

# **THESE**

Pour l'obtention du grade de

## **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS**

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Gay-Lussac

Secteur de Recherche : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par

**Ludivine MONDIN**

\*\*\*\*\*

### **Homéostasie calcique et survie des cellules musculaires squelettiques déficientes en dystrophine : effets de la modulation de l'activité et de l'expression des Récepteurs à l'Inositol Trisphosphate.**

\*\*\*\*\*

Directeurs de thèse : Dr. Christian COGNARD et Dr. Stéphane SEBILLE

\*\*\*\*\*

Soutenue le 18 Septembre 2009  
Devant la Commission d'Examen

#### **JURY**

<b>P. GAILLY</b>	<b>Professeur, Université de Louvain, Belgique</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>J.L. MOREL</b>	<b>Chargé de Recherche au CNRS, Université de Bordeaux</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>S. TALON</b>	<b>Maître de Conférences, Université de Nantes</b>	<b>Examineur</b>
<b>F. MOREL</b>	<b>Professeur des Universités, Université de Poitiers</b>	<b>Examineur</b>
<b>S. SEBILLE</b>	<b>Maître de Conférences, Université de Poitiers</b>	<b>Examineur</b>
<b>C. COGNARD</b>	<b>Directeur de Recherche au CNRS, Université de Poitiers</b>	<b>Examineur</b>

## Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC, UMR CNRS 6187) dirigé par le Dr. Guy Raymond puis par le Pr. Frédéric Becq depuis janvier 2008, dans l'équipe Physiopathologie et pharmacologie des canaux ioniques dirigée par le Dr. Christian Cognard.

Je remercie le Dr. Guy Raymond de m'avoir accueilli au sein de l'UMR CNRS 6187. Je souhaite également le remercier pour la bonne ambiance qu'il a su apporter au laboratoire par ses nombreuses plaisanteries, ma préférée étant celle des sacs d'air dont je fus victime relativement souvent, et par l'organisation du cochoui. Merci également au Pr. Frédéric Becq pour sa gentillesse et pour l'agréable cadre qu'il a su faire perdurer au sein de l'UMR.

Je remercie le Dr. Christian Cognard pour son accueil au sein de l'équipe, ses nombreux conseils scientifiques, son aide et son soutien précieux notamment en cette fin de thèse. Merci pour la bonne humeur qui règne au sein de l'équipe et à laquelle tu participes activement par des blagues quotidiennes dont toi seul as le secret, elles vont certainement me manquer (si si...).

Je tiens également à remercier le Dr. Stéphane Sebille pour son encadrement, ses conseils et ses encouragements tout au long de cette thèse. Merci également pour ta confiance et ton soutien. Maintenant je sais que la meilleure façon de savoir si un voyage était agréable est de se rappeler ce qu'on a pu manger au cours de ce séjour.

Je tiens à souligner l'agréable cadre dans lequel il m'a été permis d'évoluer au cours de ces années de thèse et je remercie Christian et Stéphane pour leur confiance, et d'avoir permis mon épanouissement scientifique. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier le Dr. Jean-Luc Morel et le Pr. Philippe Gailly d'avoir accepté de juger ce travail, ainsi que le Dr. Sophie Talon et le Pr. Frank Morel d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite remercier l'équipe PPCI au grand complet et plus particulièrement :

Le Dr. Bruno Constantin pour tous ses conseils d'expérimentateur avisé et pour toutes ses compétences scientifiques qu'il a su me faire partager. Merci également pour toutes nos discussions scientifiques ou non et pour tous les « remakes » de « La guerre des étoiles » ou encore du « Seigneur des anneaux ».

Le Dr. Anne Cantereau pour m'avoir formé à la technique de la microscopie confocale et pour ses nombreux conseils.

Un grand merci au Pr. Jean-François Faivre, qui malgré ses nombreuses responsabilités a su trouver le temps de m'apporter de nombreux conseils pertinents et constructifs.

Je remercie le Dr. Nadine Déliot pour son soutien, ses conseils, ses encouragements et pour son « management » en cette fin de thèse. Merci également pour les moments partagés en dehors du labo, je regrette simplement que tu ne sois pas arrivée plus tôt. Il va maintenant falloir que tu fasses attention de ne plus mettre le feu au laboratoire et de ne plus te blesser (oui je sais c'est facile mais je ne pouvais pas passer à côté...).

Merci à Jessica Sabourin d'avoir partagé ses années de thèse au sein du laboratoire. Je te remercie pour toute ton aide et ton soutien au quotidien, j'en ferais autant pour toi dans quelques mois... Merci également pour tous nos coups de folie communs et les moments passés en dehors de la fac pendant ces années universitaires, plus qu'une collègue, une véritable amie... Je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

Je remercie également Charlotte Lorin avec qui j'ai partagé le bureau durant ma dernière année de thèse. Merci de m'avoir supporté et encouragé au cours de ces derniers mois et de m'avoir motivée et changé les idées dans mes moments de doute. Je te confie la garde de notre serpent et de son petit ami vert. Je te souhaite bon courage et beaucoup de réussite pour ta thèse et surtout fais-toi confiance.

Je remercie vivement ces trois personnes qui ont été pour moi un véritable soutien dans ces derniers moments de rédaction et qui ont largement contribué, chacune à leur manière, au bon déroulement de cette fin de thèse.

Je remercie Rania pour sa bonne humeur quotidienne et pour ses encouragements. Je te souhaite de faire une bonne thèse au sein de cette équipe et à Poitiers... tu peux venir pointer le bout de ton nez à Bruxelles si tu t'ennuies trop ici...

Merci également à Fabien Hubert, autrement nommé « le poussin », pour son aide et pour la présence « masculine » qu'il a su apporter dans notre bureau. Je te souhaite de devenir un « poulet » heureux au sein de ton nouveau laboratoire.

Merci à Coralie Lamiche (dite Coco) pour les six mois passés ensemble au cours desquels j'ai pu étoffer ma connaissance discographique d'Annie Cordy... Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

Je souhaite remercier Haouaria Balghi pour toutes les connaissances techniques et scientifiques qu'elle a su me transmettre lors de mon Master 2 recherche, ainsi que pour son soutien, son aide et ses encouragements transatlantiques... J'espère que nos chemins se recroiseront dans un futur proche.

Merci à toutes les personnes qui sont passées dans notre sous-groupe : Aurélie Vandebrouck pour sa bonne humeur et son soutien au cours de mon Master 2 recherche, Elise Mok pour avoir partagé le bureau pendant plusieurs années et pour l'aide linguistique qu'elle m'a apporté, Aude Lafoux pour sa bonne humeur et sa sympathie.

Merci également à Najete Benamer pour les moments partagés au labo, pour sa gentillesse et son ouverture d'esprit et pour notre duo terrible, « les Lujetes », au palet. Je suis ravi d'avoir fait ta connaissance, j'espère qu'on gardera contact après notre thèse. Je remercie Aurélie Mercier pour sa bonne humeur, son punch et son aide (orthographique) et je lui souhaite bonne route pour la suite (avec une nouvelle voiture...).

Merci également à Luc et Anna, je vous souhaite plein de bonnes choses...

Mes plus vifs remerciements à toute l'équipe enseignante qui m'a très bien accueilli lors de mon année d'ATER, pour leur sympathie et leur gentillesse. Je souhaite plus particulièrement remercier le Dr. Laurent Cronier pour m'avoir formé à l'enseignement des TP de physiologie animale, pour sa disponibilité, sa sympathie et pour ses conseils. Merci également au Dr. Jocelyn Bescond pour l'aide qu'il a su m'apporter lors de la préparation des travaux dirigés et pour tous ses conseils avisés. Un grand merci au Dr. Aurélien Chatelier pour son aide lors des travaux pratiques et pour sa bonne humeur constante et sa gentillesse. Je n'ai définitivement pas réussi à relever le pari de terminer le TP de physio cardiaque avant 18h30, tu restes le grand vainqueur... Merci également à Isabelle Courtin pour son aide technique, sa compétence et sa disponibilité. Il a été très agréable d'enseigner au sein de cette équipe, avec des gens compétents et disponibles.

J'adresse toute ma reconnaissance à Françoise Mazin pour sa grande gentillesse, sa disponibilité et ses conseils. Merci à Christophe Magaud pour ses enseignements techniques et sa bonne humeur, ainsi qu'à Sandra Mirval pour son aide et pour son énergie.

Je tiens à remercier personnel administratif et technique, merci à James, Lalassoa, Carole, Françoise, Christelle, Yves, Claudine et Khadra pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur bonne humeur.

Je remercie également l'équipe PMAS pour leur accueil et leurs conseils et plus particulièrement Sylvie Patri pour son aide précieuse pour la RT-PCR quantitative.

Merci à l'équipe LITEC pour leur accueil et leur gentillesse.

Un énorme merci à tous mes amis qui m'ont largement soutenu pendant cette période de thèse :

Merci à Fabrice Antigny, ou Nini, de m'avoir supporté pendant ces années universitaires et j'avoue, je porte bien le surnom que tu m'as si gentiment donné... Merci pour tes encouragements lors des révisions d'exams, pour ton amitié sincère et merci de m'accueillir dans quelques jours à Genève. J'espère garder le contact et tu seras bien entendu le bienvenu (avec ta La gezz) dans notre futur chez nous !

Merci à la miss Julie Deguil pour nos délires et « me sortir de temps en temps », ainsi que pour si bien me comprendre ! Tu comptes plus que ce que tu penses... Nous nous retrouverons sûrement en post-doc, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Ludoss (si je me comprends c'est que je suis bilingue... ?) et Marie pour les moments partagés et vous êtes les bienvenus là où je serais en post-doc.

Je remercie Karline et Julien, les doudou-lapins, pour nos soirées jeux de société-boulottage, après-midi pédalo (la prochaine fois on laisse les garçons au milieu du lac pour de vrai !) ... Vous allez me manquer !

Merci à Manu et Vaness pour ces dix années d'amitié, je vous souhaite beaucoup de bonheur avec Florent et les autres bébés à venir... Et j'espère qu'on pourra encore partager les moments importants de nos vies respectives.

Je remercie Benoît et Emma pour les soirées « rock-band » et ciné, la prochaine sera chez nous !

Merci à Domi ainsi qu'à Tof pour toutes les soirées partagées et les bons délires.

