 51A**). Cette réduction a été quantifiée à 50% de l'expression de *RyR1* ($n = 3$ $p = 0,011$ test t non apparié) dans les myotubes mutés comparés aux contrôles (**Figure 51B**).

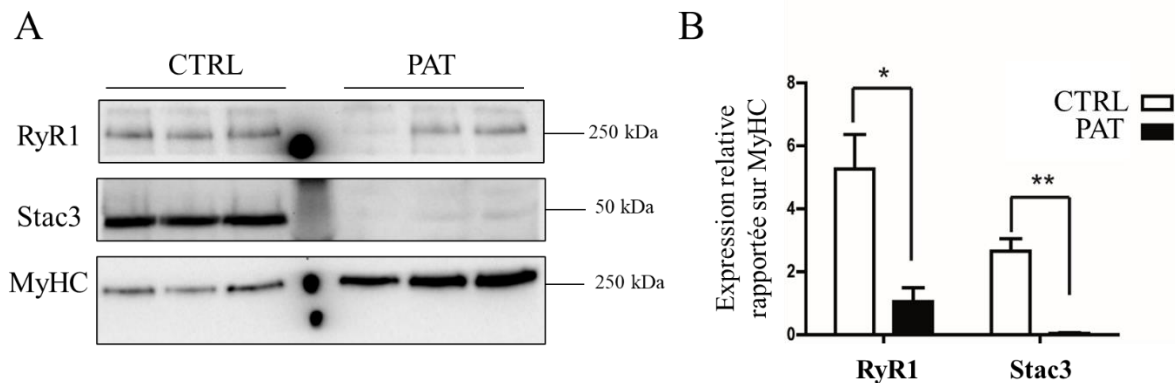


Figure 51 : Etude de l'impact des mutations sur l'expression de la protéine. A. Western blot sur extraits protéiques de myotubes du patient portant la mutation ou de cellules contrôle avec 7 jours de différenciation montrant l'expression de RyR1, Stac3 et de la chaîne lourde de myosine (MyHC). **B.** Analyse quantitative du signal protéique du western blot par rapport au témoin MyHC (n=4) PAT (n=4). Statistique *P<0,05, **P<0,01, par test t non apparié

B. Etude de l'impact sur les relâchements de calcium

Les mutations entraînent des altérations importantes de l'expression des gènes *STAC3* et *RYR1* impliqués dans l'homéostasie calcique musculaire. J'ai donc étudié les relâchements de calcium sur les myotubes PAT mutés, issus du patient, comparés aux cellules contrôles différenciés 7 jours. Différentes conditions de stimulation ont été étudiées : une dépolarisation induite avec du KCl 140 mM ou avec un agoniste RyR1, le 4 Chloro -m- Cresol (4 CmC). La stimulation avec du KCl a été faite en présence de calcium extracellulaire et en absence de calcium extracellulaire, mais avec présence de cadmium et de lantane. Le cadmium et le lantane permettent d'inhiber l'entrée de calcium dans les cellules en bloquant les canaux calciques voltage-dépendants. Le lantane rentre aussi en compétition avec le calcium résiduel. Ainsi, tout le flux de calcium entrant est bloqué et les mesures faites dans ces conditions permettent d'évaluer uniquement les flux calciques intra-cellulaires.

Elle permet aussi d'étudier la fonction de senseur du voltage de DHPR vue l'absence de CICR (la libération de calcium induite par le calcium entrant via le DHPR).

Les résultats montrent :

Projets annexes

KCl 140 mM avec calcium extracellulaire : on note une réduction de 75% du pic des libérations de calcium dans les myotubes PAT comparés aux contrôles (**Figure 52A**). On note aussi une différence dans la cinétique des flux calciques : le retour à l'état basal est plus rapide pour les cellules du patient (**Figure 52A**).

KCl 140 mM sans calcium extracellulaire : on observe des relâchements de calcium extracellulaires moins importants dû à l'absence de flux entrant. (**Figure 52B**). On note aussi la baisse des libérations de calcium dans les myotubes PAT avec une baisse de 75% des pics de calcium comparés aux contrôles (**Figure 52B**). Le défaut sur la cinétique de retour à la ligne de base, observé dans les myotubes mutés *Stac3*, est beaucoup plus marqué en absence de calcium extracellulaire. Le retour à la ligne de base s'effectue au bout de 40 secondes chez les cellules mutées et 50 secondes pour les contrôles (**Figure 52B**).

4 Chloro-m-Cresol : Le 4-CmC est utilisé pour activer directement le relâchement de calcium par RyR1. Il permet d'étudier le comportement du canal RyR1 en outrepassant l'action du DHPR.

On note une réduction du pic de calcium libéré par RyR1 dans les myotubes du patient de 25% comparés aux contrôles (**Figure 52C**). On ne note pas de différence sur les cinétiques des flux de calcium dans les myotubes mutés comparés aux contrôles.

Cette réduction, observée dans les cellules PAT, pourrait être expliquée par la baisse d'expression de RyR1 observée (**Figure 51B**).

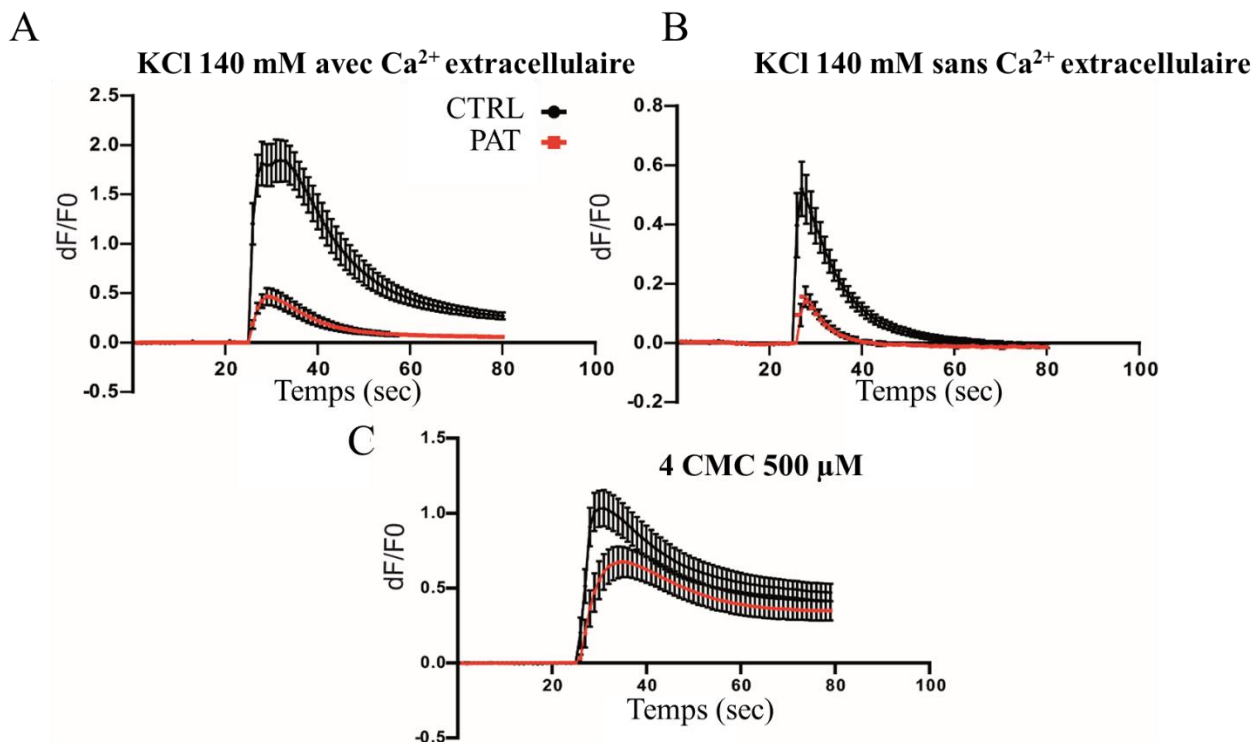


Figure 52 : Etude de l'impact des mutations sur les relâchements de calcium sarcoplasmique. **A.** Imagerie calcique sur des myotubes différenciés à 7 jours stimulés par KCl 140 mM en présence de calcium extracellulaire PAT (n=126) et contrôle (n=76). **B.** Imagerie calcique sur des myotubes différenciés à 7 jours stimulés par KCl 140 mM en l'absence de calcium extracellulaire PAT (n=28) et témoins (n=29). **C.** Imagerie calcique sur des myotubes différenciés à 7 jours stimulés par 4 CMC 500 µM PAT (n= 93) et témoins (n= 73). Statistique *P<0,05, **P<0,01, par test t non apparié

C. Discussion

À travers son interaction avec Cav1.1, Stac3 est impliquée dans la modulation de l'ouverture des canaux calciques et, par conséquent, dans la régulation du flux de calcium du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol. Ce flux de calcium est le signal direct qui déclenche la contraction musculaire.

Les résultats observés montrent une altération générale de l'homéostasie calcique dans les cellules musculaires issues de biopsie du patient de cette étude qui s'explique par les altérations de l'expression de Stac3 et RyR1. Ces défauts sont cohérents avec la clinique du patient présentant des signes de myopathie primitive, dont l'hypotonie axiale et périphérique. Ainsi, on confirme le caractère pathogène des mutations identifiées.

Les défauts observés dans les relâchements de calcium sont cohérents avec la littérature sur *STAC3*. *STAC3* joue un rôle crucial dans la modulation des courants calciques via le canal Cav1.1, qui est essentiel pour le couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique. L'interaction entre *STAC3* et le canal Cav1.1 est importante pour déterminer les cinétiques caractéristiquement lentes d'activation et d'inactivation des courants de ce canal. La mutation *STAC3*-ETL-AAA (Les résidus ETL substitués aux résidus AAA) perturbe l'interaction entre la région de liaison de *STAC3* et le C-terminus proximal de Cav1.1 (Tuinte et al., 2022). Cette perturbation entraîne une accélération significative des cinétiques d'activation et d'inactivation des courants Cav1.1. Plus précisément, la mutation *STAC3*-ETL-AAA accélère le temps d'activation et augmente la vitesse d'inactivation des courants, ce qui indique que l'interaction normale entre *STAC3* et Cav1.1 est essentielle pour maintenir les cinétiques lentes d'activation et d'inactivation. En outre, il a été démontré que *STAC3* inhibe l'inactivation dépendante du voltage (VDI) de Cav1.1, contrairement à son effet sur d'autres isoformes de canaux calciques de type L, où *STAC3* inhibe l'inactivation dépendante du calcium (CDI) (Tuinte et al., 2022).

Chez les souris KO pour *STAC3* on note l'absence de transitoires calciques induits par la dépolarisation. De plus, bien que les myotubes KO puissent répondre à l'agoniste du récepteur de la ryanodine, le 4-CMC, ils restent non réactifs à la dépolarisation induite par le KCl. Cela indique que le défaut primaire chez ces souris est la perte complète de la libération de calcium dépendante du voltage à partir du réticulum sarcoplasmique (SR), ce qui est essentiel pour la contraction musculaire (Nelson et al., 2013). Ainsi, on observe chez les myotubes du patient une baisse plus importante avec la dépolarisation au KCl qu'avec le 4-CmC.

En conclusion, on rapporte ici le cas d'un patient avec une myopathie sévère périnatale, une faiblesse musculaire, des difficultés à déglutir et une cyphose qui sont des symptômes conformes à la description de la myopathie des natifs amérindiens (NAM) chez un patient non-amérindien. Notre étude permet de montrer le caractère pathogène des mutations sur *STAC3* en cohérence avec le phénotype. Avec cette étude, on apporte un éclairage nouveau sur les mécanismes de l'homéostasie calcique musculaire et sur les myopathies liées à *STAC3*. La NAM se caractérise aussi par une susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique donc il serait intéressant d'étudier cette sensibilité sur les cellules du patient.

Chapitre 4 : Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'hyperthermie d'effort (HE) est une pathologie potentiellement fatale, caractérisée sur le plan clinique par une hyperthermie sévère, une atteinte du SNC et des lésions multiviscérales et sur le plan physiopathologie par un syndrome inflammatoire, une coagulopathie et une rhabdomyolyse sévère. Elle est déclenchée par l'effort physique intense et prolongé. La population à risque est composée d'adultes en bonne forme physique pratiquant une activité physique soutenue. Si la prise en charge est efficace grâce au refroidissement par immersion dans de l'eau froide, cependant, les séquelles peuvent être importants. Aujourd'hui, les causes sous-jacentes de l'HE sont toujours très mal comprises. L'existence d'une prédisposition génétique dans l'HE est évoquée depuis les années 90, avec notamment des similarités phénotypiques avec l'hyperthermie maligne peranesthésique. Cette similarité a orienté vers un défaut de l'homéostasie calcique comme cause primaire de l'HE.

C'est pourquoi l'identification de mutations chez des patients HE sur le gène *CACNA2D4*, une sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants de type L, est potentiellement une avancée importante pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

CACNA2D4 et les hyperthermies déclenchées

Dans le contexte de ma thèse, j'ai étudié l'implication de ce gène candidat dans la survenue de l'hyperthermie d'effort. Ce travail permettrait d'améliorer les méthodes de diagnostic, de dépistage et de prévention de cette maladie dont l'incidence est en hausse.

Dans un premier temps, j'ai caractérisé un modèle murin portant une des mutations identifiées chez les patients. Le but de cette étude était d'établir l'implication de *CACNA2D4* dans l'HE, mais également d'étudier le lien entre l'HE et la susceptibilité à l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM). Enfin, j'ai investigué le rôle du couplage excitation-contraction dans l'étiologie de l'HE.

Pour répondre à ces questions, j'ai participé au développement d'un modèle murin hétérozygote pour la mutation p.(Ser306Arg) (p.(Ser299Arg) chez l'humain) du gène *CACNA2D4* par CRISPR Cas9 (KI-S306R). Les souris KI-S306R ont été soumises à un protocole de stress physique sur tapis roulant décrit dans la littérature comme pouvant déclencher un état proche de l'hyperthermie d'effort chez des souris non mutées (WT).

Conclusion et perspectives

L'objectif était donc de comparer la sensibilité du modèle KI-S306R dans ces conditions par rapport aux souris WT. L'étude a également examiné la sensibilité des souris à la chaleur et à l'isoflurane, un anesthésique halogéné, pour explorer le lien entre l'hyperthermie d'effort et l'hyperthermie maligne peranesthésique.

J'ai pu montrer chez les souris KI-S306R un phénotype HE caractérisé par une température rectale supérieure à 43°C associée à une rhabdomyolyse sévère après un exercice intense, en écho aux symptômes cliniques chez les patients. Les résultats obtenus montrent 1) une plus grande sensibilité à déclencher un phénotype HE des souris KI-S306R comparées aux WT, 2) une température rectale en fin de course plus élevée et des taux de CPK 2 fois plus importants chez les KI-S306R en comparaison aux WT. Cependant il est apparu dans les conditions que nous avons testées une disparité importante entre animaux mâles et femelles. Les souris mâles ont une plus faible tolérance à l'exercice rendant plus difficile la ségrégation des phénotypes entre animaux KI-S306R et WT en ce qui concerne la survenue d'une crise HE, mimée par l'arrêt, pendant au moins 10 secondes, de l'exercice forcé par les animaux. Cependant les CPK mesurés après exercice sont deux fois plus élevés chez les KI-S306R mâles comparés aux WT indiquant une rhabdomyolyse plus importante. Chez les femelles en revanche, la température rectale en fin de course des souris KI-S306R (43.49°C) est plus élevée que celle des WT (42.48°C) associée à des taux de CPK deux fois plus importants chez les KI.

Ainsi, on reproduit chez les souris KI-S306R un phénotype HE plus fidèle à la clinique humaine comparé aux WT. Ces résultats viennent donc valider le premier modèle murin génétique de l'hyperthermie d'effort.

Pour étudier un lien entre hyperthermie d'effort et hyperthermie maligne, les souris KI-S306R ont été soumises aux déclencheurs utilisés dans la littérature (isoflurane et exposition à la chaleur). Nous avons observé que : 1) l'exposition à l'isoflurane, un anesthésique halogéné connu pour déclencher l'HM, n'entraîne pas de hausse de la température rectale comme ce qui est observé dans les modèles RyR1 et CASQ1 de HM (Dainese et al., 2009; Durham et al., 2008). 2) le test de thermo-sensibilité ne montre pas une plus grande sensibilité des KI-S306R comparés aux WT. Ces résultats indiquent donc que le modèle KI-S306R n'est pas un modèle d'hyperthermie maligne.

Conclusion et perspectives

Ce travail sur le modèle de souris KI-S306R indique donc que si les mutations du gène *CACNA2D4* peuvent être responsables de phénotype HE, elles ne sont pas responsables d'hyperthermie maligne peranesthésique.

Mécanismes moléculaires associés aux mutations de *CACNA2D4*

Une origine musculaire de l'HE avec une altération de l'homéostasie calcique est postulée depuis plusieurs décennies. Les patients avec les mutations sur *CACNA2D4* présentant un défaut du test de contracture *in vitro* musculaire, nous avons étudié l'homéostasie calcique chez le modèle murin KI-S306R. L'objectif était de comprendre l'implication d'un défaut de l'homéostasie calcique dans le muscle en lien avec la mutation p.(Ser306Arg) sur la survenue du HE.

Pour répondre à cette interrogation, des analyses sur le tissu musculaire, les fibres isolées et les cellules satellites ont été menées pour investiguer l'expression des protéines du complexe de relâchement du calcium (CRC), les mécanismes de relâchement de calcium et les propriétés électrophysiologiques du canal DHPR.

L'exercice physique étant le déclencheur de l'HE, j'ai voulu étudié les conséquences des modifications du pH, constatées dans le muscle lors d'un exercice physique, sur les relâchements de calcium dans des myotubes KI-S306R et WT. J'ai pu montrer une altération de la sensibilité du couplage excitation-contraction en milieu acide ayant comme conséquence des libérations de calcium dans le cytosol plus accrues de 8% chez les KI-S306R comparées aux WT. L'étude des relâchements de calcium sur des fibres isolées, à pH physiologique, ne montre pas d'altérations majeures en accord avec l'absence de signes cliniques de la maladie sans déclenchement de la crise chez les patients par l'exercice.

L'inhibition par les protons des canaux calciques voltage-dépendants de type L, comme le DHPR, est connue depuis longtemps et régule l'excitabilité cellulaire. Pour mieux comprendre cet effet du pH constaté sur les relâchements de calcium des myotubes KI-S306R, une étude collaborative avec une équipe de l'Université du Texas a été menée. L'étude des propriétés biophysiques du canal DHPR reconstitué dans des HEK293T a permis de montrer que la mutation p.(Ser306Arg) rendait le canal moins sensible à l'inhibition dépendant des protons.

Conclusion et perspectives

Ainsi, cette mutation réduit l'inhibition du canal en milieu acide entraînant une activation anormale qui peut mener à l'augmentation des relâchements de calcium observée dans les myotubes KI-S306R.

Il est donc possible que la physiopathologie de la crise HE due à des mutations du gène *CACNA2D4* ne repose que sur une modification des flux calciques musculaires liées aux variations du pH des fibres musculaires pendant un exercice, qui pourrait ensuite entraîner un emballement métabolique menant à la rupture de la balance de thermorégulation. Ainsi, l'HE serait une pathologie due à une altération de l'homéostasie calcique dans le muscle avec l'acidose métabolique de l'exercice physique comme déclencheur.

J'ai aussi étudié l'impact de la mutation p.(Ser306Arg) sur *CACNA2D4* sur l'expression des acteurs du CRC, à savoir RyR1, Stac3 et *CACNA1S*, connus pour être impliqués dans l'hyperthermie maligne. L'étude, réalisée sur des homogénats de muscle de souris KI-S306R et les WT compagnons de portée, ne montre pas d'altération des canaux RyR1 et *CACNA1S*. Cependant, on note une réduction de 10% de l'expression de Stac3. Ce résultat est intéressant, car une altération dans des proportions plus importante de l'expression de Stac3 dans la myopathie des natifs amérindiens est responsable de la survenue d'hyperthermie maligne.

En résumé, la caractérisation fonctionnelle du modèle murin a permis de mettre en évidence un lien entre la mutation p.(Ser306Arg) de *CACNA2D4* et l'hyperthermie d'effort, ainsi qu'une altération de l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique, contribuant à notre compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette condition.

Dans un second temps, j'ai étudié *in vitro* le caractère pathogène des mutations identifiées sur *CACNA2D4* chez les patients. Le but de ce travail était de comprendre les impacts des mutations au niveau protéique et sur la régulation du canal DHPR.

Pour répondre à ces questions, des modèles d'expression hétérologues ont été utilisés avec surexpression des protéines mutées dans des cellules HEK293T et COS7. J'ai étudié les impacts des mutations sur la localisation membranaire de la protéine et ses fonctions régulatrices du canal DHPR.

Conclusion et perspectives

J'ai pu montrer que les mutations entraînent une perte de la localisation membranaire de la protéine avec une rétention périnucléaire, dans le réticulum, qui est observée pour toutes les mutations. Ce défaut montre une altération du trafic de la protéine vers la surface. Dans la littérature, l'étude de mutations sur le domaine dCache_1 en N-terminal des sous-unités $\alpha 2\delta$ -2 et $\alpha 2\delta$ -1 a présenté le même défaut d'adressage (Tran-Van-Minh and Dolphin, 2010).

L'analyse bio-informatique de nos mutations, très conservées sur les différents $\alpha 2\delta$, a montré qu'elles étaient à proximité immédiates de ce domaine et dans le motif MIDAS. Le positionnement des mutations sur la structure 3D de la protéine $\alpha 2\delta$ -4 montre qu'elles pourraient altérer la poche formée par le domaine dCache_1 qui est un des motifs d'interaction des $\alpha 2\delta$ avec leurs cibles protéiques

Cette conséquence de la mutation sur la protéine, en dehors de ses fonctions au sein du canal calcique, est très intéressante. Dans la littérature, la recherche sur les fonctions des $\alpha 2\delta$ en dehors du canal calcique est en pleine émergence et peut avoir des implications pathologiques. Ainsi, les souris KO *CACNA2D4* montrent un défaut de la localisation du canal chlore ANO1 qui est impliqué dans la myogenèse chez la souris (Yuan et al., 2022). ANO1 est aussi impliqué dans l'accélération des potentiels d'action issus de la jonction neuromusculaire d'action (Dayal et al., 2019). Comme perspective dans le cadre de ce projet, une étude poussée de ANO1 chez les souris KI-S306 serait donc très intéressante pour mieux comprendre les événements musculaires.

L'étude de l'impact des mutations sur les fonctions de $\alpha 2\delta$ -4, sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants a montré que : 1) $\alpha 2\delta$ -4 WT favorise l'augmentation de la densité de canaux Cav1.1 à la surface, mais 2) aucune des mutations n'altère ce processus et 3) l'interaction avec le canal Cav1.1 est maintenue même en présence des mutations. L'absence d'altérations drastiques du DHPR est cohérente avec le phénotype des patients HE qui ne sont pas myopathes.

Cependant, l'étude des propriétés électrophysiologiques par l'équipe du Texas montre des défauts dans la sensibilité au voltage et au pH du canal DHPR. La mutation p.(Ser306Arg) rend le canal plus sensible à l'inactivation dépendant du voltage et moins sensible à l'inactivation protons dépendante.

Conclusion et perspectives

En résumé, cette partie de la thèse a permis de montrer le caractère pathogène des mutations avec des altérations de la localisation membranaire et des défauts des propriétés biophysiques, mais tout en gardant le canal DHPR fonctionnel en accord avec le phénotype des patients HE.

Etude de l'expression de *CACNA2D4* dans le muscle squelettique

Face aux défauts musculaires du modèle KI-S306R *CACNA2D4* et la présence de test de contracture *in vitro* du muscle squelettique anormal chez les patients porteurs des mutations, la question de l'expression musculaire de *CACNA2D4* s'est posée.

Pour répondre à cette question, j'ai étudié le transcrite et l'expression d'une protéine $\alpha\delta$ -4 dans le muscle squelettique de souris.

J'ai pu montrer la présence d'un transcrite *CACNA2D4* présent dans le quadriceps, le soleus, l'EDL et le tibialis. L'étude de ce transcrite par RACE PCR a révélé une nouvelle isoforme avec un épissage alternatif. Ainsi, ce nouveau transcrite musculaire *CACNA2D4* manque les exons 1, 2 et 16. Cela entraîne une perte du peptide signal codé par l'exon 1 et un raccourcissement du domaine dCache_1 en C-terminal.

L'étude du transcrite en modèle de surexpression dans des HEK293T montre l'expression d'une protéine de 117 kDa et qui malgré l'absence d'un peptide signal est membranaire. Les études fonctionnelles montrent qu'elle interagit avec le canal Cav1.1 et favorise l'adressage à la surface du canal. L'étude de la sensibilité au voltage montre que ce transcrite déplace le potentiel d'activation vers des potentiels plus dépolarisés mais régule la sensibilité au pH autant que $\alpha\delta$ -4 FL et $\alpha\delta$ -1.

Malgré les différences importantes avec la forme canonique, les fonctions régulatrices de la nouvelle isoforme musculaire sur le canal calcique DHPR sont conservées.

L'étude de l'expression endogène de la protéine $\alpha\delta$ -4 dans le muscle squelettique a été faite sur des homogénats et des fractions microsomales de muscle chez la souris.

L'étude de la protéine dans le muscle s'est heurtée au manque de spécificité de l'anticorps. On note de nombreuses bandes non-spécifiques rendant difficile la mise en évidence de la protéine. Cependant, on a mis en évidence ce transcrite dans l'œil où une forme courte de la protéine avec

Conclusion et perspectives

une absence de l'exon 2 est présente. Ces résultats semblent montrer que ce nouveau transcrit musculaire donne lieu à une expression endogène d'une protéine $\alpha 2\delta$ -4.

Pour pallier les difficultés techniques d'une identification par western blot, une étude par spectrométrie de masse est en cours.

Conclusion

En conclusion, ces résultats permettent d'impliquer *CACNA2D4* dans la survenue de l'hyperthermie d'effort et constituent une avancée importante pour une meilleure compréhension de la maladie et jettent les bases d'un dépistage génétique chez les personnes à risque. Les études cellulaires montrent que l'altération de l'homéostasie calcique musculaire pourrait être un point de départ étiologique. Néanmoins, d'autres mécanismes pourraient entrer en jeu. Une atteinte centrale pourrait être investiguée étant donné l'expression neuronale de *CACNA2D4*. La sévérité de l'épisode de rhabdomyolyse observée, ouvre la porte à l'étude des mécanismes qui sous-tendent l'intégrité de la membrane musculaire comme l'inflammation, la ferroptose, le stress oxydatif ou encore les voies de l'énergie cellulaire et du métabolisme.

Avec cette étude, on valide l'existence d'une prédisposition génétique dans l'hyperthermie d'effort, mais la prévalence de 10% du gène *CACNA2D4* dans la cohorte indique que d'autres gènes pourraient être impliqués comme *ASPH* ou *TRPV1* identifiés récemment. Des études sur de plus grosses cohortes seront aussi nécessaires pour identifier d'autres gènes dans la voie du calcium intracellulaire.