Merci au petit groupe « BIOTechno » : Tom, Domi, Nico, Sophie et Ludivine, ce fut un réel plaisir de partager l'expérience de l'organisation du forum BIOTechno avec vous.

Un merci particulier et tendre à la famille et les amis de longue date :

Un tendre remerciement à mes parents. Merci pour votre soutien sans faille et merci d'être les meilleurs parents du monde, je pense qu'on peut difficilement rêver mieux...

Un grand merci à Cosette, Gribouille (ou Jean-Pierre) et Damien de m'avoir acceptée parmi vous et d'avoir fait que je me sente comme chez moi. Merci pour tout.

Merci à mes deuxièmes parents, Daniel et Yasmine, de me considérer comme leur propre fille, ainsi qu'à Anaïs et Laureen.

Merci à la petite tribut Albert pour les apéros, les repas improvisés et les après-midi piscine, ainsi qu'à la famille Schmitt au grand complet pour les agréables moments partagés.

Merci enfin à Sylvain, mon Bibou, pour son soutien au quotidien et pour n'avoir jamais douté. Les mots me manquent... merci d'être là, tout simplement...

Je voulais enfin remercier l'Association Française contre les Myopathies (AFM) pour son soutien financier.

# Sommaire

Sommaire .....	1
Abréviations .....	7
Etat de l'art .....	7
<b>I. Le muscle squelettique .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Généralités .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Myogenèse .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Ultrastructure du muscle squelettique .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Anatomie du muscle squelettique .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Les protéines contractiles .....</b>	<b>16</b>
<b>4. Les étapes de la contraction musculaire .....</b>	<b>17</b>
<b>II. Homéostasie calcique du muscle squelettique .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Les voies d'entrée du calcium dans le cytoplasme .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Canaux calciques du sarcolemme .....</b>	<b>19</b>
1.1.1. Récepteur aux dihydropyridines (canal calcique de type L) .....	19
1.1.2. Canal calcique de type T .....	22
1.1.3. Récepteur nicotinique .....	22
1.1.4. Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .....	23
1.1.5. Les canaux TRPs (transient receptor potential) .....	24
<b>1.2. Canaux calciques du réticulum sarcoplasmique .....</b>	<b>26</b>
1.2.1. Les récepteurs à la ryanodine .....	27
1.2.1.1. Structure et fonction des récepteurs à la ryanodine .....	27
1.2.1.2. Régulation des RyRs .....	30
1.2.2. Les récepteurs à l'IP3 .....	32
1.2.2.1. Origine et structure .....	33
1.2.2.2. Localisation intracellulaire et rôle de l'IP3R .....	34
1.2.2.3. Régulation des IP3Rs .....	36
<b>2. Les voies d'extrusion et les systèmes tampons du calcium cytoplasmique .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1. Repompage vers le RS .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2. Extrusion vers le milieu extracellulaire .....</b>	<b>39</b>
2.2.1. La pompe calcique ATPasique du sarcolemme (PMCA) .....	39
2.2.2. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .....	39

2.3. Rôle des mitochondries .....	39
2.4. Calciprotéines cytoplasmiques .....	40
<b>3. Le signal calcique dans la cellule musculaire squelettique .....</b>	<b>41</b>
3.1. Le couplage excitation-contraction .....	41
3.2. La transcription de gènes .....	43
3.2.1. La Calcineurine : un intermédiaire essentiel dans la signalisation .....	44
3.2.2. NFAT .....	45
3.2.3. NFκB .....	47
3.3. La mort cellulaire .....	48
<b>4. Les évènements de libération calcique spontanée et localisée.....</b>	<b>50</b>
4.1. Généralités .....	50
4.2. Les sparks et autres évènements de libération calcique dans le muscle squelettique de mammifère.....	51
4.3. Mécanismes impliqués dans ces libérations calciques spontanées .....	52
<b>III. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) .....</b>	<b>55</b>
<b>1. Caractéristiques cliniques de la DMD .....</b>	<b>55</b>
1.1. Historique .....	55
1.2. Pathologie .....	55
1.3. Diagnostic .....	56
1.4. Origine génétique et hérédité .....	57
<b>2. Approches et découvertes expérimentales de la DMD .....</b>	<b>57</b>
2.1. Les modèles animaux .....	57
2.1.1. La souris <i>mdx</i> (X-linked Muscular Dystrophy) (Figure H-35) .....	58
2.1.2. La dystrophie musculaire canine .....	59
2.1.3. La dystrophie musculaire féline .....	59
2.2. La dystrophine et son complexe protéique associé .....	59
2.2.1. Structure de la dystrophine.....	59
2.2.2. Le complexe protéique associé à la dystrophine .....	60
2.2.3. Rôle de la dystrophine et de son complexe protéique associé.....	62
2.2.4. Mutations du gène de la dystrophine et les pathologies associées.....	63
2.3. Relation entre l'absence de la dystrophine et le phénotype dystrophique .....	64
2.3.1. L'Hypothèse mécanique .....	64
2.3.2. La surcharge calcique .....	65
2.3.2.1. Influx provenant du milieu extracellulaire .....	66

2.3.2.2. Implication du réticulum sarcoplasmique .....	67
2.3.2.3. Implication de la mitochondrie .....	68
2.3.2.4. Surcharge calcique et mort des fibres musculaires .....	68
2.3.3. Implication du stress oxydatif et de l'inflammation.....	69
<b>3. Approches thérapeutiques .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1. Stratégies thérapeutiques visant la réexpression de la dystrophine.....</b>	<b>70</b>
3.1.1. Thérapie cellulaire .....	70
3.1.2. Thérapie génique (Figure H-37).....	71
3.1.3. Saut d'exon (Figure H-38).....	72
<b>3.2. Autres stratégies thérapeutiques.....</b>	<b>72</b>
3.2.1. Surexpression d'utrophine (Figure H-39) .....	72
3.2.2. Thérapies pharmacologiques .....	73
3.2.2.1. Les corticostéroïdes.....	73
3.2.2.2. La créatine .....	74
3.2.2.3. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) .....	74
3.2.2.4. La gentamicine .....	74
3.2.2.5. La myostatine .....	75
<b>Position du problème et objectifs du travail.....</b>	<b>76</b>
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>78</b>
<b>I. Matériel biologique.....</b>	<b>78</b>
<b>1. Lignées cellulaires .....</b>	<b>78</b>
<b>1.1. Obtention des lignées .....</b>	<b>78</b>
<b>1.2. Décongélation des cellules .....</b>	<b>79</b>
<b>1.3. Entretien des cellules .....</b>	<b>79</b>
<b>1.4. Congélation des cellules .....</b>	<b>80</b>
<b>1.5. Utilisation et évolution des cellules en culture .....</b>	<b>80</b>
<b>2. Modèles animaux.....</b>	<b>80</b>
<b>2.1. Culture primaire provenant de muscles squelettiques.....</b>	<b>80</b>
2.1.1. Dissection .....	81
2.1.2. Dissociation mécanique .....	81
2.1.3. Dissociation enzymatique .....	81
2.1.4. Récupération des cellules.....	81
2.1.5. Elimination des fibroblastes : pré-ensemencement .....	82
2.1.6. Ensemencement et entretien de la culture primaire.....	82

2.1.7. Evolution de la culture primaire .....	82
<b>2.2. Culture des fibres musculaires squelettiques</b> .....	<b>83</b>
2.2.1. Dissection .....	83
2.2.2. Dissociation enzymatique .....	83
2.2.3. Dissociation mécanique .....	83
2.2.4. Ensemencement .....	83
<b>II. Etude de l'homéostasie calcique intracellulaire par microscopie confocale</b> .....	<b>85</b>
<b>1. Principe de la microscopie confocale à fluorescence</b> .....	<b>85</b>
<b>2. Systèmes de microscopie confocale du laboratoire</b> .....	<b>85</b>
<b>2.1. Microscope confocal Bio-Rad MRC1024</b> .....	<b>85</b>
<b>2.2. Microscope confocal Olympus FV1000</b> .....	<b>86</b>
<b>3. Caractéristiques de la sonde calcique Fluo-4</b> .....	<b>86</b>
<b>4. Mesure des libérations globales de calcium lors d'une dépolarisation membranaire</b> .....	<b>87</b>
<b>4.1. Principe</b> .....	<b>87</b>
<b>4.2. Appareillage</b> .....	<b>87</b>
<b>4.3. Protocole expérimental</b> .....	<b>88</b>
4.3.1. Charge et traitements des cellules .....	88
4.3.2. Mode d'acquisition .....	88
<b>4.4. Analyses</b> .....	<b>88</b>
<b>5. Mesure des évènements spontanés localisés de libération calcique</b> .....	<b>89</b>
<b>5.1. Principe</b> .....	<b>89</b>
<b>5.2. Appareillage</b> .....	<b>89</b>
<b>5.3. Protocole expérimental</b> .....	<b>89</b>
5.3.1. Charge et traitement des cellules .....	89
5.3.2. Mode d'acquisition .....	89
<b>5.4. Analyses : détermination de la densité de sites</b> .....	<b>90</b>
<b>6. Mesure de la variation de calcium intracellulaire après décaageage</b> .....	<b>90</b>
<b>6.1. Principe du décaageage et caractéristique de la sonde NP-EGTA</b> .....	<b>90</b>
<b>6.2. Appareillage</b> .....	<b>91</b>
<b>6.3. Protocole expérimental</b> .....	<b>91</b>
6.3.1. Charge et traitements des cellules .....	91
6.3.2. Protocoles d'acquisition et de stimulation Acquisition en X,T .....	91
<b>6.4. Analyses</b> .....	<b>92</b>
<b>III. Biologie moléculaire et Biochimie</b> .....	<b>94</b>

<b>1. La PCR inverse en temps réel (ou RT-PCR quantitative)</b> .....	<b>94</b>
<b>1.1. Principe général</b> .....	94
<b>1.2. Extraction des ARN totaux</b> .....	94
<b>1.3. Transcription inverse : obtention d'ADNc simple brin</b> .....	95
<b>1.4. La PCR quantitative en temps réel</b> .....	95
<b>1.5. Analyse des résultats</b> .....	96
1.5.1. Efficacité de PCR .....	96
1.5.2. Normalisation des valeurs obtenues .....	96
1.5.3. Expression des résultats en valeur relative .....	97
<b>2. Western-blot</b> .....	<b>97</b>
<b>2.1. Généralités</b> .....	97
<b>2.2. Extraction protéique</b> .....	97
<b>2.3. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide</b> .....	97
<b>2.4. Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose</b> .....	98
<b>2.5. Révélation des protéines d'intérêt</b> .....	98
<b>IV. Immunomarquage</b> .....	<b>99</b>
<b>1. Généralités</b> .....	<b>99</b>
<b>2. Immunocytochimie : immunomarquage des cellules</b> .....	<b>99</b>
<b>2.1. Fixation, perméabilisation et saturation des sites non spécifiques</b> .....	99
<b>2.2. Révélation des protéines d'intérêt</b> .....	99
<b>V. Test de viabilité cellulaire (test MTT)</b> .....	<b>100</b>
<b>1. Principe général</b> .....	<b>100</b>
<b>2. Ensemencement et traitement des cellules</b> .....	<b>100</b>
<b>3. Test MTT</b> .....	<b>100</b>
<b>VI. ARN interférence</b> .....	<b>101</b>
<b>1. Principe général</b> .....	<b>101</b>
<b>2. Technique de transfection des ARN interférence</b> .....	<b>101</b>
<b>VII. Tests statistiques</b> .....	<b>103</b>
<b>Résultats - Discussion</b> .....	<b>104</b>
<b>I. Les libérations calciques globales</b> .....	<b>104</b>
<b>1. Etude des libérations calciques globales dans les lignées cellulaires myogéniques</b> .....	<b>105</b>
<b>1.1. Comparaison des deux types cellulaires dans les conditions contrôles</b> .....	105
<b>1.2. Effet de différents inhibiteurs des IP3Rs</b> .....	106
<b>1.3. Effet d'inhibiteurs de la voie calcineurine/NFAT</b> .....	107
<b>1.4. Effet de l'extinction de l'IP3R-1 par siRNA sur les libérations calciques globales</b> .....	108

2. Etude des libérations calciques globales dans les cultures primaires de muscles provenant de souris <i>mdx</i> ou <i>Bl10</i> .....	109
3. Régulation de l'expression des récepteurs à l'IP3 .....	110
4. Libérations calciques globales : discussion.....	112
<b>II. Les libérations calciques spontanées ou induites par décaage de calcium .....</b>	<b>117</b>
1. Libérations calciques spontanées localisées au repos .....	117
1.1. Modèles <i>SoIc1(-)</i> et <i>Sold(+)</i> .....	117
1.2. Cultures primaires de souris <i>mdx</i> et <i>Bl10</i> .....	118
1.3. Localisation et répartition des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique dans les myotubes de lignées .....	119
2. Décaage de calcium par photolyse de calcium cagé.....	119
2.1. Cultures primaires de souris <i>mdx</i> et <i>Bl10</i> .....	119
2.2. Fibres musculaires .....	120
3. Libérations calciques spontanées et ou induites par décaage de calcium : discussion.....	121
<b>III. La survie cellulaire .....</b>	<b>124</b>
1. Effets des différents traitements sur la survie cellulaire .....	124
2. Survie cellulaire : discussion .....	126
Conclusions générales et perspectives.....	129
Bibliographie .....	134
Annexes .....	165
Annexe 1 : Composition des milieux utilisés dans la culture des lignées cellulaires.....	165
Annexe 2 : Composition des milieux utilisés dans la culture primaire des cellules musculaires squelettiques de souris .....	166
Annexe 3 : Composition des milieux utilisés dans la culture des fibres musculaires squelettiques de souris .....	167
Annexe 4 : Composition des milieux utilisés lors des enregistrements calciques .....	168
Annexe 5 : Composition des milieux utilisés pour la technique de western-blot.....	169
Annexe 6 : Composition des milieux utilisés pour l'immunomarquage .....	171
Annexe 7 : Articles publiés .....	172
Annexe 8 : Résumé de la thèse.....	173

## Abréviations

### *-A-*

AAV: adeno-associated virus  
2-APB: 2-aminoethoxydiphényl borate  
ADN: acide désoxyribonucléique  
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire  
AM: acétoxyméthylester  
AMPC: adénosine monophosphate cyclique  
AONs: antisense oligonucleotides  
ARN: acide ribonucléique  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
Asp: Asparagine  
ATP: adénosine triphosphate

### *-B-*

BAPTA: 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid  
BMD: Becker muscular dystrophy  
BSA: bovin serum albumin

### *-C-*

Ca<sup>2+</sup>: ion calcium  
CaM: calmoduline  
CaMK-II: calcium-calmoduline kinase II  
CCE: capacitative calcium entry  
CEC: couplage excitation-contraction  
CICR: calcium-induced calcium release  
CIF: calcium influx factor  
CIP: cocktail d'inhibiteurs de protéases  
cm: centimetre  
CO<sub>2</sub>: dioxyde de carbone  
CREB: cAMP/Ca<sup>2+</sup>-response element binding protein  
CsA: cyclosporine A  
Ct: cycle threshold

**-D-**

DAG: diacylglycerol  
Da: dalton  
DAPs: dystrophin-associated proteins  
DHPRs: dihydropyridines receptors  
DHPs: dihydropyridines  
DMB: dystrophie musculaire de Becker  
DMD: dystrophie musculaire de Duchenne  
DMEM: dulbecco's modified eagle's medium  
DMSO: Diméthyl sulfoxyde  
DND: DNA-binding domain  
dNTP: désoxy nucléotide triphosphate  
DTT: dithiotheritol  
DYS: dystrophine

**-E-**

ECL: enhanced chemiluminescence  
EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid  
EGTA: ethyleneglycol-bis ( $\beta$ -amino-ethyl ether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid

8

---

**-F-**

FDB: flexor digitorum brevis  
FKBP: FK Binding Protein  
FRET: fluorescence resonance energy transfer

**-G-**

g: gravité  
GMPc: guanosine monophosphate cyclique  
Grb2: growth factor receptor-bound protein 2  
GRMD: golden retriever muscular dystrophy  
GTP: Guanosine triphosphate

**-H-**

h: heure  
HEPES: Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine ethane sulfonique  
HFMD: hypertrophic feline muscular dystrophy

HVA: high voltage activated

*-I-*

IDL: image data language

IKK: inhibitor of  $\kappa$ B kinase

IGF-1: insulin-like growth factor 1

IL: interleukine

IP3: inositol 1,4,5-trisphosphate

IP3Rs: inositol 1,4,5-trisphosphate receptors

*-K-*

$K^+$ : ion potassium

kb: kilobase

KCl: chlorure de potassium

kDa: kiloDalton

KO: knock out

*-L-*

LPS: lipopolysacharides

LVA: low voltage activated

9

---

*-M-*

*mdx*: X-linked muscular dystrophy

MEF2: myocyte enhancer factor 2

$Mg^{2+}$ : ion magnésium

MHC: myosine heavy chain

$\mu$ m: micromètre

$\mu$ M: micromolaire

ml: millilitre

mM: millimolaire

mW: milliwatt

MLC: myosine light chain

mPTP: mitochondrial permeability transition pore

MRF: muscle regulatory factor

ms: milliseconde

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

*-N-*

Na<sup>+</sup>: ion sodium  
nAChR: récepteur nicotinique à l'acétylcholine  
nm: nanomètre  
nM: nanomolaire  
NCX: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger  
NEMO: named NFκB essential modulator  
NFAT: nuclear factor of activated T-cells  
NFκB: nuclear factor κB  
NHR: NFAT homology region  
NLS: nuclear localization signal  
NO: nitric oxyde  
NOS: nitric oxyde synthase  
NP-EGTA: o-nitrophenyl EGTA  
NRD: NFκB/Rel/dorsal domain

*-O-*

OAG: 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol

10

---

*-P-*

PBS: phosphate buffer saline  
PDZ: PSD-95, disc-large et ZO-1  
PFA: paraformaldéhyde  
PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
PKA: Protéine kinase A  
PKC: Protéine kinase C  
PKG: Protéine kinase G  
PLC: Phospholipase C  
PMCA: plasma-membrane calcium ATPase  
PMT: photomultiplicateur  
PTX: pertussis toxin

*-R-*

RE: réticulum endoplasmique  
RHD: Rel homology domain

RIPA: radioimmunoprecipitation assay  
RISC: RNA-induced silencing complex  
ROCs: receptor-operated channels  
rpm: rotation par minute  
RS: réticulum sarcoplasmique  
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase Chain Reaction  
RyRs: ryanodine receptors

*-S-*

SACs: stretch-activated channels  
SDS: sodium dodécyl sulfate  
SERCA: sarco-endoplasmique reticulum calcium ATPase  
siRNA: small interfering RNA  
SH3: domaine d'homologie 3 Src  
SKF-96365: 1- $\{\beta$ -[3-(4-Methoxyphenyl)propyl]-4-methoxyphenethyl}-1H-imidazole hydrochloride  
snRNA: small nuclear RNA  
SOCs: store-operated channels  
SOCEs: store-operated calcium entries  
SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>: ion sulfate  
STIM1: stromal interaction molecule 1

*-T-*

TAD: transactivation domain  
TBS: tris buffered saline  
TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$   
TNF: tumor necrosis factor  
TRP: transient receptor potential  
TRPA: transient receptor potential ankyrin  
TRPC: transient receptor potential canonical  
TRPM: transient receptor potential melastatin  
TRPML: transient receptor potential mucoLipin  
TRPN: transient receptor potential No mechanosensitive  
TRPP: transient receptor potential polycystin  
TRPV: transient receptor potential vanilloid

TT: tubule Transverse

-*U*-

UV: ultraviolet

-*X*-

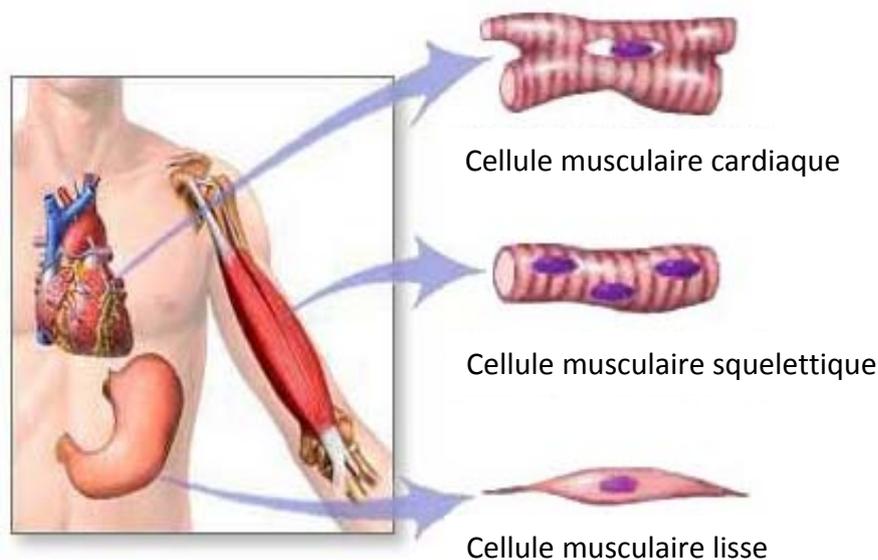
XeC: xestospongine C

# I. Le muscle squelettique

## 1. Généralités

Les muscles représentent environ 40% de la masse corporelle chez l'Homme et leur principale caractéristique est leur capacité à transformer une énergie chimique en énergie mécanique : la contraction. Ils sont impliqués dans des fonctions telles que la respiration, le mouvement de liquides corporels ou la motricité.