Annexes

Annexe 1 : Amorces utilisées

	Amorces	Utilisation
F	CCTTCCTGGGAACCCGGGCTGGCCTTCTAAGAAGAAGC	Reconstruction des transcrits issus du pRACE
R	TTAGAAGGCCAGCCCTCACCACAGAAGCTGGGGTG	
F	TACCGAGCTCGGATCACATGGGGATGTGAAGGCAGAC	Transfert dans pcDNA3.1 pour l'isoforme musculaire
R	CTGGACTAGTGGATCTCACCACAGAAGCTGGGGTG	
F	TAC CGA GCT CGG ATC TGC CTT CCC CTT TGA TCA CCT G	Transfert dans pcDNA3.1 pour l'isoforme canonique
R	TACCGAGCTCGGATCAGAACAACCATGGAGGGTTGACC	
F	ATACGACGTTCCGGACTACGCAACATCAGAGGCACAGAGC	Insertion tag HA
R	TCCGGAACGTCGTATGGATAGAAGAGCCGGCTGTCCAT	
F	TTA AAC TAC GGG ATC GCC ACC ATG GTC TGT GGC	Transfert de CACNA2D4 dans pWPXLd
R	CTA GTC CCG GGA ATT TCA CCG CAG GAG TTG GGG	
R	GATTACGCCAAGCTTGCAATGGCCGTCTTCCCATCCACG GTC	5' RACE PCR
F	GATTACGCCAAGCTTAGTCAGAGCCTGGCGTGGATGTGG CCTT	3' RACE PCR
F	GGACAGCAGTGTGGACCTCCCT	qPCR exon 1- 2
R	AGAGGAACTGTGGTCTGGCCCC	
F	AAC ACA GCT CCA CCA CTG AG	off target intron Abcc9
R	CTT CCC CAA CTC TGA GGC TG	
F	CAT GTG ACC CTG GGG AAG AC	off target intron Slc6a1
R	GTA CGC TCC AGC TGC CAT AT	
F	AAG GGT GTG TCG TGG GAT TC	off target Exon Arl8b
R	CAC CAA AAC GCA ACG TGG AA	
F	GGT GGG CAC TAG CTT CAA CT	off target Creb5[Tril/Gm16499]
R	TCC ACA GGC ACC TCC TCT TA	
	GGACATTAGCGGCAGCATGA	ARN guide pour souris S305R
	C*G*C*GATGATGTTACGAAGTCGTTCTCTCCCAGGGTG TCCAATATGGTGGTAATGGTGTGCTTGGCGATAGCCATC CTCAGCCCCCTTCATGgatCCcCTAATGTCCACCAGAATTA CGATGTCTTTGGGA*G*A*T	ssODN S305R
F	GCTGAGGATGGCTATCGCCA	PCR CACNA2D4
R	CCTCTGTCCAGATGATGTCGT	

Annexe 2 : Conditions de PCR**Génotypage souris S306R CACNA2D4**

Amorces

F CAG CCT CCA TGT CCA GGG GTC A

R ACA TGG CCT CCA TCC TTG GGC T

- Mix PCR

Econo Taq PLUS GREEN 2X 12,5µl

Amorces F/R 1+1 µL

DNA 2,5µL

Qsp H₂O 20µL

- Condition de PCR

	Température °C	Temps
Dénaturation initiale	94	2 minutes
Dénaturation	94	15 sec
Hybridation	66	30 sec
Extension	72	1 minutes
Extension finale	72	5 minutes
NB de cycles	25	

- Digestion BamHI

Digestion de 2,5µl produit PCR

BamHI (NEB) 1µl

NEBuffer3.1 10X 5µl

Qsp 50µl H₂O

37°C 1H au thermocycleur

Annexes

Etude transcrit *CACNA2D4* par PCR

- Mix PCR

Econo Taq PLUS GREEN 2X 12,5µl

Amorces F/R 1+1 µL

cDNA 100ng

Qsp H₂O 20µL

- Condition de PCR

	Température °C	Temps
Dénaturation initiale	94	2 minutes
Dénaturation	94	15 sec
Hybridation	66	30 sec
Extension	72	1 minutes
Extension finale	72	5 minutes
NB de cycles	32	

RACE PCR

- Master Mix

15.5 µl PCR-Grade H₂O

25.0 µl 2X SeqAmp Buffer

1.0 µl SeqAmp DNA Polymerase

Component 5'- or 3'-RACE	Sample	UPM only
5'- or 3'-RACE-Ready cDNA	2.5 µl	2.5 µl
10X UPM	5 µl	5 µl
5' or 3' GSP (10 µM)	1 µl	
H ₂ O	1 µl	5 µl
Master Mix	41.5 µl	41.5 µl

Annexes

- Conditions de PCR

94°C 30 sec	5 cycles
72°C 3 min	
94°C 30 sec	5 cycles
70°C 30 sec	
72°C 3 min	
94°C 30 sec	25 cycles
68°C 30 sec	
72°C 3 min	

Clonage

- Mix PCR

2X Phusion Plus PCR Master Mix 10µL

F/R Amorces 1+1µL

DNA 10ng

Qsp H2O 20µL

- Conditions PCR

	Température °C	Temps
Dénaturation initiale	98	30 sec
Dénaturation	98	10 sec
Hybridation	65	30 sec
Extension	72	90 sec
Extension finale	72	5 minutes
NB de cycles	32	

Annexe 3 : Plasmides utilisés dans les études de surexpression

Plasmides	Gene	Tag	Promoteur
Lat Alpha2 delta-1 HA pMT2 WT	CACNA2D1	HA	SV40
uman Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 WT	CACNA2D4	HA	CMV
uman Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 c.649G>T	CACNA2D4	HA	CMV
uman Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 c.748G>C	CACNA2D4	HA	CMV
uman Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 c.897C>G	CACNA2D4	HA	CMV
uman Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 delExon4	CACNA2D4	HA	CMV
uman Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 delVal162	CACNA2D4	HA	CMV
Mouse FL Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 WT	CACNA2D4	HA	CMV
Mouse muscular Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 WT	CACNA2D4 M	HA	CMV
Mouse muscular Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 c.649G>T	CACNA2D4 M	HA	CMV
Mouse muscular Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 c.748G>C	CACNA2D4 M	HA	CMV
Mouse muscular Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 c.897C>G	CACNA2D4 M	HA	CMV
Mouse muscular Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 delExon4	CACNA2D4 M	HA	CMV
Mouse muscular Alpha2 delta-4 pcDNA3.1 delVal162	CACNA2D4 M	HA	CMV
Human turboGFP-hCACNA1S wt in pcDNA3.1	CACNA1S	turboGFP	CMV
Human Hs STAC3-Myc-FLAG_pCMV6	STAC3	FLAG	CMV
Mouse pMT2 Beta1a FLAG	CACNB1	FLAG	SV40
Mouse muscular CACNA2D4 WT_pWPXLd EF1alpha	CACNA2D4 M	HA	EF-1 α
Mouse FL CACNA2D4 WT_pWPXLd EF1alpha	CACNA2D4	HA	EF-1 α

Annexe 4 : Protocole d'isolation de cellules satellites du muscle squelettique chez la souris

Isolation of mouse primary skeletal muscle cells

- Preparation

- PBS +2% P/S (25 ml/litter). Cool down in the fridge.

- Digestion mix: 0,5 mg/ml collagenase + 3,5 mg/ml dispase in IMDM (1 ml/mouse).

(Stocks: Collagenase at 1 mg/ml in IMDM. Filter and freeze.

Dispase at 7 mg/ml in IMDM. Filter and freeze)

- Dissection medium: IMDM w Glutamax + 2% P/S + 10% FBS (50 to 100 ml/litter). Filter.

- Proliferation medium (can be prepared during the pre-plating): IMDM w Glutamax + 20% FBS + 1% P/S + 1% CEE (50 to 100 ml/litter). Filter.

- Prepare: Binocular with light

- Beaker with 70% EtOH

- Scissors

- 4 dissection forceps

- 4 - 6 cm-dishes with about 4 ml PBS + 2% P/S

- Dissection

P1-P2 mouse babies (back and lower limbs).

- Remove the head and soak blood,

- cut above the navel and remove viscera,

- sterilize muscles fast in EtOH 70%.

Annexes

- In a 6 cm dish + PBS + 2% P/S, remove the skin, the tail and the fat. Renew the dish at the middle of the dissection.

- In another 6 cm dish with PBS + 2% P/S, remove bones under a binocular. Renew the dish at the middle of the dissection. Put the first dish on ice while waiting for the second one.

- Digestion

Under the cell culture hood:

- mince muscles with scissors -> transfer in a 14 ml-falcon with a cut plastic pipet. Let muscle pieces sediment (do not throw away the plastic pipet).

- Remove PBS and add 0,5 ml/mouse digestion mix -> transfer 1 ml/ 1,5ml-ependorf tube with the plastic pipet.

- 15 min in thermomix at 37°C, 1200 rpm

- Mix solutions in a 14ml-tube. Centrifuge at 600 rpm, 5 min -> transfer the supernatant in a 14ml-tube and add the same volume of dissection medium to stop the enzymatic reaction = "Sup1". Put it at 37°C.

- Pellet digested again with the rest of digestion mix -> transfer 1 ml/ 1,5ml-ependorf tube

- 40 min in thermomix at 37°C, 1200 rpm.

- Mix solutions in a 14ml-tube. Centrifugation 600 rpm, 5 min -> transfer the supernatant in a 14ml-tube and add the same volume of dissection medium to stop the enzymatic reaction = "Sup2". (Put it at 37°C if another round is needed).

- Centrifuge again all supernatants at 600 rpm, 5 min,

- recover supernatants in a 50 ml-tube,

- centrifuge supernatant 1300 rpm, 5 min,

- pellet resuspended with 2 ml dissection medium / mouse.

- Fibroblasts' removal (pre-plating plates)

Annexes

- Prepare 10cm-dishes (1 / 2 mice) with 4 ml dissection medium.
- Put 4 ml cells/dish through a 40 um-cell strainer. Wash the strainer with 2 ml dissection medium. Homogenize.

Alternatively,

- Prepare 15 cm-dishes (4 mice) with 10 ml dissection medium and put 2 ml cells/dish through a 40 um-cell strainer. Wash the strainer with 2 ml dissection medium. Homogenize.
- 3-4h at 37°C

- Preparation of matrigel plates

- Prepare plates: 1 10 cm-diameter dish / mouse,
- Per dish: 3 ml IMDM (w/ serum) + 2% P/S + matrigel 1:100

Alternatively,

- Prepare plates: 1 15 cm-diameter dish / 2 mice,
- Per dish: 7 ml IMDM (w/ serum) + 2% P/S + matrigel 1:100
- 1h at RT (3h at 37°C is fine also)

(Prepare proliferation medium)

- Cell spreading

- Recover cell supernatant from pre-plating plates,
- centrifuge at 1500 rpm, 10 min, 4°C. Remove supernatant.
- Pellet resuspended with 1 ml proliferation medium / mouse,
- remove matrigel,
- wash PBS 1X,
- plate cells (1 ml/ dish) and add 9 ml proliferation medium -> cell incubator
- Change medium the next morning with proliferation medium.

Annexes

- Freeze 3 or 4 days after plating.

Références bibliographiques

Bibliographie

- Abriat, A., Brosset, C., Bréigeon, M., Sagui, E., 2014. Report of 182 Cases of Exertional Heatstroke in the French Armed Forces. *Military Medicine* 179, 309–314. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-13-00315>
- al-Mashhadani, S.A., Gader, A.G., al Harthi, S.S., Kangav, D., Shaheen, F.A., Bogus, F., 1994. The coagulopathy of heat stroke: alterations in coagulation and fibrinolysis in heat stroke patients during the pilgrimage (Haj) to Makkah. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5, 731–736. <https://doi.org/10.1097/00001721-199410000-00009>
- Alele, F.O., Malau-Aduli, B.S., Malau-Aduli, A.E.O., J. Crowe, M., 2020. Epidemiology of Exertional Heat Illness in the Military: A Systematic Review of Observational Studies. *IJERPH* 17, 7037. <https://doi.org/10.3390/ijerph17197037>
- Allard, B., 2018. From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: Basic aspects and related clinical disorders. *Neuromuscular Disorders* 28, 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.03.004>
- Alzahrani, J.M., Murray, K.O., Gambino, B.J., Garcia, C.K., Sheikh, L.H., Cusack, K.J., Laitano, O., Clanton, T.L., 2022. Neuromotor deficits and altered physiological responses to repeated exertional heat stroke exposures in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 323, R951–R961. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00152.2022>
- Anantharaman, V., Aravind, L., 2000. Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem Sci* 25, 535–537. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01672-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01672-8)
- Andonian, B.J., Johannemann, A., Hubal, M.J., Poher, D.M., Koss, A., Kraus, W.E., Bartlett, D.B., Huffman, K.M., 2021. Altered skeletal muscle metabolic pathways, age, systemic inflammation, and low cardiorespiratory fitness associate with improvements in disease activity following high-intensity interval training in persons with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 23, 187. <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02570-3>
- Appenzeller, J. Lamotte, A. Coon, O., Guillaume, Elizabeth, 2022. Thermoregulation - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323955843000099?via%3Dihub> (accessed 12.7.23).
- Armstrong, L.E., 2003. Exertional Heat Illnesses. *Human Kinetics*.
- Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., Rosado, J.A., Smani, T., 2018. The Complex Role of Store Operated Calcium Entry Pathways and Related Proteins in the Function of Cardiac, Skeletal and Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Physiol* 9, 257.
- Ba-Abbad, R., Arno, G., Carss, K., Stirrups, K., Penkett, C.J., Moore, A.T., Michaelides, M., Raymond, F.L., Webster, A.R., Holder, G.E., 2016. Mutations in CACNA2D4 Cause Distinctive Retinal Dysfunction in Humans. *Ophthalmology* 123, 668-671.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2015.09.045>
- Bacchi, N., Messina, A., Burtscher, V., Dassi, E., Provenzano, G., Bozzi, Y., Demontis, G.C., Koschak, A., Denti, M.A., Casarosa, S., 2015. A New Splicing Isoform of Cacna2d4 Mimicking the Effects of c.2451insC Mutation in the Retina: Novel Molecular and