Le tissu musculaire squelettique intervient dans les mouvements volontaires et réflexes. Il est sollicité en permanence afin d'assurer la locomotion (motricité cinétique) ainsi que le maintien de l'équilibre et de la posture (motricité statique) de l'organisme. Comme le muscle cardiaque, il appartient à la catégorie des muscles striés (Figure H-1) qui diffèrent des muscles lisses par leur organisation ultrastructurale. Cependant, le tissu musculaire squelettique est sous le contrôle du système nerveux autonome (système volontaire) alors que la contraction du muscle cardiaque et de la plupart des muscles lisses se fait de façon involontaire.



**Figure H-1** : Les trois types musculaires

Les cellules musculaires cardiaques sont striées, ramifiées et possèdent un seul noyau central.

Les cellules musculaires squelettiques sont sous forme de longs cylindres striés à plusieurs noyaux périphériques.

Les cellules musculaires lisses ne sont ni striées, ni ramifiées et possèdent un seul noyau central.

Source : <http://www.nytimes.com/imagepages/2007/08/01/health/adam/19841Typesofmuscle tissue.html>

---

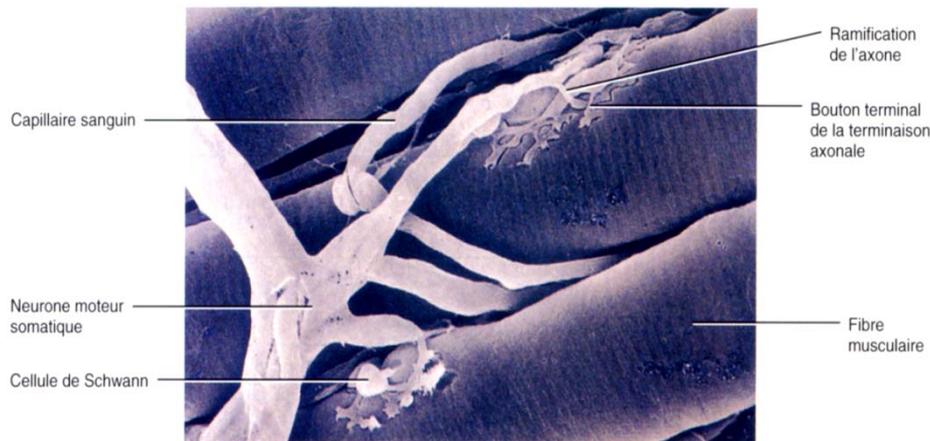
## 2. Myogenèse

Plusieurs étapes sont nécessaires à la formation des tissus musculaires lors du développement de l'embryon. Sous l'influence de facteurs de croissance, des cellules totipotentes d'origine mésodermique vont proliférer puis s'engager dans la lignée myogénique en se déterminant en myoblastes (Figure H-2 A). Ces cellules sont fusiformes à noyau unique et vont se multiplier avant de stopper leur cycle cellulaire et de s'aligner les unes par rapport aux autres. Sous l'influence de nouveaux facteurs, les myoblastes proches vont fusionner entre eux conduisant à la formation d'un syncytium plurinucléé. Cette différenciation permet l'obtention de myotubes à noyaux centraux (Figure H-2 B). Lors de l'étape de maturation, les myotubes vont se différencier en fibres musculaires avec une disposition périphérique des noyaux (Figure H-2 B). La réorganisation du cytosquelette et le positionnement central des myofibrilles permet aux fibres d'acquérir des propriétés contractiles. Ces fibres ont perdu leur capacité de division cellulaire, mais ce sont les cellules satellites, situées en périphérie des fibres, qui interviendront pour la réparation des tissus musculaires.

## 3. Ultrastructure du muscle squelettique

### 3.1. *Anatomie du muscle squelettique*

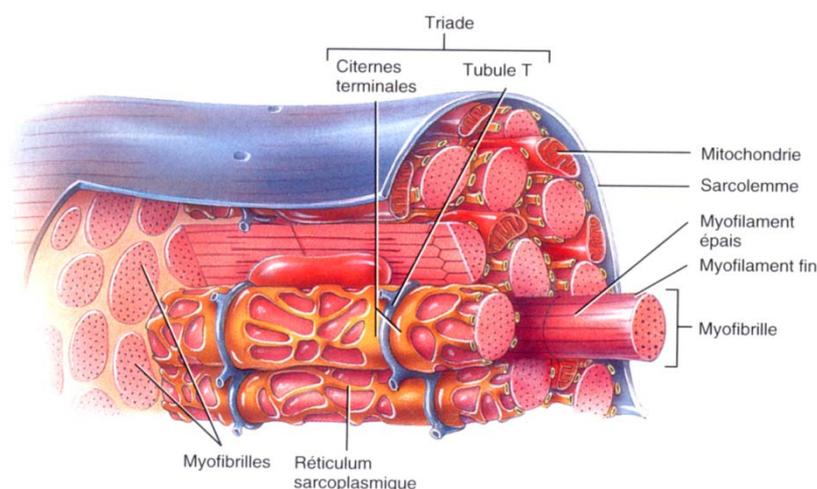
Les muscles squelettiques, reliés aux os par l'intermédiaire de tendons, sont constitués d'un ensemble de faisceaux musculaires (Figure H-3 A). Chaque faisceau comporte plusieurs fibres musculaires rendues solidaires par des enveloppes de tissu conjonctif (Figure H-3 B). Ces fibres sont agencées parallèlement les unes aux autres et constituent l'unité contractile du muscle squelettique. Ce sont de longues cellules cylindriques plurinucléées avec un diamètre variable de 10 à 100  $\mu\text{m}$  et pouvant atteindre une longueur de 30 cm chez l'Homme. Au sein des faisceaux musculaires, chacune des fibres est innervée par un seul motoneurone (Figure H-4). Chaque motoneurone innerve lui-même plusieurs fibres musculaires les activant ainsi de façon synchrone : c'est l'unité motrice. Les sous-unités composant les fibres sont les myofibrilles constituées entre autre de myofilaments d'actine et de myosine (Figure H-5). Ces structures sont les éléments contractiles des fibres musculaires.



**Figure H-4 : Fibres innervées par un motoneurone.**

Une fibre est innervée par un seul motoneurone au niveau de la jonction neuromusculaire (ou plaque motrice). En revanche, un motoneurone innerve plusieurs fibres. *Source : Tortora et Grabowski, 2001*

Il existe différents types de fibres musculaires appelées lentes, rapides ou intermédiaires aux propriétés de contraction différentes. Le sarcolemme (ou membrane plasmique des fibres musculaires) est pourvu de fines invaginations réparties régulièrement le long de la fibre (Figure H-5). Ces invaginations appelées tubules transverses ou tubules T pénètrent profondément au cœur de la fibre permettant la propagation des potentiels d'action au plus proche de l'appareil contractile. Les tubules T sont associés au réticulum sarcoplasmique (RS) très développé qui entoure chaque myofibrille (Figure H-5). Les citernes terminales du RS, lieu de stockage du calcium, enserrant le tubule T de part et d'autre formant ainsi la triade, structure permettant le couplage excitation-contraction (Figure H-5).



**Figure H-5 : Ultrastructure de la fibre musculaire squelettique.**

Chaque myofibrille est entourée de réticulum sarcoplasmique (RS), formé des citernes terminales et du RS longitudinal. L'association de 2 citernes terminales du RS de part et d'autre d'un tubule T forme la triade, lieu du couplage excitation-contraction. *Source : Tortora and Grabowski, 2001*

---

Le réticulum sarcoplasmique est divisé en deux parties. Les citernes terminales qui sont localisées à proximité des tubules T et contiennent les récepteurs à la ryanodine (RyRs), canaux calciques impliqués dans la libération massive de calcium lors du couplage excitation-contraction. La partie longitudinale du RS est moins développée et sa membrane contient, entre autre, les pompes calciques ATPases qui vont repomper le calcium dans la lumière du RS.

### ***3.2. Les protéines contractiles***

L'aspect strié des fibres est du à l'enchevêtrement des myofilaments épais de myosine et fins d'actine, formant une alternance de bandes A (anisotropique) sombres et de bandes I (isotropique) claires (Figure H-6 A). Les sarcomères, unités contractiles de la myofibrille, sont délimités par les disques Z, point d'ancrage des filaments fins d'actine (Figure H-6 A). La partie centrale du sarcomère, bande A, comprend la totalité de la longueur des filaments épais de myosine, alors que sa partie distale, bande I, est constituée de filaments fins d'actine (Figure H-6 A).

Les filaments épais de myosine sont formés d'environ 300 molécules de myosine, elles mêmes composées de deux molécules entrelacées (MHC, Myosine Heavy Chain) constituant les queues de myosine (Figure H-6 B). Chaque extrémité N-terminale des chaînes lourdes (MHC) s'associe à une chaîne légère de myosine (MLC, Myosine Light Chain) qui forme la tête de myosine dirigée vers les filaments fins d'actine (Figure H-6 B). Ces têtes globulaires de myosine comportent un site de liaison à l'actine ainsi qu'un site catalytique d'hydrolyse de l'ATP.