Bibliographie

- Electrophysiological Insights. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56, 4846–4856. <https://doi.org/10.1167/iops.15-16410>
- Bahaidarah, F., Alasmari, H.G.M., Alkhamis, A.A., Alshaqaiq, A.I., Alasmary, F.A.H., Alrashed, Y.A.A., Alkhamis, M.S., Alwadani, M.H., Alabbadi, A.W., Alshebli, D.A., Alshahrani, A.A., Khalifah, M.F.A., 2023. Emergent Management of Malignant Hyperthermia: Review article. *Saudi Medical Horizons Journal* 3, 36–40. <https://doi.org/10.54293/smhj.v3i1.62>
- Baig, S.M., Koschak, A., Lieb, A., Gebhart, M., Dafinger, C., Nürnberg, G., Ali, A., Ahmad, I., Sinnegger-Brauns, M.J., Brandt, N., Engel, J., Mangoni, M.E., Farooq, M., Khan, H.U., Nürnberg, P., Striessnig, J., Bolz, H.J., 2011. Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14, 77–84. <https://doi.org/10.1038/nn.2694>
- Barclay, J., Rees, M., 2000. Genomic organization of the mouse and human $\alpha 2\delta 2$ voltage-dependent calcium channel subunit genes. *Mammalian Genome* 11, 1142–1144. <https://doi.org/10.1007/s003350010211>
- Beam, T.A., Loudermilk, E.F., Kisor, D.F., 2017. Pharmacogenetics and pathophysiology of *CACNA1S* mutations in malignant hyperthermia. *Physiological Genomics* 49, 81–87. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00126.2016>
- Bechtel, S., Rosenfelder, H., Duda, A., Schmidt, C.P., Ernst, U., Wellenreuther, R., Mehrle, A., Schuster, C., Bahr, A., Blöcker, H., Heubner, D., Hoerlein, A., Michel, G., Wedler, H., Köhrer, K., Ottenwälder, B., Poustka, A., Wiemann, S., Schupp, I., 2007. The full-ORF clone resource of the German cDNA Consortium. *BMC Genomics* 8, 399. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-399>
- Beeson, K.A., Beeson, R., Westbrook, G.L., Schnell, E., 2020. $\alpha 2\delta 2$ Protein Controls Structure and Function at the Cerebellar Climbing Fiber Synapse. *J Neurosci* 40, 2403–2415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1514-19.2020>
- Bendahan, D., Kozak-Ribbens, G., Confort-Gouny, S., Ghattas, B., Figarella-Branger, D., Aubert, M., Cozzone, P.J., 2001. A Noninvasive Investigation of Muscle Energetics Supports Similarities Between Exertional Heat Stroke and Malignant Hyperthermia. *Anesthesia & Analgesia* 93, 683. <https://doi.org/10.1097/00000539-200109000-00030>
- Bendahan, D., Kozak-Ribbens, G., Rodet, L., Confort-Gouny, S., Cozzone, P.J., 1998. ³¹Phosphorus Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Muscular Metabolic Anomalies in Patients with Malignant Hyperthermia: Application to Diagnosis. *Anesthesiology* 88, 96–107. <https://doi.org/10.1097/00000542-199801000-00017>
- Berridge, M.J., 2006. Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium, Calcium microdomains and the fine control of cell function* 40, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.09.002>
- Bosson, C., 2020. Caractérisation génétique des hyperthermies déclenchées (phdthesis). Université Grenoble Alpes [2020-....].
- Bosson, C., Rendu, J., Pelletier, L., Abriat, A., Chatagnon, A., Brocard, Julie, Brocard, Jacques, Figarella-Branger, D., Ducreux, S., van Coppenolle, F., Sagui, E., Marty, I., Roux-Buisson, N., Faure, J., 2020. Variations in the TRPV1 gene are associated to exertional

- heat stroke. *Journal of Science and Medicine in Sport* 23, 1021–1027. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.04.018>
- Bouchama, A., Abuyassin, B., Lehe, C., Laitano, O., Jay, O., O'Connor, F.G., Leon, L.R., 2022. Classic and exertional heatstroke. *Nat Rev Dis Primers* 8, 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00334-6>
- Bouchama, A., De Vol, E.B., 2001. Acid-base alterations in heatstroke. *Intensive Care Med* 27, 680–685. <https://doi.org/10.1007/s001340100906>
- Bourdin, B., Briot, J., Tétreault, M.-P., Sauvé, R., Parent, L., 2017. Negatively charged residues in the first extracellular loop of the L-type CaV1.2 channel anchor the interaction with the CaV α 2 δ 1 auxiliary subunit. *J Biol Chem* 292, 17236–17249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.806893>
- Bourdon, L., Canini, F., 1995. On the nature of the link between malignant hyperthermia and exertional heatstroke. *Med Hypotheses* 45, 268–270. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90116-7)
- Bricknell, M.C.M., 1995. Heat Illness - A Review of Military Experience (Part 1). *BMJ Military Health* 141, 157–166. <https://doi.org/10.1136/jramc-141-03-06>
- Brignell, J.L., Perry, M.D., Nelson, C.P., Willets, J.M., Challiss, R.A.J., Davies, N.W., 2015. Steady-State Modulation of Voltage-Gated K⁺ Channels in Rat Arterial Smooth Muscle by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and Protein Phosphatase 2B. *PLOS ONE* 10, e0121285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121285>
- Briot, J., Mailhot, O., Bourdin, B., Tétreault, M.-P., Najmanovich, R., Parent, L., 2018. A three-way inter-molecular network accounts for the CaV α 2 δ 1-induced functional modulation of the pore-forming CaV1.2 subunit. *Journal of Biological Chemistry* 293, 7176–7188. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001902>
- Buraci, Z., Yang, J., 2015. Inhibition of Voltage-Gated Calcium Channels by RGK Proteins. *Current Molecular Pharmacology* 8, 180–187.
- Byrne, C., Lee, J.K.W., Chew, S.A.N., Lim, C.L., Tan, E.Y.M., 2006. Continuous thermoregulatory responses to mass-participation distance running in heat. *Med Sci Sports Exerc* 38, 803–810. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000218134.74238.6a>
- Campiglio, M., Flucher, B.E., 2017. STAC3 stably interacts through its C1 domain with CaV1.1 in skeletal muscle triads. *Sci Rep* 7, 41003. <https://doi.org/10.1038/srep41003>
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M.W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K.M., Davies, A., Dolphin, A.C., 2005. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of 2 subunits is key to trafficking voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 11230–11235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504183102>
- Caputo, A., Piano, I., Demontis, G.C., Bacchi, N., Casarosa, S., Della Santina, L., Gargini, C., 2015. TMEM16A is associated with voltage-gated calcium channels in mouse retina and its function is disrupted upon mutation of the auxiliary α 2 δ 4 subunit. *Front Cell Neurosci* 9, 422. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00422>
- Casa, D.J., Armstrong, L.E., Carter, R., Lopez, R., McDermott, B., Scriber, K., 2010. Historical Perspectives on Medical Care for Heat Stroke, Part 1: Ancient Times Through the Nineteenth Century: A Review of the Literature. *Athletic Training & Sports Health Care* 2, 132–138. <https://doi.org/10.3928/19425864-20100428-07>

Bibliographie

- Casa, D.J., Becker, S.M., Ganio, M.S., Brown, C.M., Yeargin, S.W., Roti, M.W., Siegler, J., Blowers, J.A., Glaviano, N.R., Huggins, R.A., Armstrong, L.E., Maresh, C.M., 2007. Validity of Devices That Assess Body Temperature During Outdoor Exercise in the Heat. *J Athl Train* 42, 333–342.
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Chang, L., Daly, C., Miller, D.M., Allen, P.D., Boyle, J.P., Hopkins, P.M., Shaw, M.-A., 2019. Permeabilised skeletal muscle reveals mitochondrial deficiency in malignant hyperthermia-susceptible individuals. *Br J Anaesth* 122, 613–621. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.02.010>
- Charkoudian, N., 2016. Human thermoregulation from the autonomic perspective. *Autonomic Neuroscience, Thermoregulation* 196, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.007>
- Chen, C.-M., Hou, C.-C., Cheng, K.-C., Tian, R.-L., Chang, C.-P., Lin, M.-T., 2006. Activated protein C therapy in a rat heat stroke model*. *Critical Care Medicine* 34, 1960. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000224231.01533.B1>
- Chen, X.H., Bezprozvanny, I., Tsien, R.W., 1996. Molecular basis of proton block of L-type Ca²⁺ channels. *Journal of General Physiology* 108, 363–374. <https://doi.org/10.1085/jgp.108.5.363>
- Cheng, J., Zhou, Q., Fu, Jiewen, Wei, C., Zhang, L., Khan, M.S.S., Lv, H., Anuchapreeda, S., Fu, Junjiang, 2021. Novel compound heterozygous missense variants (c.G955A and c.A1822C) of CACNA2D4 likely causing autosomal recessive retinitis pigmentosa in a Chinese patient. *3 Biotech* 11, 208. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02761-4>
- Cheng, H., Lederer, M.R., Lederer, W.J., Cannell, M.B., 1996. Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 270, C148-159. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.270.1.C148>
- Cutcliffe, A.L., McKenna, S.L., Chandrashekar, D.S., Ng, A., Devonshire, G., Fitzgerald, R.C., O'Donovan, T.R., Mackrill, J.J., 2021. Alterations in the Ca²⁺ toolkit in oesophageal adenocarcinoma. *Explor Target Antitumor Ther* 2, 543–575. <https://doi.org/10.37349/etat.2021.00063>
- Dahimene, S., von Elsner, L., Holling, T., Mattas, L.S., Pickard, J., Lessel, D., Pilch, K.S., Kadurin, I., Pratt, W.S., Zhulin, I.B., Dai, H., Hempel, M., Ruzhnikov, M.R.Z., Kutsche, K., Dolphin, A.C., 2022. Biallelic CACNA2D1 loss-of-function variants cause early-onset developmental epileptic encephalopathy. *Brain* 145, 2721–2729. <https://doi.org/10.1093/brain/awac081>
- Dainese, M., Quarta, M., Lyfenko, A.D., Paolini, C., Canato, M., Reggiani, C., Dirksen, R.T., Protasi, F., 2009. Anesthetic-and heat-induced sudden death in calsequestrin-1-knockout mice. *The FASEB Journal* 23, 1710–1720. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121335>
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C.S., Pratt, W.S., Dolphin, A.C., 2010. The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1654–1659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908735107>

Bibliographie

- Dávila, A.J.L., 2014. Actualidad en termorregulación. *Pensar en Movimiento: Revista de Ciencias del Ejercicio y la Salud* 12, 1–36. <https://doi.org/10.15517/pensarmov.v12i2.14918>
- Dayal, A., Ng, S.F.J., Grabner, M., 2019. Ca²⁺-activated Cl⁻ channel TMEM16A/ANO1 identified in zebrafish skeletal muscle is crucial for action potential acceleration. *Nat Commun* 10, 115. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07918-z>
- de la Bastiaie, P., Poujol, C., 1978. [Malignant hyperthermia of effort or “heat stroke” (author’s transl)]. *Nouv Presse Med* 7, 2381–2385.
- DeGroot, D.W., O’Connor, F.G., Roberts, W.O., 2022. Exertional heat stroke: an evidence based approach to clinical assessment and management. *Experimental Physiology* 107, 1172–1183. <https://doi.org/10.1113/EP090488>
- DeHan, P.J., Warren, K.C., Buchanan, B.K., DeGroot, D.W., 2023. Gastrointestinal Associated Exertional Heat Stroke. *Current Sports Medicine Reports* 22, 117. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000001054>
- Denborough, M., 1988. Malignant Hyperthermia: A Review, in: Williams, C.H. (Ed.), *Experimental Malignant Hyperthermia*. Springer, New York, NY, pp. 141–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3738-9_12
- Deren, T.M., Coris, E.E., Casa, D.J., DeMartini, J.K., Bain, A.R., Walz, S.M., Jay, O., 2014. Maximum heat loss potential is lower in football linemen during an NCAA summer training camp because of lower self-generated air flow. *J Strength Cond Res* 28, 1656–1663. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000427>
- Divine, J.G., Daggy, M.W., Dixon, E.E., LeBlanc, D.P., Okragly, R.A., Hasselfeld, K.A., 2018. Case Series of Exertional Heat Stroke in Runners During Early Spring: 2014 to 2016 Cincinnati Flying Pig Marathon. *Current Sports Medicine Reports* 17, 151–158. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000485>
- Dolphin, A.C., 2018a. Voltage-gated calcium channels: Their discovery, function and importance as drug targets. *Brain and Neuroscience Advances* 2, 239821281879480. <https://doi.org/10.1177/2398212818794805>
- Dolphin, A.C., 2018b. Voltage-gated calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits: an assessment of proposed novel roles. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16104.1>
- Dolphin, A.C., 2016. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology: Voltage-gated calcium channels. *J Physiol* 594, 5369–5390. <https://doi.org/10.1113/JP272262>
- Dolphin, A.C., 2013. The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 1541–1549. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.019>
- Dolphin, A.C., 2012. Calcium channel auxiliary $\alpha_2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* 13, 542–555. <https://doi.org/10.1038/nrn3311>
- Douglas, L., Davies, A., Wratten, J., Dolphin, A.C., 2006. Do voltage-gated calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits require proteolytic processing into α_2 and δ to be functional? *Biochemical Society Transactions* 34, 894–898. <https://doi.org/10.1042/BST0340894>
- Duke, A.M., Hopkins, P.M., Halsall, P.J., Steele, D.S., 2006. Mg²⁺ dependence of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum induced by sevoflurane or halothane in skeletal muscle from humans susceptible to malignant hyperthermia. *BJA: British Journal of Anaesthesia* 97, 320–328. <https://doi.org/10.1093/bja/ael179>

Bibliographie

- Dulhunty, A.F., Wei-LaPierre, L., Casarotto, M.G., Beard, N.A., 2017. Core skeletal muscle ryanodine receptor calcium release complex. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 44, 3–12. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12676>
- Durham, W.J., Aracena-Parks, P., Long, C., Rossi, A.E., Goonasekera, S.A., Boncompagni, S., Galvan, D.L., Gilman, C.P., Baker, M., Shirokova, N., Protasi, F., Dirksen, R., Hamilton, S.L., 2008. RyR1 S-Nitrosylation Underlies Environmental Heat Stroke and Sudden Death in Y522S RyR1 Knock-in Mice. *Cell* 133, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.042>
- Echaniz-Laguna, A., Biancalana, V., Böhm, J., Tranchant, C., Mandel, J.-L., Laporte, J., 2013. Adult centronuclear myopathies: A hospital-based study. *Revue Neurologique, Pathologie musculaire / Muscular disease* 169, 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2012.12.006>
- Edjiu, N., Gutstein, H.B., 2023. Malignant Hyperthermia in Children, in: Abd-Elseyed, A., Abd-Elseyed, A. (Eds.), *Advanced Anesthesia Review*. Oxford University Press, p. 0. <https://doi.org/10.1093/med/9780197584521.003.0267>
- Endo, Y., Groom, L., Celik, A., Kraeva, N., Lee, C.S., Jung, S.Y., Gardner, L., Shaw, M.-A., Hamilton, S.L., Hopkins, P.M., Dirksen, R.T., Riazi, S., Dowling, J.J., 2022. Variants in ASPH cause exertional heat illness and are associated with malignant hyperthermia susceptibility. *Nat Commun* 13, 3403. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31088-8>
- Elliott, A.C., 2001. Recent developments in non-excitable cell calcium entry. *Cell Calcium* 30, 73–93. <https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0215>
- Eckhardt, J., Ruiz, A., Koenig, S., Frieden, M., Meier, H., Schmidt, A., Treves, S., Zorzato, F., 2023. Quantitative proteomic analysis of skeletal muscles from wild-type and transgenic mice carrying recessive Ryr1 mutations linked to congenital myopathies. *eLife* 12, e83618. <https://doi.org/10.7554/eLife.83618>
- Feriotto, G., Finotti, A., Breveglieri, G., Treves, S., Zorzato, F., Gambari, R., 2006. Multiple levels of control of the expression of the human A beta H-J-J locus encoding aspartyl-beta-hydroxylase, junctine, and junctate. *Ann N Y Acad Sci* 1091, 184–190. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.065>
- Filep, E.M., Murata, Y., Endres, B.D., Kim, G., Stearns, R.L., Casa, D.J., 2020. Exertional Heat Stroke, Modality Cooling Rate, and Survival Outcomes: A Systematic Review. *Medicina* 56, 589. <https://doi.org/10.3390/medicina56110589>
- Fortes, M.B., Di Felice, U., Dolci, A., Junglee, N.A., Crockford, M.J., West, L., Hillier-Smith, R., Macdonald, J.H., Walsh, N.P., 2013. Muscle-damaging exercise increases heat strain during subsequent exercise heat stress. *Med Sci Sports Exerc* 45, 1915–1924. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318294b0f8>
- Fourest-Lieuvin, A., Rendu, J., Osseni, A., Pernet-Gallay, K., Rossi, D., Oddoux, S., Brocard, J., Sorrentino, V., Marty, I., Fauré, J., 2012. Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J Cell Sci* 125, 3443–3453. <https://doi.org/10.1242/jcs.100958>
- Frontera, W.R., Ochala, J., 2015. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 96, 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

- Fuller-Bicer, G.A., Varadi, G., Koch, S.E., Ishii, M., Bodi, I., Kadeer, N., Muth, J.N., Mikala, G., Petrashevskaya, N.N., Jordan, M.A., Zhang, S.-P., Qin, N., Flores, C.M., Isaacsohn, I., Varadi, M., Mori, Y., Jones, W.K., Schwartz, A., 2009. Targeted disruption of the voltage-dependent calcium channel α_2/δ_1 -subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H117-124. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00122.2009>
- Gach, M.P., Cherednichenko, G., Haarmann, C., Lopez, J.R., Beam, K.G., Pessah, I.N., Franzini-Armstrong, C., Allen, P.D., 2008. $\alpha_2\delta_1$ dihydropyridine receptor subunit is a critical element for excitation-coupled calcium entry but not for formation of tetrads in skeletal myotubes. *Biophys J* 94, 3023–3034. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.118893>
- Gamage, P.J., Fortington, L.V., Finch, C.F., 2020. Epidemiology of exertional heat illnesses in organised sports: A systematic review. *J Sci Med Sport* 23, 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.02.008>
- Gandini, M.A., Zamponi, G.W., 2022. Voltage-gated calcium channel nanodomains: molecular composition and function. *The FEBS Journal* 289, 614–633. <https://doi.org/10.1111/febs.15759>
- Garcia, C.K., Mattingly, A.J., Robinson, G.P., Laitano, O., King, M.A., Dineen, S.M., Leon, L.R., Clanton, T.L., 2018a. Sex-dependent responses to exertional heat stroke in mice. *J Appl Physiol* (1985) 125, 841–849. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00220.2018>
- Garcia, C.K., Mattingly, A.J., Robinson, G.P., Laitano, O., King, M.A., Dineen, S.M., Leon, L.R., Clanton, T.L., 2018b. Sex-dependent responses to exertional heat stroke in mice. *J Appl Physiol* (1985) 125, 841–849. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00220.2018>
- Garcia, C.K., Robinson, G.P., Gambino, B.J., Rua, M.T., Laitano, O., Clanton, T.L., 2022. The impact of castration on physiological responses to exertional heat stroke in mice. *PLoS One* 17, e0275715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275715>
- Garcia, C.K., Sheikh, L.H., Iwaniec, J.D., Robinson, G.P., Berlet, R.A., Mattingly, A.J., Murray, K.O., Laitano, O., Clanton, T.L., 2020. Effects of Ibuprofen during Exertional Heat Stroke in Mice. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 52, 1870–1878. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002329>
- García, K., Nabhani, T., García, J., 2008. The calcium channel α_2/δ_1 subunit is involved in extracellular signalling. *J Physiol* 586, 727–738. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147959>
- Gerhard, D.S., Wagner, L., Feingold, E.A., Shenmen, C.M., Grouse, L.H., Schuler, G., Klein, S.L., Old, S., Rasooly, R., Good, P., Guyer, M., Peck, A.M., Derge, J.G., Lipman, D., Collins, F.S., Jang, W., Sherry, S., Feolo, M., Misquitta, L., Lee, E., Rotmistrovsky, K., Greenhut, S.F., Schaefer, C.F., Buetow, K., Bonner, T.I., Haussler, D., Kent, J., Kiekhaus, M., Furey, T., Brent, M., Prange, C., Schreiber, K., Shapiro, N., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Hsie, F., Driscoll, T., Soares, M.B., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Piao, Y., Dudekula, D.B., Ko, M.S.H., Kawakami, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Gruber, C.E., Smith, M.R., Simmons, B., Moore, T., Waterman, R., Johnson, S.L., Ruan, Y., Wei, C.L., Mathavan, S., Gunaratne, P.H., Wu, J., Garcia, A.M., Hulyk, S.W., Fuh, E., Yuan, Y., Sneed, A., Kowis, C., Hodgson, A., Muzny, D.M., McPherson, J., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madari, A., Young, A.C., Wetherby, K.D., Granite, S.J., Kwong, P.N., Brinkley, C.P., Pearson,

- R.L., Bouffard, G.G., Blakesly, R.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S.N., Griffith, M., Griffith, O.L., Krzywinski, M.I., Liao, N., Morin, R., Palmquist, D., Petrescu, A.S., Skalska, U., Smailus, D.E., Stott, J.M., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J.M., Holt, R.A., Baross, A., Marra, M.A., Clifton, S., Makowski, K.A., Bosak, S., Malek, J., MGC Project Team, 2004. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res* 14, 2121–2127. <https://doi.org/10.1101/gr.2596504>
- Giersch, G.E.W., Taylor, K.M., Caldwell, A.R., Charkoudian, N., 2023. Body mass index, but not sex, influences exertional heat stroke risk in young healthy men and women. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 324, R15–R19. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00168.2022>
- Gong, D., Yan, N., Ledford, H.A., 2021. Structural Basis for the Modulation of Ryanodine Receptors. *Trends Biochem Sci* 46, 489–501. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.11.009>
- Gonzalez, J.T., Rumbold, P.L.S., Stevenson, E.J., 2012. Effect of calcium intake on fat oxidation in adults: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Obesity Reviews* 13, 848–857. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01013.x>
- González-Alonso, J., Calbet, J.A., Nielsen, B., 1998. Muscle blood flow is reduced with dehydration during prolonged exercise in humans. *J Physiol* 513 (Pt 3), 895–905. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.895ba.x>
- Gregory, H., Weant, K.A., 2021. Pathophysiology and Treatment of Malignant Hyperthermia. *Advanced Emergency Nursing Journal* 43, 102. <https://doi.org/10.1097/TME.0000000000000344>
- Groom, L., Muldoon, S.M., Tang, Z.Z., Bandom, B.W., Bayarsaikhan, M., Bina, S., Lee, H.-S., Qiu, X., Sambuughin, N., Dirksen, R.T., 2011. Identical de novo Mutation in the Type 1 Ryanodine Receptor Gene Associated with Fatal, Stress-induced Malignant Hyperthermia in Two Unrelated Families. *Anesthesiology* 115, 938–945. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182320068>
- Golini, L., Chouabe, C., Berthier, C., Cusimano, V., Fornaro, M., Bonvallet, R., Formoso, L., Giacomello, E., Jacquemond, V., Sorrentino, V., 2011. Junctophilin 1 and 2 proteins interact with the L-type Ca²⁺ channel dihydropyridine receptors (DHPRs) in skeletal muscle. *J Biol Chem* 286, 43717–43725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292755>
- Grzybowski, M., Schänzer, A., Pepler, A., Heller, C., Neubauer, B.A., Hahn, A., 2017. Novel STAC3 Mutations in the First Non-Amerindian Patient with Native American Myopathy. *Neuropediatrics* 48, 451–455. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601868>
- Gumerov, V.M., Andrianova, E.P., Matilla, M.A., Page, K.M., Monteagudo-Cascales, E., Dolphin, A.C., Krell, T., Zhulin, I.B., 2022. Amino acid sensor conserved from bacteria to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2110415119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110415119>
- Hanna, A.D., Lee, C.S., Babcock, L., Wang, H., Recio, J., Hamilton, S.L., 2021. Pathological mechanisms of vacuolar aggregate myopathy arising from a Casq1 mutation. *FASEB J* 35, e21349. <https://doi.org/10.1096/fj.202001653RR>

- Hargreaves, M., Spriet, L.L., 2020. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nat Metab* 2, 817–828. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0251-4>
- He, S.-X., Li, R., Yang, H.-H., Wang, Z.-Q., Peng, Y.-M., Huang, J.-H., Ma, Q., 2020. Optimization of a Rhabdomyolysis Model in Mice With Exertional Heat Stroke Mouse Model of EHS-Rhabdomyolysis. *Front. Physiol.* 11, 642. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00642>
- Hernández-Ochoa, E.O., Pratt, S.J.P., Lovering, R.M., Schneider, M.F., 2016. Critical Role of Intracellular RyR1 Calcium Release Channels in Skeletal Muscle Function and Disease. *Front Physiol* 6, 420. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00420>
- Hopkins, P.M., Ellis, F.R., Halsall, P.J., 1991a. Evidence for related myopathies in exertional heat stroke and malignant hyperthermia. *THE LANCET* P1491-1492.
- Hopkins, P.M., Ellis, F.R., Halsall, P.J., 1991b. Evidence for related myopathies in exertional heat stroke and malignant hyperthermia. *THE LANCET* P1491-1492.
- Hopkins, P.M., Gupta, P.K., Bilmen, J.G., 2018. Malignant hyperthermia. *Handb Clin Neurol* 157, 645–661. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00038-0>
- Hoppe, K., Hack, G., Lehmann–Horn, F., Jurkat–Rott, K., Wearing, S., Zullo, A., Carsana, A., Klingler, W., 2016. Hypermetabolism in B–lymphocytes from malignant hyperthermia susceptible individuals. *Sci Rep* 6, 33372. <https://doi.org/10.1038/srep33372>
- Horowitz, M., 2016. Epigenetics and cytoprotection with heat acclimation. *Journal of Applied Physiology* 120, 702–710. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00552.2015>
- Hsu, Y.D., Lee, W.H., Chang, M.K., Shieh, S.D., Tsao, W.L., 1997. Blood lactate threshold and type II fibre predominance in patients with exertional heatstroke. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 62, 182–187. <https://doi.org/10.1136/jnnp.62.2.182>
- Ibarra Moreno, C.A., Hu, S., Kraeva, N., Schuster, F., Johannsen, S., Rueffert, H., Klingler, W., Heytens, L., Riazi, S., 2019. An Assessment of Penetrance and Clinical Expression of Malignant Hyperthermia in Individuals Carrying Diagnostic Ryanodine Receptor 1 Gene Mutations. *Anesthesiology* 131, 983–991. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002813>
- Ibarra Moreno, C.A., Kraeva, N., Zvaritch, E., Figueroa, L., Rios, E., Biesecker, L., Van Petegem, F., Hopkins, P.M., Riazi, S., 2020. A multi-dimensional analysis of genotype-phenotype discordance in malignant hyperthermia susceptibility. *Br J Anaesth* 125, 995–1001. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2020.07.042>
- Kadurin, I., Dahimene, S., Page, K.M., Ellaway, J.I.J., Chaggar, K., Troeberg, L., Nagase, H., Dolphin, A.C., 2022a. ADAM17 Mediates Proteolytic Maturation of Voltage-Gated Calcium Channel Auxiliary $\alpha 2\delta$ Subunits, and Enables Calcium Current Enhancement. *Function* 3, zqac013. <https://doi.org/10.1093/function/zqac013>
- Kadurin, I., Dahimene, S., Page, K.M., Ellaway, J.I.J., Chaggar, K., Troeberg, L., Nagase, H., Dolphin, A.C., 2022b. ADAM17 Mediates Proteolytic Maturation of Voltage-Gated Calcium Channel Auxiliary $\alpha 2\delta$ Subunits, and Enables Calcium Current Enhancement. *Function* 3, zqac013. <https://doi.org/10.1093/function/zqac013>
- Kadurin, I., Ferron, L., Rothwell, S.W., Meyer, J.O., Douglas, L.R., Bauer, C.S., Lana, B., Margas, W., Alexopoulos, O., Nieto-Rostro, M., Pratt, W.S., Dolphin, A.C., 2016. Proteolytic maturation of $\alpha 2\delta$ represents a checkpoint for activation and neuronal