Les myofilaments fins sont constitués principalement de molécules d'actine rassemblées sous forme de chaînes tressées en hélice. Chaque molécule d'actine comporte un site actif sur lequel peut se fixer une tête de myosine. Un complexe protéique régulateur est associé à l'actine : la tropomyosine et la troponine (Figure H-6 C). La tropomyosine est une molécule fibillaire qui couvre le site actif de la molécule d'actine, inhibant ainsi la liaison actine-myosine. L'autre molécule régulatrice, la troponine, est un complexe de trois polypeptides : la troponine T, I et C (Figure H-6 C). La troponine T lie les autres troponines à la tropomyosine, la troponine C se lie avec le calcium et la troponine I inhibe la liaison actine-myosine en positionnant la tropomyosine sur le site actif de la molécule d'actine et en inhibant également l'activité ATPasique du complexe actine-myosine.

La contraction musculaire se fait par glissement des filaments d'actine et de myosine les uns sur les autres, permettant ainsi le raccourcissement des sarcomères.

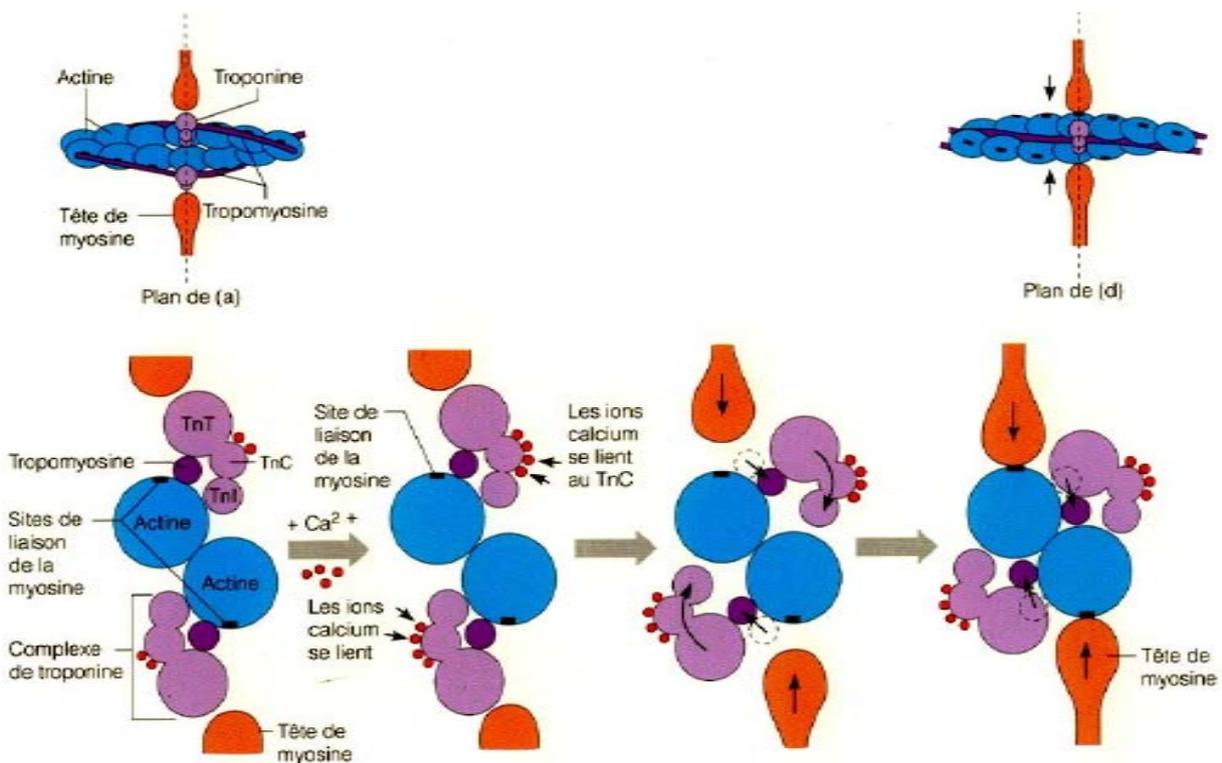
Outre les protéines contractiles (actine et myosine) et les protéines régulatrices (troponine, tropomyosine), les myofibrilles sont également composées de protéines structurales comme la titine ou la nébuline, contribuant au maintien de l'alignement de myofilaments ou à l'élasticité et l'extensibilité de la myofibrille.

#### **4. Les étapes de la contraction musculaire**

Une des propriétés du muscle squelettique est son excitabilité. L'initiation des phénomènes conduisant à la contraction musculaire est due à une stimulation nerveuse (Figure H-7). Au niveau de la jonction neuromusculaire, le neurone libère son neurotransmetteur (l'acétylcholine) induisant une dépolarisation membranaire de la fibre musculaire (Figure H-7), pouvant engendrer un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE). Le PPSE peut alors générer un potentiel d'action qui se propage le long du sarcolemme jusqu'au cœur de la fibre par le réseau de tubules T. Au niveau des triades, la dépolarisation membranaire induit un changement de conformation des canaux dépendants du voltage, les récepteurs à la dihydropyridine (DHPRs) localisés au niveau du sarcolemme (Figure H-7). Dans le muscle squelettique, ces récepteurs sont couplés physiquement aux canaux calciques du réticulum sarcoplasmique, les récepteurs à la ryanodine (RyRs), induisant alors leur ouverture (Figure H-7). Le calcium du réticulum sarcoplasmique jonctionnel, formé des citernes terminales, va donc être massivement libéré dans le cytoplasme de la cellule musculaire augmentant de 10 à 50 fois la concentration calcique intracellulaire basale (100 nM). Le calcium libéré dans le cytoplasme se lie à la troponine C qui va changer de conformation et faire basculer le complexe troponine-tropomyosine, libérant ainsi les sites actifs de l'actine (Figure H-8). La tropomyosine ne masque plus les sites de liaison de la myosine sur l'actine qui sont alors accessibles aux têtes de myosine : le cycle de contraction peut commencer. La contraction va également demander une source d'énergie, sous forme d'ATP, et le cycle de contraction aura lieu tant que la concentration en calcium et en ATP sera suffisante.

La relaxation musculaire intervient lorsque le taux de calcium cytoplasmique diminue et débute lors de l'arrêt de l'entrée de calcium dans le cytoplasme par l'inactivation des DHPRs et la repolarisation membranaire, stoppant la libération calcique des RyRs. Les pompes

calciques ATPases situées à la membrane du RS (les SERCAs) vont repomper le calcium contre son gradient de concentration dans la lumière du RS longitudinal, situé entre deux citernes terminales (Figure H-7). Le calcium va également être expulsé du cytoplasme vers le milieu extracellulaire par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la pompe calcium ATPase du sarcolemme (PMCA). Une autre partie du calcium pourra également être pompée par les mitochondries. Celles-ci participent activement à la contraction et à la relaxation musculaire en fournissant l'énergie nécessaire pour le raccourcissement des sarcomères et le repompage du calcium, sous forme d'ATP.



**Figure H-8 : Formation de la liaison actine-myosine.**

Après fixation du calcium sur la troponine C (TnC), celle-ci change de conformation libérant les sites de liaison de la myosine localisés sur l'actine. Ce site de liaison est alors accessible pour la tête de myosine qui peut alors se fixer à l'actine.

Source : site internet [www.webanatomy.net](http://www.webanatomy.net)

---

## II. Homéostasie calcique du muscle squelettique

Le calcium est un messager important au sein des cellules, car il intervient dans différentes voies de signalisation et divers processus biologiques. Le calcium nécessaire à ces fonctions cellulaires peut provenir du milieu extracellulaire ou des organites intracellulaires et la régulation de son homéostasie se fait grâce aux canaux calciques présents à la membrane de ces compartiments. L'homéostasie calcique du muscle squelettique fait intervenir des structures particulières dues à la fonction première de ce type cellulaire qui est la contraction musculaire.

### 1. Les voies d'entrée du calcium dans le cytoplasme

#### *1.1. Canaux calciques du sarcolemme*

##### 1.1.1. Récepteur aux dihydropyridines (canal calcique de type L)

Dans le muscle squelettique, le couplage excitation-contraction (CEC) aboutit à une libération massive de calcium dans le sarcoplasme nécessaire à la contraction musculaire. Ce mécanisme fait intervenir les récepteurs aux dihydropyridines (DHPRs) localisés au niveau du sarcolemme, ainsi que les récepteurs à la ryanodine (RyRs) situés sur la membrane du RS. Les DHPRs sont majoritairement présents au niveau des tubules T (Fosset et al., 1983).

La première hypothèse du concept de sensibilité à la variation de potentiel membranaire (voltage sensor) impliqué dans le CEC a été évoquée en 1973 par Schneider et Chandler (Schneider and Chandler, 1973). Par la suite, il a été proposé un possible lien physique entre le senseur de voltage et le canal calcique du RS (Chandler et al., 1976). L'un des candidats moléculaires à ces deux hypothèses était le DHPR. Il fait partie de la famille des canaux calciques dépendants du voltage ou « CaV » (voir Tableau T-1 pour la correspondance entre les différentes nomenclatures). Les CaV sont divisés en deux sous-familles : les canaux calciques activés par forte dépolarisation membranaire (HVA pour high voltage activated) et les canaux activés lors d'une plus faible dépolarisation membranaire (LVA, pour low voltage activated) à partir du potentiel membranaire de repos. Les canaux calciques de type CaV sont formés par différentes sous-unités suivant leur répartition tissulaire et possèdent leur propre pharmacologie (voir Tableau T-1). Les DHPRs sont des canaux calciques sensibles au voltage, appartenant aux HVA, et de type L (pour long lasting) pouvant générer un courant

calcique entrant durable (Cognard et al., 1986) s'activant lentement par dépolarisation des tubules T. Son implication dans les phénomènes de senseur de voltage et de couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique a été démontrée (Rios and Brum, 1987; Tanabe et al., 1988).

Le DHPR est formé de plusieurs sous unités :  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ , qui constituent un complexe protéique de 430 kDa (Campbell et al., 1988) arrangé en tétrades (Block et al., 1988), toutes les sous-unités sont membranaires sauf la sous-unité  $\beta$  qui est cytosolique (Figure H-9 A).

La sous-unité  $\beta$  est une sous-unité auxiliaire intracellulaire dont il existe quatre isoformes ( $\beta 1-4$ ) codées par des gènes distincts et pour lesquels il existe différents variants d'épissage (pour revue Hofmann et al., 1999). Cette sous-unité  $\beta$  est coexprimée avec la sous-unité  $\alpha$  dans tous les canaux HVA avec une stoechiométrie de 1:1. Ces sous-unités interagissent de manière physique (Borsotto et al., 1985; Takahashi et al., 1985; Leung et al., 1988) et cette association entre les différentes sous-unité  $\beta$  et  $\alpha$  se fait de manière tissu-dépendante. La sous-unité  $\beta$  aurait des effets complexes de modulation, régulation de la sous-unité  $\alpha$  pouvant ainsi moduler l'ouverture du canal et donc le courant résultant (pour revue, Lacinova, 2005). De plus, la sous-unité  $\beta 3$  augmente significativement l'affinité du canal pour les phenylalkilamines tels que le verapamil et le gallopamil.

La sous unité  $\alpha 1$  a été clonée et séquencée en 1987 (Tanabe et al., 1987). Elle est formée de quatre domaines (I à IV), eux-mêmes composés de 6 segments hydrophobes transmembranaires (S1 à S6) (Figure H-9 B). Le segment S4 de chaque domaine est chargé positivement et détecte ainsi les variations de potentiel, c'est le domaine senseur de voltage (Figure H-9 B). L'épingle à cheveux  $\beta$  (H5) localisée entre les segments S5 et S6 de chaque domaine participe à la formation du pore du canal ainsi qu'à sa sélectivité (pour revue, Melzer et al., 1995) (Figure H-9 B). La liaison entre la sous-unité  $\beta$  et  $\alpha 1$ , au niveau de la boucle cytoplasmique I-II, est importante pour les propriétés cinétiques d'activation et d'inactivation du canal (Pragnell et al., 1994). De même, le domaine I a un rôle crucial dans les différences cinétiques observées entre les DHPRs cardiaques (isoforme  $\alpha 1c$ ) et musculaires squelettiques (isoforme  $\alpha 1s$ ). Dans le muscle squelettique, le lien physique entre le DHPR et le RyR se fait par la boucle II-III cytoplasmique de la sous-unité  $\alpha 1s$  du DHPR (Tanabe et al., 1990; Leong and MacLennan, 1998) (Figure H-9 B et C).

Le complexe  $\alpha 2/\delta$  a été cloné en 1988 par Ellis et collaborateurs (Ellis et al., 1988). Ce complexe est formé de deux sous-unités : la sous-unité  $\alpha 2$  extracellulaire qui est liée à la sous-

---

unité  $\delta$  par un pont disulfure et ancre le complexe  $\alpha 2/\delta$  à la membrane via un seul segment transmembranaire, tout en stabilisant la sous-unité  $\alpha 1$  (De Waard et al., 1996 ; Gurnett et al., 1996) (Figure H-9 A). La sous-unité  $\alpha 2$  procure l'élément structural requis pour la stimulation du canal (Gurnett et al., 1996), alors que le domaine  $\delta$  recèle des régions importantes pour le déplacement de la courbe de disponibilité en fonction du potentiel du canal ainsi que pour la modulation cinétique de l'inactivation du canal (Felix et al., 1997). Les effets de modulation de l'activation et de l'inactivation du canal sont différents en fonction des isoformes des sous-unité  $\alpha 2/\delta$  ainsi que  $\alpha 1$  et  $\beta$  exprimées.

Quant à la sous-unité  $\gamma$  (isoforme  $\gamma 1$ ), elle est détectée seulement dans le muscle squelettique (Jay et al., 1990) mais elle n'est cependant pas essentielle dans la libération calcique contrôlée par le voltage (Ursu et al., 2001). L'absence de la sous-unité  $\gamma 1$  provoque une augmentation du courant calcique de type L dans les myotubes néonataux provenant de souris déficientes en sous-unité  $\gamma 1$  ( $\gamma 1^{-/-}$ ) par rapport aux souris exprimant cette sous-unité (Held et al., 2002). Cette différence est également observée dans des myotubes issus de souris âgées de 2 semaines. En revanche, ce courant calcique diminue entre 2 et 4 semaines après la naissance chez les souris  $\gamma 1^{-/-}$ , et plus tardivement chez la souris  $\gamma 1^{+/+}$  (Held et al., 2002). L'expression transitoire de la sous-unité  $\gamma 1$  dans les myotubes provenant de culture primaire de souris  $\gamma 1^{-/-}$  permet de retrouver un courant calcique de type L comparable à celui présent chez les souris  $\gamma 1^{+/+}$  (Held et al., 2002). Il a également été observé une altération du stade inactif stable dans les cellules musculaires déficientes en sous-unités  $\gamma 1$  (Held et al., 2002). Cette constatation a été confirmée par Ursu et collaborateurs en 2004, par la mise en évidence d'une altération spécifique de l'inactivation dépendante du voltage du canal calcique de type L, par la sous-unité  $\gamma 1$  dans des fibres matures de muscles de souris (Ursu et al., 2004). L'AMPC intervient sur la modulation du courant calcique de type L, mais son action serait régulée par la sous-unité  $\gamma 1$ . En effet, en absence de la sous-unité  $\gamma 1$ , le canal serait phosphorylé par une protéine kinase dépendante de l'AMPC et serait plus actif (Held et al., 2002). Dans une étude récente, il a également été démontré que la sous-unité  $\gamma 1$  du DHPR pouvait jouer le rôle d'un antagoniste calcique endogène et permettrait de protéger la cellule musculaire squelettique des libérations calciques incontrôlées dans certaines conditions de fatigue extrême de la cellule, menant à une dépolarisation partielle de la membrane (Andronache et al., 2007).

Le DHPR est un canal sensible aux dihydropyridines (exemple : nifédipine) (sites de liaisons extracellulaires) (Figure H-9 B), aux phenylalkylamines (exemple : verapamil) (sites de liaisons intracellulaires) et aux benzothiazépines (exemple : dilitiazem).

De par ses différentes propriétés, ce canal est donc impliqué dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique par son lien physique avec le RyR via sa boucle II-III cytoplasmique (Figure H-9 C). Il fait entrer, en faible quantité, du calcium dans la fibre musculaire lors de la dépolarisation, ce calcium participant peu au CEC (Cognard et al., 1992b).

### 1.1.2. Canal calcique de type T

A des stades précoces du développement, les cellules musculaires squelettiques présentent un courant calcique de type T (pour transient), cohabitant avec le courant calcique porté par les DHPRs de type L. Contrairement au courant de type L, ce courant calcique est activé à des potentiels membranaires plus négatifs (LVA, pour low voltage activated), et présente une activation et une inactivation rapide (Cognard et al., 1986; Beam and Knudson, 1988). Au cours du développement des cellules musculaires, le courant calcique de type L devient majoritaire par rapport à celui de type T (Cognard et al., 1992b). Les canaux calciques de type T ne sont pas ou peu sensibles aux dihydropyridines et autres bloqueurs de DHPR. Depuis quelques années, de nouvelles molécules plus spécifiques aux canaux calciques de type T ont été développées, comme le mibefradil qui est dérivé du tétralol (Liu et al., 1999), l'amiloride ou le nickel (Bijlenga et al., 2000) (voir Tableau T-1).

Ces canaux calciques sont des cibles thérapeutiques dans les pathologies cardiaques telles que l'hypertension, ainsi que dans des pathologies neurologiques, principalement l'épilepsie. Le rôle de ces canaux n'est pas bien déterminé dans les cellules musculaires squelettiques, mais l'utilisation des nouvelles molécules a permis de démontrer leur implication dans la fusion des myoblastes (Bijlenga et al., 2000).

### 1.1.3. Récepteur nicotinique

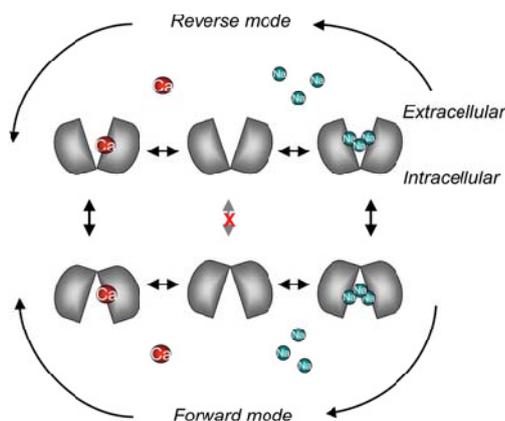
Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) est un canal cationique pentamérique ligand-dépendant. Il laisse principalement transiter les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , mais il peut également laisser passer des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces canaux sont présents dans divers types cellulaires, notamment dans les cellules musculaires, les neurones, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires ou encore les kératinocytes (Fucile, 2004). Dans les cellules musculaires, les

récepteurs nicotiques permettent la transmission du signal au niveau de la jonction neuromusculaire. Dans les cellules musculaires embryonnaires, ces canaux sont composés des sous-unités  $\alpha 1$  (x2),  $\beta 1$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  alors que dans les cellules musculaires adultes ce sont les sous-unités  $\alpha 1$  (x2),  $\beta 1$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  qui le composent. Les récepteurs nicotiques des cellules musculaires embryonnaires sont plus perméables au calcium que ceux des cellules musculaires adultes (Fucile, 2004).

#### 1.1.4. Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

La fonction majeure de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  est l'extrusion du calcium vers le milieu extracellulaire dans les conditions normales (voir paragraphe 2.2.2 de ce chapitre), mais il peut aussi fonctionner en mode inverse et faire entrer du calcium dans le cytoplasme (Lytton, 2007). La stœchiométrie de l'échange est de 1 ion  $\text{Ca}^{2+}$  pour 3 ions  $\text{Na}^+$  dans les conditions physiologiques normales (Donoso and Hidalgo, 1989), mais il peut également faire des échanges du type  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$  (Reeves and Sutko, 1983). Il existe 3 isoformes d'échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX pour  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger) : NCX1, NCX2 et NCX3 qui est l'isoforme présente dans le muscle squelettique (Lytton, 2007).