- trafficking of latent calcium channels. *eLife* 5, e21143. <https://doi.org/10.7554/eLife.21143>
- Kerov, V., Laird, J.G., Joiner, M., Knecht, S., Soh, D., Hagen, J., Gardner, S.H., Gutierrez, W., Yoshimatsu, T., Bhattarai, S., Puthussery, T., Artemyev, N.O., Drack, A.V., Wong, R.O., Baker, S.A., Lee, A., 2018a. $\alpha 2\delta$ -4 Is Required for the Molecular and Structural Organization of Rod and Cone Photoreceptor Synapses. *J Neurosci* 38, 6145–6160. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3818-16.2018>
- Kerov, V., Laird, J.G., Joiner, M., Knecht, S., Soh, D., Hagen, J., Gardner, S.H., Gutierrez, W., Yoshimatsu, T., Bhattarai, S., Puthussery, T., Artemyev, N.O., Drack, A.V., Wong, R.O., Baker, S.A., Lee, A., 2018b. $\alpha 2\delta$ -4 Is Required for the Molecular and Structural Organization of Rod and Cone Photoreceptor Synapses. *J Neurosci* 38, 6145–6160. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3818-16.2018>
- Kerr, Z.Y., Casa, D.J., Marshall, S.W., Comstock, R.D., 2013. Epidemiology of exertional heat illness among U.S. high school athletes. *Am J Prev Med* 44, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2012.09.058>
- King, M.A., Alzahrani, J.M., Clanton, T.L., Laitano, O., 2021. A Preclinical Model of Exertional Heat Stroke in Mice. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/62738>
- Klößner, U., Isenberg, G., 1994. Calcium channel current of vascular smooth muscle cells: extracellular protons modulate gating and single channel conductance. *Journal of General Physiology* 103, 665–678. <https://doi.org/10.1085/jgp.103.4.665>
- Klugbauer, N., Lacinová, L., Marais, E., Hobom, M., Hofmann, F., 1999. Molecular diversity of the calcium channel $\alpha 2\delta$ subunit. *J Neurosci* 19, 684–691. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00684.1999>
- Klugbauer, N., Marais, E., Hofmann, F., 2003. Calcium Channel $\alpha 2\delta$ Subunits: Differential Expression, Function, and Drug Binding. *J Bioenerg Biomembr* 35, 639–647. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000008028.41056.58>
- Komiya, Y., Sawano, S., Mashima, D., Ichitsubo, R., Nakamura, M., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., Mizunoya, W., 2017. Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis. *J Muscle Res Cell Motil* 38, 163–173. <https://doi.org/10.1007/s10974-017-9468-6>
- Kozak-Ribbens, G., Aubert, M., Figarella-Branger, D., Bendahan, D., Cozzone, P.J., 1999. Muscular Metabolism and Contraction in Exertional Heat Stroke, in: Serratrice, G., Pouget, J., Azulay, J.-P. (Eds.), *Exercise Intolerance and Muscle Contracture*. Springer, Paris, pp. 93–100. https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0855-0_10
- Krafte, D.S., Kass, R.S., 1988. Hydrogen ion modulation of Ca channel current in cardiac ventricular cells. Evidence for multiple mechanisms. *J Gen Physiol* 91, 641–657. <https://doi.org/10.1085/jgp.91.5.641>
- Kruijt, N., van den Bersselaar, L.R., Hopman, M.T.E., Snoeck, M.M.J., van Rijswijk, M., Wiggers, T.G.H., Jungbluth, H., Bongers, C.C.W.G., Voermans, N.C., 2023. Exertional Heat Stroke and Rhabdomyolysis: A Medical Record Review and Patient Perspective on Management and Long-Term Symptoms. *Sports Med Open* 9, 33. <https://doi.org/10.1186/s40798-023-00570-y>
- Kuennen, M., Gillum, T., Dokladny, K., Bedrick, E., Schneider, S., Moseley, P., 2011. Thermotolerance and heat acclimation may share a common mechanism in humans. *Am*

- J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301, R524–R533. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00039.2011>
- Laitano, O., Garcia, C.K., Mattingly, A.J., Robinson, G.P., Murray, K.O., King, M.A., Ingram, B., Ramamoorthy, S., Leon, L.R., Clanton, T.L., 2020a. Delayed metabolic dysfunction in myocardium following exertional heat stroke in mice. *The Journal of Physiology* 598, 967–985. <https://doi.org/10.1113/JP279310>
- Laitano, O., Leon, L.R., Roberts, W.O., Sawka, M.N., 2019a. Controversies in exertional heat stroke diagnosis, prevention, and treatment. *Journal of Applied Physiology* 127, 1338–1348. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00452.2019>
- Laitano, O., Leon, L.R., Roberts, W.O., Sawka, M.N., 2019b. Controversies in exertional heat stroke diagnosis, prevention, and treatment. *Journal of Applied Physiology* 127, 1338–1348. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00452.2019>
- Laitano, O., Murray, K.O., Leon, L.R., 2020b. Overlapping Mechanisms of Exertional Heat Stroke and Malignant Hyperthermia: Evidence vs. Conjecture. *Sports Med* 50, 1581–1592. <https://doi.org/10.1007/s40279-020-01318-4>
- Laitano, O., Oki, K., Leon, L.R., 2021. The Role of Skeletal Muscles in Exertional Heat Stroke Pathophysiology. *Int J Sports Med* 42, 673–681. <https://doi.org/10.1055/a-1400-9754>
- Lambley, C.R., Murphy, R.M., McKenna, M.J., Lamb, G.D., 2014. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *J Physiol* 592, 1381–1395. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.269373>
- Lana, B., Schlick, B., Martin, S., Pratt, W.S., Page, K.M., Goncalves, L., Rahman, W., Dickenson, A.H., Bauer, C.S., Dolphin, A.C., 2014. Differential upregulation in DRG neurons of an $\alpha 2\delta$ -1 splice variant with a lower affinity for gabapentin after peripheral sensory nerve injury. *Pain* 155, 522–533. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.12.001>
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., Hamilton, S.L., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>
- Lavezzi, W.A., Capacchione, J.F., Muldoon, S.M., Sambuughin, N., Bina, S., Steele, D., Bandom, B.W., 2013. Case report: Death in the emergency department: an unrecognized awake malignant hyperthermia-like reaction in a six-year-old. *Anesth Analg* 116, 420–423. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182768f99>
- Lee, A., Wang, S., Williams, B., Hagen, J., Scheetz, T.E., Haeseleer, F., 2015. Characterization of Cav1.4 Complexes ($\alpha 1.4$, $\beta 2$, and $\alpha 2\delta 4$) in HEK293T Cells and in the Retina. *Journal of Biological Chemistry* 290, 1505–1521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.607465>
- Leon, L.R., 2004. Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Front Biosci* 9, 1877–1888. <https://doi.org/10.2741/1381>
- Li, Z., McKenna, Z.J., Kuennen, M.R., Magalhães, F. de C., Mermier, C.M., Amorim, F.T., 2021. The Potential Role of Exercise-Induced Muscle Damage in Exertional Heat Stroke. *Sports Med* 51, 863–872. <https://doi.org/10.1007/s40279-021-01427-8>
- Lim, C.L., 2020. Fundamental Concepts of Human Thermoregulation and Adaptation to Heat: A Review in the Context of Global Warming. *Int J Environ Res Public Health* 17, 7795. <https://doi.org/10.3390/ijerph17217795>

Bibliographie

- Lim, C.L., Byrne, C., Lee, J.K., 2008. Human thermoregulation and measurement of body temperature in exercise and clinical settings. *Ann Acad Med Singap* 37, 347–353.
- Litman, R.S., Griggs, S.M., Dowling, J.J., Riazi, S., 2018. Malignant Hyperthermia Susceptibility and Related Diseases. *Anesthesiology* 128, 159–167. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001877>
- Lopez, J.R., Kaura, V., Diggle, C.P., Hopkins, P.M., Allen, P.D., 2018. Malignant hyperthermia, environmental heat stress, and intracellular calcium dysregulation in a mouse model expressing the p.G2435R variant of RYR1. *British Journal of Anaesthesia* 121, 953–961. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2018.07.008>
- Ma, H., Cohen, S., Li, B., Tsien, R.W., 2012. Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus. *Biosci Rep* 33, 97–101. <https://doi.org/10.1042/BSR20120099>
- MacLennan, D.H., Britt, B.A., 1998. Malignant Hyperthermia and Central Core Disease, in: Jameson, J.L. (Ed.), *Principles of Molecular Medicine*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 949–954. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-726-0_104
- MacLennan, D.H., Dufft, C., Zorzato, F., Fujii, J., Phillips, M., Korneluk, R.G., Frodis, W., Britt, B.A., Wortont, R.G., 1990. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia 343, 3.
- Mamoor, S., 2022. Differential expression of CACNA2D1 in amyotrophic lateral sclerosis. <https://doi.org/10.31219/osf.io/mnxup>
- Mangoni, M.E., Couette, B., Bourinet, E., Platzer, J., Reimer, D., Striessnig, J., Nargeot, J., 2003. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5543–5548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0935295100>
- Manson, M.D., 2020. pH Sensing in *Bacillus subtilis*: a New Path to a Common Goal. *J Bacteriol* 202, e00701-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00701-19>
- Marty, I., Fauré, J., 2016. Excitation-Contraction Coupling Alterations in Myopathies. *J Neuromuscul Dis* 3, 443–453. <https://doi.org/10.3233/JND-160172>
- Mestre, T.A., Manole, A., MacDonald, H., Riazi, S., Kraeva, N., Hanna, M.G., Lang, A.E., Männikkö, R., Yoon, G., 2016. A novel KCNA1 mutation in a family with episodic ataxia and malignant hyperthermia. *Neurogenetics* 17, 245–249. <https://doi.org/10.1007/s10048-016-0486-0>
- Meyer, J.O., Dolphin, A.C., 2021. Rab11-dependent recycling of calcium channels is mediated by auxiliary subunit $\alpha\delta$ -1 but not $\alpha\delta$ -3 28.
- Michelucci, A., Paolini, C., Boncompagni, S., Canato, M., Reggiani, C., Protasi, F., 2017. Strenuous exercise triggers a life-threatening response in mice susceptible to malignant hyperthermia. *The FASEB Journal* 31, 3649–3662. <https://doi.org/10.1096/fj.201601292R>
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., 1991. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350, 398–402. <https://doi.org/10.1038/350398a0>
- Mukund, K., Subramaniam, S., 2020. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Systems Biology and Medicine* 12, e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>

Bibliographie

- Murray, K.O., Brant, J.O., Spradlin, R.A., Thome, T., Laitano, O., Ryan, T.E., Riva, A., Kladde, M.P., Clanton, T.L., 2024. Exertional heat stroke causes long-term skeletal muscle epigenetic reprogramming, altered gene expression, and impaired satellite cell function in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 326, R160–R175. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00226.2023>
- Nabhani, T., Shah, T., García, J., 2005. Skeletal Muscle Cells Express Different Isoforms of the Calcium Channel α_2/δ Subunit. *CBB* 42, 013–020. <https://doi.org/10.1385/CBB:42:1:013>
- Nakamura, K., 2011. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301, R1207–R1228. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00109.2011>
- Nakamura, K., Morrison, S.F., 2008. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* 11, 62–71. <https://doi.org/10.1038/nn2027>
- Navarro, C.S., Casa, D.J., Belval, L.N., Nye, N.S., 2017. Exertional Heat Stroke. *Current Sports Medicine Reports* 16, 304. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000403>
- Neely, A., Hidalgo, P., 2014. Structure-function of proteins interacting with the α_1 pore-forming subunit of high-voltage-activated calcium channels. *Front Physiol* 5, 209. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00209>
- Olewnik, Ł., Zielinska, N., Paulsen, F., Podgórski, M., Haładaj, R., Karauda, P., Polguy, M., 2020. A proposal for a new classification of soleus muscle morphology. *Ann Anat* 232, 151584. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2020.151584>
- Orlando Laitano, M.A.K., Lisa R. Leon, 2019. Common Misconceptions in Classic and Exertional Heat Stroke 91–112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93515-7_5
- Ording, H., Brancadoro, V., Cozzolino, S., Ellis, F.R., Glauber, V., Gonano, E.F., Halsall, P.J., Hartung, E., Heffron, J.J., Heytens, L., Kozak-Ribbens, G., Kress, H., Krivosic-Horber, R., Lehmann-Horn, F., Mortier, W., Nivoche, Y., Ranklev-Twetman, E., Sigurdsson, S., Snoeck, M., Stieglitz, P., Tegazzin, V., Urwyler, A., Wappler, F., 1997. In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. The European Malignant Hyperthermia Group. *Acta Anaesthesiol Scand* 41, 955–966. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1997.tb04820.x>
- Osilla, E.V., Marsidi, J.L., Shumway, K.R., Sharma, S., 2023. Physiology, Temperature Regulation, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Paasuke, R.T., Brownell, A.K., 1986. Serum creatine kinase level as a screening test for susceptibility to malignant hyperthermia. *JAMA* 255, 769–771.
- Page, K.M., Gumerov, V.M., Dahimene, S., Zhulin, I.B., Dolphin, A.C., 2023. The importance of cache domains in $\alpha_2\delta$ proteins and the basis for their gabapentinoid selectivity. *Channels* 17, 2167563. <https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2167563>
- Papadimas, G.K., Xirou, S., Kararizou, E., Papadopoulos, C., 2020. Update on Congenital Myopathies in Adulthood. *Int J Mol Sci* 21, 3694. <https://doi.org/10.3390/ijms21103694>
- Papapetrou, P., Ferguson, K., 2023. Malignant Hyperthermia, in: Abd-Elsayed, A., Abd-Elsayed, A. (Eds.), *Advanced Anesthesia Review*. Oxford University Press, p. 0. <https://doi.org/10.1093/med/9780197584521.003.0036>

Bibliographie

- Payen, J.-F., Bourdon, L., Reutenauer, H., Melin, B., Bas, J.-F.L., Stieglitz, P., Cure, M., 1992. Exertional heatstroke and muscle metabolism: an in vivo P-MRS study. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 24, 420.
- Périard, J.D., DeGroot, D., Jay, O., 2022. Exertional heat stroke in sport and the military: epidemiology and mitigation. *Exp Physiol* 107, 1111–1121. <https://doi.org/10.1113/EP090686>
- Periasamy, M., Maurya, S.K., Sahoo, S.K., Singh, S., Sahoo, S.K., Reis, F.C.G., Bal, N.C., 2017. Role of SERCA Pump in Muscle Thermogenesis and Metabolism. *Compr Physiol* 7, 879–890. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160030>
- Pietrobon, D., Prod'hom, B., Hess, P., 1989. Interactions of protons with single open L-type calcium channels. pH dependence of proton-induced current fluctuations with Cs⁺, K⁺, and Na⁺ as permeant ions. *J Gen Physiol* 94, 1–21. <https://doi.org/10.1085/jgp.94.1.1>
- Pirone, A., Kurt, S., Zuccotti, A., Rüttiger, L., Pilz, P., Brown, D.H., Franz, C., Schweizer, M., Rust, M.B., RübSamen, R., Friauf, E., Knipper, M., Engel, J., 2014. $\alpha 2\delta 3$ is essential for normal structure and function of auditory nerve synapses and is a novel candidate for auditory processing disorders. *J Neurosci* 34, 434–445. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3085-13.2014>
- Polster, A., Nelson, B.R., Olson, E.N., Beam, K.G., 2016. Stac3 has a direct role in skeletal muscle-type excitation–contraction coupling that is disrupted by a myopathy-causing mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 10986–10991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612441113>
- Poussel, M., Guerci, P., Kaminsky, P., Heymonet, M., Roux-Buisson, N., Faure, J., Fronzaroli, E., Chenuel, B., 2015. Exertional Heat Stroke and Susceptibility to Malignant Hyperthermia in an Athlete: Evidence for a Link? *Journal of Athletic Training* 50, 1212–1214. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-50.12.01>
- Prosser, B.L., Hernández-Ochoa, E.O., Schneider, M.F., 2011. S100A1 AND CALMODULIN REGULATION OF RYANODINE RECEPTOR IN STRIATED MUSCLE. *Cell Calcium* 50, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.06.001>
- Protasi, F., Paolini, C., Dainese, M., 2009. Calsequestrin-1: a new candidate gene for malignant hyperthermia and exertional/environmental heat stroke. *J Physiol* 587, 3095–3100. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.171967>
- Punetha, J., Karaca, E., Gezdirici, A., Lamont, R.E., Pehlivan, D., Marafi, D., Appendino, J.P., Hunter, J.V., Akdemir, Z.C., Fatih, J.M., Jhangiani, S.N., Gibbs, R.A., Innes, A.M., Posey, J.E., Lupski, J.R., 2019. Biallelic CACNA2D2 variants in epileptic encephalopathy and cerebellar atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* 6, 1395–1406. <https://doi.org/10.1002/acn3.50824>
- Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M.-L., Codd, E.E., D'Andrea, M.R., 2002. Molecular Cloning and Characterization of the Human Voltage-Gated Calcium Channel $\alpha_2\delta_4$ Subunit 12.
- Riazi, S., Kraeva, N., Hopkins, P.M., 2018. Malignant Hyperthermia in the Post-Genomics Era: New Perspectives on an Old Concept. *Anesthesiology* 128, 168–180. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001878>
- Roberts, W.O., Armstrong, L.E., Sawka, M.N., Yeargin, S.W., Heled, Y., O'Connor, F.G., 2023. ACSM Expert Consensus Statement on Exertional Heat Illness: Recognition,

Bibliographie

- Management, and Return to Activity. *Current Sports Medicine Reports* 22, 134. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000001058>
- Rodney, G.G., Williams, B.Y., Strasburg, G.M., Beckingham, K., Hamilton, S.L., 2000. Regulation of RYR1 Activity by Ca²⁺ and Calmodulin. *Biochemistry* 39, 7807–7812. <https://doi.org/10.1021/bi0005660>
- Rosenberg, H., Pollock, N., Schiemann, A., Bulger, T., Stowell, K., 2015. Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 10, 93. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0310-1>
- Rossi, D., Barone, V., Giacomello, E., Cusimano, V., Sorrentino, V., 2008. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic* 9, 1044–1049. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00717.x>
- Saegusa, N., Moorhouse, E., Vaughan-Jones, R.D., Spitzer, K.W., 2011. Influence of pH on Ca²⁺ current and its control of electrical and Ca²⁺ signaling in ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 138, 537–559. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110658>
- Sagui, E., Montigon, C., Abriat, A., Jouvion, A., Duron-Martinaud, S., Canini, F., Zagnoli, F., Bendahan, D., Figarella-Branger, D., Bréigéon, M., Brosset, C., 2015a. Is There a Link between Exertional Heat Stroke and Susceptibility to Malignant Hyperthermia? *PLoS ONE* 10, e0135496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135496>
- Sagui, E., Montigon, C., Abriat, A., Jouvion, A., Duron-Martinaud, S., Canini, F., Zagnoli, F., Bendahan, D., Figarella-Branger, D., Bréigéon, M., Brosset, C., 2015b. Is There a Link between Exertional Heat Stroke and Susceptibility to Malignant Hyperthermia? *PLoS ONE* 10, e0135496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135496>
- Salanova, M., Priori, G., Barone, V., Intravaia, E., Flucher, B., Ciruela, F., McIlhinney, R. a. J., Parys, J.B., Mikoshiba, K., Sorrentino, V., 2002. Homer proteins and InsP(3) receptors co-localise in the longitudinal sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibres. *Cell Calcium* 32, 193–200. <https://doi.org/10.1016/s0143416002001549>
- Santé Publique France, 2004. La vague de chaleur d'août 2003 : que s'est-il passé ? [WWW Document]. Santé Publique France. URL <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/climat/fortes-chaleurs-canicule/la-vague-de-chaleur-d-aout-2003-que-s-est-il-passe> (accessed 12.7.23).
- Schlick, B., Flucher, B.E., Obermair, G.J., 2010. Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167, 786–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.037>
- Senatore, A., Colleoni, S., Verderio, C., Restelli, E., Morini, R., Condliffe, S.B., Bertani, I., Mantovani, S., Canovi, M., Micotti, E., Forloni, G., Dolphin, A.C., Matteoli, M., Gobbi, M., Chiesa, R., 2012. Mutant PrP suppresses glutamatergic neurotransmission in cerebellar granule neurons by impairing membrane delivery of VGCC $\alpha(2)\delta-1$ Subunit. *Neuron* 74, 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.027>
- Serano, M., Pietrangelo, L., Paolini, C., Guarnier, F.A., Protasi, F., 2022. Oxygen Consumption and Basal Metabolic Rate as Markers of Susceptibility to Malignant Hyperthermia and Heat Stroke. *Cells* 11, 2468. <https://doi.org/10.3390/cells11162468>

Bibliographie

- Schermann, H., Craig, E., Yanovich, E., Ketko, I., Kalmanovich, G., Yanovich, R., 2018. Probability of Heat Intolerance: Standardized Interpretation of Heat-Tolerance Testing Results Versus Specialist Judgment. *J Athl Train* 53, 423–430. <https://doi.org/10.4085/1062-6050-519-16>
- Stammers, A.N., Susser, S.E., Hamm, N.C., Hlynsky, M.W., Kimber, D.E., Kehler, D.S., Duhamel, T.A., 2015. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol* 93, 843–854.
- Stearns, R.L., Hosokawa, Y., Adams, W.M., Belval, L.N., Huggins, R.A., Jardine, J.F., Katch, R.K., Davis, R.J., Casa, D.J., 2020. Incidence of Recurrent Exertional Heat Stroke in a Warm-Weather Road Race. *Medicina (Kaunas)* 56, 720. <https://doi.org/10.3390/medicina56120720>
- Seroji, A.R., 2024. Variations of heat exhaustion rate of pilgrims with environmental conditions during hajj seasons between 2002 and 2018 in Makkah, Saudi Arabia. *Journal of King Saud University - Science* 36, 103173. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103173>
- Shieh, S.D., Lin, Y.F., Lin, S.H., Lu, K.C., 1995. A prospective study of calcium metabolism in exertional heat stroke with rhabdomyolysis and acute renal failure. *Nephron* 71, 428–432. <https://doi.org/10.1159/000188763>
- Shishmarev, D., Rowland, E., Aditya, S., Sundararaj, S., Oakley, A.J., Dulhunty, A.F., Casarotto, M.G., 2022. Molecular interactions of STAC proteins with skeletal muscle dihydropyridine receptor and excitation-contraction coupling. *Protein Science* 31, e4311. <https://doi.org/10.1002/pro.4311>
- Smith, R., Jones, N., Martin, D., Kipps, C., 2016. ‘Too much of a coincidence’: identical twins with exertional heatstroke in the same race. *BMJ Case Reports* bcr2015212592. <https://doi.org/10.1136/bcr-2015-212592>
- Sponga, A., Arolas, J.L., Schwarz, T.C., Jeffries, C.M., Rodriguez Chamorro, A., Kostan, J., Ghisleni, A., Drepper, F., Polyansky, A., De Almeida Ribeiro, E., Pedron, M., Zawadzka-Kazimierzczuk, A., Mlynek, G., Peterbauer, T., Doto, P., Schreiner, C., Hollerl, E., Mateos, B., Geist, L., Faulkner, G., Kozminski, W., Svergun, D.I., Warscheid, B., Zagrovic, B., Gautel, M., Konrat, R., Djinović-Carugo, K., 2021. Order from disorder in the sarcomere: FATZ forms a fuzzy but tight complex and phase-separated condensates with α -actinin. *Science Advances* 7, eabg7653. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg7653>
- Sun, S., Zhang, Z., Fregoso, O., Krainer, A.R., 2012. Mechanisms of activation and repression by the alternative splicing factors RBFOX1/2. *RNA* 18, 274–283. <https://doi.org/10.1261/rna.030486.111>
- T, T., Kg, B., Ba, A., T, N., S, N., 1990. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346. <https://doi.org/10.1038/346567a0>
- Tanwar, P., Naagar, M., Malik, G., Alam, M., Singh, T., Singh, Maity, M.K., 2022. A review on Malignant Hyperthermia: Epidemiology, Etiology, Risk factors, Diagnosis, Clinical

- Management and Treatment Modalities. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences* 13, 138–161. <https://doi.org/10.30574/wjbpsh.2023.13.1.0021>
- Teixeira, M., Py, B.F., Bosc, C., Laubretton, D., Moutin, M.-J., Marvel, J., Flamant, F., Markossian, S., 2018a. Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Sci Rep* 8, 474. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18826-5>
- Teixeira, M., Py, B.F., Bosc, C., Laubretton, D., Moutin, M.-J., Marvel, J., Flamant, F., Markossian, S., 2018b. Electroporation of mice zygotes with dual guide RNA/Cas9 complexes for simple and efficient cloning-free genome editing. *Sci Rep* 8, 474. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18826-5>
- Telegrafi, A., Webb, B.D., Robbins, S.M., Speck-Martins, C.E., FitzPatrick, D., Fleming, L., Redett, R., Dufke, A., Houge, G., van Harssel, J.J.T., Verloes, A., Robles, A., Manoli, I., Engle, E.C., Consortium, M.S.R., Jabs, E.W., Valle, D., Carey, J., Hoover-Fong, J.E., Sobreira, N.L.M., 2017. Identification of STAC3 variants in non-Native American families with overlapping features of Carey–Fineman–Ziter syndrome and Moebius syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 173, 2763–2771. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38375>
- Tham, M.K., Cheng, J., Fock, K.M., 1989. Heat stroke: a clinical review of 27 cases. *Singapore Med J* 30, 137–140.
- Tobin, J.R., Jason, D.R., Challa, V.R., Nelson, T.E., Sambuughin, N., 2001. Malignant hyperthermia and apparent heat stroke. *JAMA* 286, 168–169. <https://doi.org/10.1001/jama.286.2.168>
- Tran-Van-Minh, A., Dolphin, A.C., 2010. The alpha2delta ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit alpha2delta-2. *J Neurosci* 30, 12856–12867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2700-10.2010>
- Tuinte, W.E., Török, E., Mahlknecht, I., Tuluc, P., Flucher, B.E., Campiglio, M., 2022. STAC3 determines the slow activation kinetics of CaV1.1 currents and inhibits its voltage-dependent inactivation. *Journal of Cellular Physiology* 237, 4197–4214. <https://doi.org/10.1002/jcp.30870>
- Van Den Bossche, M.J., Strazisar, M., De Bruyne, S., Bervoets, C., Lenaerts, A.-S., De Zutter, S., Nordin, A., Norrback, K.-F., Goossens, D., De Rijk, P., Green, E.K., Grozeva, D., Mendlewicz, J., Craddock, N., Sabbe, B.G., Adolfsson, R., Souery, D., Del-Favero, J., 2012. Identification of a CACNA2D4 deletion in late onset bipolar disorder patients and implications for the involvement of voltage-dependent calcium channels in psychiatric disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 159B, 465–475. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32053>
- van Loo, K.M.J., Rummel, C.K., Pitsch, J., Müller, J.A., Bikbaev, A.F., Martinez-Chavez, E., Blaess, S., Dietrich, D., Heine, M., Becker, A.J., Schoch, S., 2019. Calcium Channel Subunit $\alpha 2\delta 4$ Is Regulated by Early Growth Response 1 and Facilitates Epileptogenesis. *J. Neurosci.* 39, 3175–3187. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-18.2019>
- Van Petegem, F., 2015. Ryanodine receptors: allosteric ion channel giants. *J Mol Biol* 427, 31–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.004>
- Vanden Abeele, F., Lotteau, S., Ducreux, S., Dubois, C., Monnier, N., Hanna, A., Gkika, D., Romestaing, C., Noyer, L., Flourakis, M., Tessier, N., Al-Mawla, R., Chouabe, C., Lefai, E., Lunardi, J., Hamilton, S., Fauré, J., Van Coppenolle, F., Prevarskaya, N.,