L'activité des NCXs est réversible et le sens des mouvements ioniques dépend des gradients électrochimiques des ions transportés, ce transport ne nécessite donc pas d'ATP (Figure H-10). Quand la membrane est dépolarisée et que la concentration en  $\text{Na}^+$  augmente, les échangeurs peuvent fonctionner en mode inverse et faire entrer une petite quantité d'ions calcium. Après la dépolarisation membranaire et lorsque la concentration calcique intracellulaire est élevée, les NCXs fonctionnent en mode normal et permettent l'extrusion de calcium.



**Figure H-10 : Mécanismes d'échange des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  par NCX.**

En mode normal (forward mode), l'échangeur fait entrer 3 ions  $\text{Na}^+$  et sortir 1 ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. En mode inverse (reverse mode), il fait entrer 1 ion  $\text{Ca}^{2+}$  et il fait sortir 3 ions  $\text{Na}^+$ .

Source : Lytton, 2007.

### 1.1.5. Les canaux TRPs (transient receptor potential)

L'étude du système de photo-transduction de la lumière en signal nerveux a permis de mettre en évidence une mutation chez la drosophile se caractérisant par une réponse transitoire des cellules photoréceptrices à la lumière, d'où le nom de « transient receptor potential » (TRPs) (Cosens and Manning, 1969).

La superfamille des TRPs comporte 7 sous-familles pour lesquelles la plupart des canaux cationiques membranaires sont principalement perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces 7 sous familles sont les TRPCs (canonical), TRPVs (vanilloïd), TRPMs (melastatin), TRPPs (polycystin), TRPMLs (mucolipin), TRPAs (ankyrin) et TRPNs (No mechanosensitive). Les canaux calciques formés par les TRPs ne sont pas sensibles au voltage mais peuvent être activés de diverses manières : (i) par la liaison d'un ligand sur son récepteur, ce sont les ROCs (receptor-operated channels) (Bolton, 1979), (ii) par la vidange des stocks calciques intracellulaires (déplétion du RS), ce sont les SOCs (store-operated channels) (Putney, Jr., 1986) ou (iii) par l'étirement de la membrane plasmique de la cellule, ce sont les SACs (stretch-activated channels) (Guharay and Sachs, 1984). Les TRPs sont tous formés de 6 segments transmembranaires, la boucle localisée entre les segments 5 et 6 formant le pore du canal. Les TRPs s'assemblent à la membrane plasmique en homo ou hétérotétramère pour former plusieurs types de canaux cationiques (ROCs, SACs ou SOCs). Les SOCs ont été caractérisés pour la première fois en 1986 par Putney qui a décrit une entrée capacitative de calcium (CCE, capacitative calcium entry) dans des cellules non excitables après déplétion calcique du réticulum endoplasmique. Il a été expérimentalement démontré que l'utilisation de molécules permettant la vidange calcique du RS, active une entrée capacitative de calcium (Gonzalez et al., 1995). Le mécanisme d'activation des SOCs est encore mal défini mais il existe cependant trois hypothèses (Figure H-11).

- Le couplage chimique par messenger diffusible : lors de la déplétion des stocks, un messenger serait libéré par le RS dans le cytoplasme diffusant jusqu'à la membrane où il activerait l'ouverture des canaux (Randriamampita and Tsien, 1993). La nature de ce facteur (CIF, calcium influx factor) est encore sujette à controverse mais serait un acide phosphorylé avec un poids moléculaire inférieur à 500 Da (Guibert et al., 2008).
- Le couplage conformationnel : l'activation des SOCs se ferait par un lien direct (protéine-protéine) entre le compartiment de stockage intracellulaire de calcium et

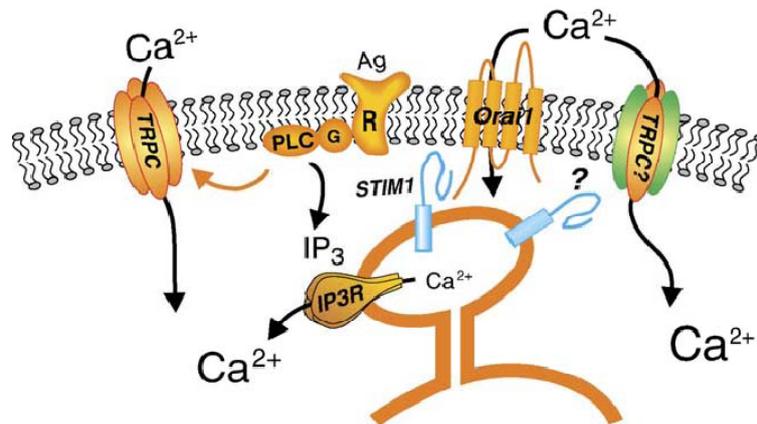
le canal CCE membranaire (Irvine, 1990). De nouvelles entités moléculaires, STIM1 (stromal interaction molecule 1) et Orai1, sont proposées dans ce mode d'activation des SOCs (Feske et al., 2006; Zhang et al., 2005) (mécanisme d'action détaillé dans le paragraphe suivant).

- La fusion vésiculaire : les SOCs seraient présents dans des vésicules cytosoliques et fusionneraient avec la membrane plasmique lors de la déplétion des stocks, via un mécanisme exogène (Holda and Blatter, 1997).

Certains canaux TRPs peuvent être activés par le diacylglycerol (DAG) (Venkatachalam et al., 2003) ou par un analogue du DAG (OAG) et inhibés par le 2-aminoéthoxydiphényl borate (2-APB) et le 1-(beta-[3-(4-méthoxy-phényl)propoxy]-4-méthoxyphényl)-1*H*-imidazole hydrochloride (SKF-96365). Les TRPs impliqués dans la formation des SOCs sont les TRPC1, 2, 4 et 5 ; le TRPV6 et le TRPP2.

De récentes études ont montré la possible implication de nouvelles molécules dans la formation des SOCs, STIM1 et Orai1 (Feske et al., 2006; Zhang et al., 2005) (Figure H-12). STIM1 est une protéine membranaire du réticulum endoplasmique (RE), avec un seul domaine transmembranaire possédant une structure « EF hand » localisée dans la lumière du RE et pouvant servir de senseur de calcium (Roos et al., 2005 ; Yeromin et al., 2004) (Figure H-12). Lors de la déplétion des stocks internes de calcium, STIM1 pourrait migrer à la membrane plasmique et participer à la multimérisation du canal, sans entrer dans la composition du pore du canal (Ong et al., 2007). Orai1 est une protéine présente à la membrane plasmique de la cellule et comporte 4 domaines transmembranaires (Figure H-12). Elle serait impliquée dans la composition du pore des SOCs (Prakriya et al., 2006; Yeromin et al., 2006). Plusieurs mécanismes d'action de STIM1 pour activer les SOCs après la déplétion des stocks calciques sont proposés (Guo and Huang, 2008). La première hypothèse suppose qu'il y ait un pool de STIM1 à la membrane plasmique de la cellule et que lors de la déplétion, les STIM1 localisés dans la membrane du RE entrent en interaction avec ceux de la membrane de la cellule. La deuxième hypothèse propose que la majorité des STIM1 soit localisée dans la membrane du RE avant la déplétion puis soit transportée à la membrane plasmique pour s'y insérer et activer le canal. Il existe également STIM2, exprimé seulement de façon intracellulaire (Wissenbach et al., 2007), exerçant un fort effet inhibiteur sur l'activation des SOCs dans divers types cellulaires (Soboloff et al., 2006). Il semblerait que la liaison entre STIM1 et STIM2 empêche le transfert de STIM1 à la membrane plasmique

(Dziadek and Johnstone, 2007). Toutes ces études ont permis d'établir que STIM1 et Orai1 sont nécessaires et suffisantes à l'activation d'un courant calcique. Par ailleurs, des études récentes ont montré que STIM1 pourrait interagir avec TRPC1 (Lopez et al., 2006; Huang et al., 2006).



**Figure H-12 : Fonctionnement de STIM1 et Orai1.**

La déplétion des stocks calciques au niveau du RE est détectée par le domaine EF hands de STIM1 localisé dans la membrane du RE. Celui-ci peut alors se dimériser avec Orai1 qui forme le canal calcique.

Source : Smyth et al., 2006.

## 1.2. Canaux calciques du réticulum sarcoplasmique

La majorité du stock intracellulaire de calcium est localisée dans le réticulum endoplasmique, appelé réticulum sarcoplasmique dans les muscles striés. Cette organelle contient des canaux calciques spécialisés : les récepteurs à la ryanodine (RyRs, ryanodine receptors) et les récepteurs à l'inositol trisphosphate (IP3Rs, inositol trisphosphate receptors). Ces canaux présentent certaines homologues, notamment au niveau du pore du canal (Mignery et al., 1989 ; Shah and Sowdhamini, 2001), mais leur mode d'activation principal est différent.

Les canaux calciques impliqués dans la libération massive de calcium, pour la contraction musculaire, sont localisés au niveau des citernes terminales du RS. Cette région contient également des protéines à forte capacité de stockage de calcium : sarculémine, calréticuline, calséquestrine ou encore l'histidine-rich  $\text{Ca}^{2+}$  binding-protéine (Wang et al., 1998 ; MacLennan, 2000). Ces protéines permettent de stocker le calcium en grande quantité dans le RS, tout en conservant une concentration en ion  $\text{Ca}^{2+}$  libre intraluminal non toxique.

### 1.2.1. Les récepteurs à la ryanodine

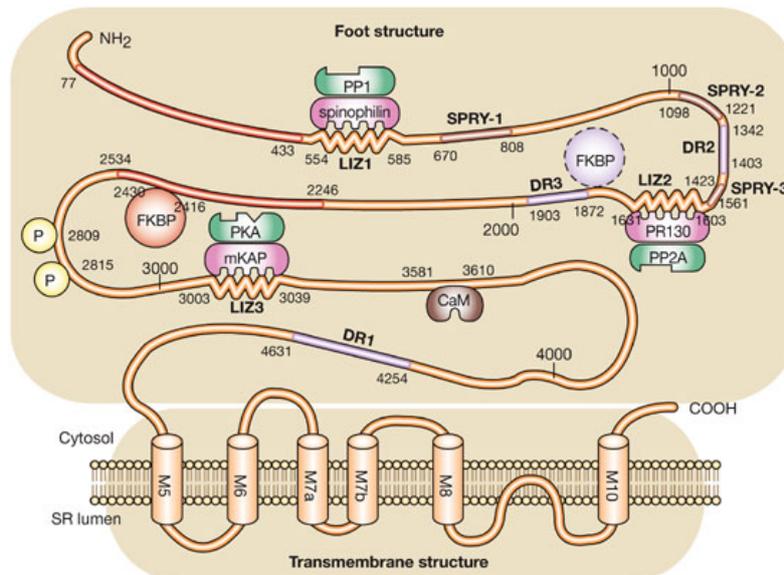
Ces canaux calciques ont été découverts par leurs caractéristiques pharmacologiques de haute affinité avec un alcaloïde d'origine végétale, la ryanodine, extraite d'une plante d'Amérique du sud (*Ryania speciosa*). L'effet pharmacologique de la ryanodine sur les muscles squelettiques a été démontré en 1969 par Jenden et Fairhurst et a donné le nom de récepteur à la ryanodine à ces canaux calciques (Jenden and Fairhurst, 1969).