2019. TRPV1 variants impair intracellular Ca²⁺ signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia. *Genet Med* 21, 441–450. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0066-9>
- Vellani, V., Mauro, G., Demontis, G.C., 2022. Depleted Calcium Stores and Increased Calcium Entry in Rod Photoreceptors of the *Cacna2d4* Mouse Model of Cone-Rod Dystrophy RCD4. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 13080. <https://doi.org/10.3390/ijms232113080>
- Vergnol, A., Traoré, M., Pietri-Rouxel, F., Falcone, S., 2022. New Insights in CaV β Subunits: Role in the Regulation of Gene Expression and Cellular Homeostasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10.
- Vessey, J.P., Stratis, A.K., Daniels, B.A., Da Silva, N., Jonz, M.G., Lalonde, M.R., Baldrige, W.H., Barnes, S., 2005. Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse. *J Neurosci* 25, 4108–4117. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5253-04.2005>
- Wang, H.J., Lee, C.S., Yee, R.S.Z., Groom, L., Friedman, I., Babcock, L., Georgiou, D.K., Hong, J., Hanna, A.D., Recio, J., Choi, J.M., Chang, T., Agha, N.H., Romero, J., Sarkar, P., Voermans, N., Gaber, M.W., Jung, S.Y., Baker, M.L., Pautler, R.G., Dirksen, R.T., Riazi, S., Hamilton, S.L., 2020. Adaptive thermogenesis enhances the life-threatening response to heat in mice with an *Ryr1* mutation. *Nat Commun* 11, 5099. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18865-z>
- Wang, J., Zhou, C.J., Khodabukus, A., Tran, S., Han, S.-O., Carlson, A.L., Madden, L., Kishnani, P.S., Koeberl, D.D., Bursac, N., 2021. Three-dimensional tissue-engineered human skeletal muscle model of Pompe disease. *Commun Biol* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02059-4>
- Wang, Z., Grange, M., Wagner, T., Kho, A.L., Gautel, M., Raunser, S., 2021. The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. *Microscopy and Microanalysis* 27, 2832–2835. <https://doi.org/10.1017/S1431927621009880>
- Wappler, F., Fiege, M., 2000. Malignant Hyperthermia as a Cause for Postoperative Rhabdomyolysis. *Anesthesiology* 92, 1206. <https://doi.org/10.1097/00000542-200004000-00054>
- Warren, J.D., Blumbergs, P.C., Thompson, P.D., 2002. Rhabdomyolysis: a review. *Muscle Nerve* 25, 332–347. <https://doi.org/10.1002/mus.10053>
- Weiss, N., Koschak, A. (Eds.), 2014. *Pathologies of Calcium Channels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40282-1>
- Welc, S.S., Morse, D.A., Mattingly, A.J., Laitano, O., King, M.A., Clanton, T.L., 2016. The Impact of Hyperthermia on Receptor-Mediated Interleukin-6 Regulation in Mouse Skeletal Muscle. *PLoS One* 11, e0148927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148927>
- Westwood, C.S., Fallowfield, J.L., Delves, S.K., Nunns, M., Ogden, H.B., Layden, J.D., 2021. Individual risk factors associated with exertional heat illness: A systematic review. *Experimental Physiology* 106, 191–199. <https://doi.org/10.1113/EP088458>
- Wolak, S., Rucker, B., Kohlschmidt, N., Doetsch, S., Bartsch, O., Zechner, U., Tzanova, I., 2014. Homozygote und „compound“-heterozygote RYR1-Mutationen. *Anaesthesist* 63, 643–650. <https://doi.org/10.1007/s00101-014-2351-6>

Bibliographie

- Woll, K.A., Van Petegem, F., 2022. Calcium-release channels: structure and function of IP3 receptors and ryanodine receptors. *Physiol Rev* 102, 209–268. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2020>
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., Yan, N., 2016. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* 537, 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature19321>
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., Yan, N., 2015. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca_v1.1 complex. *Science* 350, aad2395. <https://doi.org/10.1126/science.aad2395>
- Wray, S., Burdyga, T., 2010. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev* 90, 113–178. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2008>
- Wycisk, Katharina A., Budde, B., Feil, S., Skosyrski, S., Buzzi, F., Neidhardt, J., Glaus, E., Nürnberg, P., Ruether, K., Berger, W., 2006. Structural and Functional Abnormalities of Retinal Ribbon Synapses due to Cacna2d4 Mutation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47, 3523–3530. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0271>
- Wycisk, Katharina Agnes, Zeitz, C., Feil, S., Wittmer, M., Forster, U., Neidhardt, J., Wissinger, B., Zrenner, E., Wilke, R., Kohl, S., Berger, W., 2006. Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy. *Am J Hum Genet* 79, 973–977. <https://doi.org/10.1086/508944>
- Yamazawa, T., Kobayashi, T., Kurebayashi, N., Konishi, M., Noguchi, S., Inoue, T., Inoue, Y.U., Nishino, I., Mori, S., Iinuma, H., Manaka, N., Kagechika, H., Uryash, A., Adams, J., Lopez, J.R., Liu, X., Diggle, C., Allen, P.D., Kakizawa, S., Ikeda, K., Lin, B., Ikemi, Y., Nunomura, K., Nakagawa, S., Sakurai, T., Murayama, T., 2021. A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke. *Nat Commun* 12, 4293. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24644-1>
- Yang, M., Li, Z., Zhao, Y., Zhou, F., Zhang, Y., Gao, J., Yin, T., Hu, X., Mao, Z., Xiao, J., Wang, L., Liu, C., Ma, L., Yuan, Z., Lv, J., Shen, H., Hou, P.C., Kang, H., 2017. Outcome and risk factors associated with extent of central nervous system injury due to exertional heat stroke. *Medicine (Baltimore)* 96, e8417. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008417>
- Yeo, T.P., 2004a. Heat Stroke: A Comprehensive Review. *AACN Advanced Critical Care* 15, 280–293.
- Yeo, T.P., 2004b. Heat Stroke: A Comprehensive Review. *AACN Advanced Critical Care* 15, 280–293.
- Yuan, W., Cui, C.-C., Li, J., Xu, Y.-H., Fan, C.-E., Chen, Y.-C., Fan, H.-W., Hu, B.-X., Shi, M.-Y., Sun, Z.-Y., Wang, P., Ma, T.-X., Zhang, Z., Zhu, M.-S., Chen, H.-Q., 2022. Intracellular TMEM16A is necessary for myogenesis of skeletal muscle. *iScience* 25, 105446. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105446>
- Zaharieva, I.T., Sarkozy, A., Munot, P., Manzur, A., O’Grady, G., Rendu, J., Malfatti, E., Amthor, H., Servais, L., Urtizberea, J.A., Neto, O.A., Zanoteli, E., Donkervoort, S., Taylor, J., Dixon, J., Poke, G., Foley, A.R., Holmes, C., Williams, G., Holder, M., Yum, S., Medne, L., Quijano-Roy, S., Romero, N.B., Fauré, J., Feng, L., Bastaki, L., Davis, M.R., Phadke, R., Sewry, C.A., Bönnemann, C.G., Jungbluth, H., Bachmann, C.,

- Treves, S., Muntoni, F., 2018. STAC3 variants cause a congenital myopathy with distinctive dysmorphic features and malignant hyperthermia susceptibility. *Human Mutation* 39, 1980–1994. <https://doi.org/10.1002/humu.23635>
- Zamponi, G.W., Snutch, T.P., 2013. Advances in voltage-gated calcium channel structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Calcium Channels* 1828, 1521. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.03.014>
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., Dolphin, A.C., 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67, 821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>
- Zhang, J., Chen, S.-R., Zhou, M.-H., Jin, D., Chen, H., Wang, L., DePinho, R.A., Pan, H.-L., 2022. HDAC2 in Primary Sensory Neurons Constitutively Restrains Chronic Pain by Repressing $\alpha 2\delta$ -1 Expression and Associated NMDA Receptor Activity. *J Neurosci* 42, 8918–8935. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-22.2022>
- Zhang, Y., Wang, Ting, Cai, Y., Cui, T., Kuah, M., Vicini, S., Wang, Tingting, 2023. Role of $\alpha 2\delta$ -3 in regulating calcium channel localization at presynaptic active zones during homeostatic plasticity. *Front Mol Neurosci* 16, 1253669. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1253669>
- Zhang, Y., Yamada, Y., Fan, M., Bangaru, S.D., Lin, B., Yang, J., 2010. The beta subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem* 285, 2527–2536. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022236>
- Zhang, Z., Xu, Y., Song, H., Rodriguez, J., Tuteja, D., Namkung, Y., Shin, H.-S., Chiamvimonvat, N., 2002. Functional Roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res* 90, 981–987. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000018003.14304.e2>
- Zhou, Y., Gong, B., Kaminski, H.J., 2012. Genomic Profiling Reveals Pitx2 Controls Expression of Mature Extraocular Muscle Contraction–Related Genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 1821–1829. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9481>

***CACNA2D4*, une sous-unité régulatrice des canaux calciques voltage-dépendants, associée à la survenue de l'hyperthermie d'effort**

L'hyperthermie d'effort (HE) est une maladie potentiellement mortelle définie par une hyperthermie sévère, avec une température corporelle supérieure à 40°C, associée à un dysfonctionnement neurologique soudain, observée chez des individus sains exposés à un exercice physique intensif. L'HE partage de nombreuses similitudes cliniques et biologiques avec l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM), une maladie pharmacogénétique déclenchée par des agents halogénés volatils principalement associée à des mutations du gène *RYR1*, et plus rarement des gènes *CACNA1S* et *STAC3*. Plusieurs données sont en faveur de l'existence d'une base génétique prédisposant à l'HE, mais à ce jour les preuves d'une cause génétique restent incertaines. Les mutations de *RYR1* ont été associées à l'HE avec une prévalence beaucoup plus faible que dans l'HM, ce qui suggère l'implication d'autres gènes. Nous rapportons ici l'étude génétique d'une cohorte de soldats ayant présenté un épisode d'HE chez lesquels les mutations de *RYR1* avaient été précédemment exclues. L'analyse du séquençage de l'exome entier a conduit à l'identification de variants du gène *CACNA2D4* chez quatre patients non apparentés. *CACNA2D4* code l'isoforme $\alpha 2\delta$ -4 de la classe $\alpha 2\delta$ de la sous-unité régulatrice des canaux voltage-dépendants de la famille Cav. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'implication de *CACNA2D4* dans l'apparition d'une hyperthermie d'effort avec une caractérisation fonctionnelle *in vitro* et *in vivo*. Nous montrons ici qu'un nouveau transcrit *CACNA2D4* est exprimé dans le muscle squelettique de la souris. Des études *in vitro* démontrent que les quatre variants génétiques de *CACNA2D4* trouvés chez les patients ayant vécu une crise d'HE modifient la fonctionnalité de la protéine, altérant notamment sa localisation membranaire. Le variant p.(Ser299Arg) localisé dans le domaine MIDAS de $\alpha 2\delta$ -4 a un impact sur l'interaction directe de la protéine avec la sous-unité Cav1.1 du DHPR dans un système reconstitué, ainsi que sur ses propriétés de canal. Le modèle murin avec un knock-in pour le variant p.(Ser299Arg) (KI-S306R) est viable et fertile. Soumis à un protocole d'exercice intense, les animaux KI-S306R présentent une augmentation significative des taux sanguins de CPK, reflétant une rhabdomyolyse accrue, par rapport à leurs compagnons de portée sauvage (WT). De plus, les souris femelles KI-S306R présentent une élévation significative de la température corporelle centrale par rapport aux WT, reproduisant une crise de type HE. Nous avons également observé une altération de l'homéostasie calcique musculaire dans les myotubes de souris KI-S306R. Dans l'ensemble, ce travail a permis d'une part de mettre en évidence l'existence d'un transcrit musculaire du gène *CACNA2D4*, nouvellement caractérisé, et d'autre part de montrer l'association entre des variants du gène *CACNA2D4* et la survenue d'une crise d'hyperthermie d'effort.