#### 1.2.1.1. Structure et fonction des récepteurs à la ryanodine

Il existe trois isoformes majeures de récepteurs à la ryanodine chez les mammifères (RyR1, RyR2 et RyR3) (Figure H-13 A) pour lesquels il existe des variants d'épissage. Chaque isoforme est codée par un gène qui lui est propre, ces 3 gènes étant localisés sur différents chromosomes (Marks et al., 1989). Ces canaux sont ubiquitères et spécifiquement répartis selon les types de cellules musculaires. L'isoforme RyR1 est prédominante dans le muscle squelettique et localisée au niveau des citernes terminales du RS (Takeshima et al., 1989 ; Zorzato et al., 1990) (Figure H-13 B et C). Il existe deux variants d'épissage de ce type de RyR en fonction du développement dus à deux régions d'épissage, ASI et ASII (Futatsugi et al., 1995). La perte des résidus correspondant à ces régions d'épissage donne lieu à des variants de RyR1 dénommés ASI(-)RyR1 ou ASII(-)RyR1. Le variant ASI(-)RyR1 est le seul présent au stade embryonnaire et la forme ASI(+)-RyR1 augmente graduellement au cours du développement pour devenir majoritaire chez l'adulte. Quant au variant ASII(-)RyR1 il devient prédominant lors du 1<sup>er</sup> jour postnatal et diminue avec le temps. Le ratio ASII(+)-RyR1/ASII(-)RyR1 augmente rapidement après la naissance. La différence d'expression de ces variants d'épissage au cours du développement pourrait expliquer le fait que le couplage excitation-contraction du muscle squelettique par lien physique entre le RyR1 et le DHPR apparait à un stade tardif du développement (Takekura et al., 2001). La protéine RyR2 est la plus abondante dans le muscle cardiaque (Nakai et al., 1990; Otsu et al., 1990). Quant à l'isoforme RyR3, elle est principalement retrouvée dans le cerveau (Hakamata et al., 1992), mais aussi dans les muscles striés (Tarroni et al., 1997). Ces protéines sont aussi présentes dans les muscles lisses sans discrimination d'isoforme (Ledbetter et al., 1994).

Les récepteurs à la ryanodine sont des homotétramères dont la sous unité possède un poids moléculaire d'environ 560 kDa (Hamilton and Serysheva, 2009). Ils présentent un très large domaine cytoplasmique s'étendant sur environ 90% de la séquence d'acides aminés. Cette

partie cytoplasmique constituée des domaines C et N-terminaux des monomères est appelée le « pied » du récepteur à la ryanodine (Figure H-14). Le pore du canal est situé au niveau de l'extrémité C-terminale, formant plusieurs segments transmembranaires (Zalk et al., 2007). Le nombre de segments transmembranaires n'est pas encore bien défini. Les prévisions les plus anciennes suggéraient 4 à 12 segments transmembranaires entrant dans la composition du pore du canal (Zalk et al., 2007), alors que les modèles les plus récents prédisent 6 à 8 segments transmembranaires (Du et al., 2002) (Figure H-14). La partie C-terminale serait impliquée dans la sélectivité du canal (Bhat et al., 1997), alors que le domaine N-terminal plus imposant serait la cible de fixation de plusieurs molécules tels que la calmoduline ou le calcium, et contiendrait également divers sites de phosphorylation (Hakamata et al., 1992), pouvant ainsi moduler l'ouverture du pore du canal (Figure H-14).

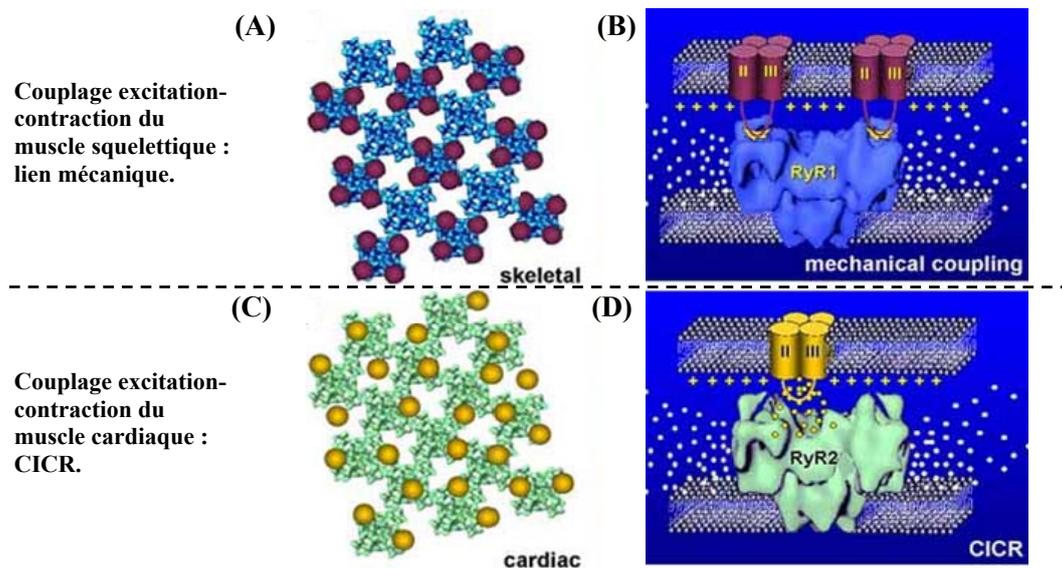


**Figure H-14** : Schématisation de la structure générale des RyRs.

Le pore du canal est ici représenté par 6 segments transmembranaires (M5, M6, M7a, M7b, M8 et M10). Les domaines C et N-terminaux sont cytoplasmiques et forment le pied du canal (foot structure). L'extrémité N-terminale comporte différentes zones de régulation du canal. *Source* : Yano et al., 2006.

Le rôle principal des RyRs dans les muscles striés est le couplage-excitation contraction. C'est l'isoforme RyR1 qui intervient dans le muscle squelettique et l'isoforme RyR2 dans le muscle cardiaque. Ces deux isoformes n'ont pas le même mode d'action dans ces deux types cellulaires (Figure H-15). Dans le muscle squelettique, la libération de calcium par les RyR1 est déclenchée par une interaction physique directe entre les canaux dépendants du voltage (DHPRs) et les RyRs (Proenza et al., 2002) (Figure H-15 A et B). Lors de la dépolarisation membranaire, les DHPRs vont changer de conformation et activer les RyRs. Les DHPRs sont

assemblés en tétrades à la membrane des tubules T (Figure H-15 A). Juxtaposé en face de chaque tétrade de DHPRs, se trouve un canal RyR1 à la membrane du RS (Fill and Copello, 2002) (Figure H-15A). La distance séparant la membrane du tubule T et celle du RS permet l'interaction physique entre les deux types de canaux, assurant une transduction du signal plus rapide (Figure H-15 B). Il semblerait que deux régions du RyR1 interviendraient dans l'interaction physique avec les DHPRs, nommées R9 (acides aminés 2659 à 3720) et R10 (1635 à 2636) (Nakai et al., 1998; Proenza et al., 2002). Dans les cellules musculaires cardiaques, les récepteurs à la ryanodine de type 2 ne sont pas couplés physiquement avec les DHPRs (Figure H-18 C et D). L'activation des RyR2 se fait donc par le phénomène de « calcium-induced calcium-release » (CICR). En effet, lors du potentiel d'action cardiaque, les DHPRs sont activés et vont laisser entrer du calcium extracellulaire dans la cellule. Le calcium transitant par les DHPRs va activer les RyR2 et générer une libération massive de calcium du RS (Fill et al., 2002). Au niveau structural, les DHPRs ne semblent pas être associés en tétrades dans les cellules musculaires cardiaques (Figure H-15 C).



**Figure H-15** : Les deux mécanismes de couplage excitation-contraction : lien mécanique et CICR.

(A). Arrangement en tétrade des DHPRs (roses), couplés aux RyR1 (bleus), au sein des cellules musculaires squelettiques.

(B). Schématisation du lien mécanique du couplage excitation-contraction du muscle squelettique.

(C). Les DHPRs (jaunes) couplés au RyR2 (verts), ne sont pas arrangés en tétrades dans le muscle cardiaque.

(D). Schématisation du couplage excitation-contraction par CICR dans le muscle cardiaque.

Source : modifié d'après Protasi, 2002.

### 1.2.1.2. Régulation des RyRs

- Régulation par le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$

Les récepteurs à la ryanodine sont activés à de faibles concentrations de calcium cytoplasmique (1-10  $\mu\text{M}$ ) et inhibés à des concentrations en ions  $\text{Ca}^{2+}$  plus élevées (1-10 mM) (Bull and Marengo, 1993). Cependant, la sensibilité à de fortes concentrations calciques cytoplasmiques semble différer selon les isoformes. En effet, les RyR1 sont entièrement inhibés avec 1mM de calcium cytoplasmique ce qui n'est pas le cas pour les RyR2 et RyR3. Le calcium luminal pourrait également réguler l'activité des canaux calciques RyRs (Donoso et al., 1995) par fixation sur des sites de liaisons spécifiques (Ching et al., 2000).

L'ion  $\text{Mg}^{2+}$  cytoplasmique est connu pour être un inhibiteur des récepteurs à la ryanodine (Lai et al., 1988; Laver et al., 1997). L'action du magnésium sur les RyRs n'est pas totalement élucidée mais il semble que cet ion entrerait en compétition avec le calcium au niveau des sites de liaison cytoplasmiques.

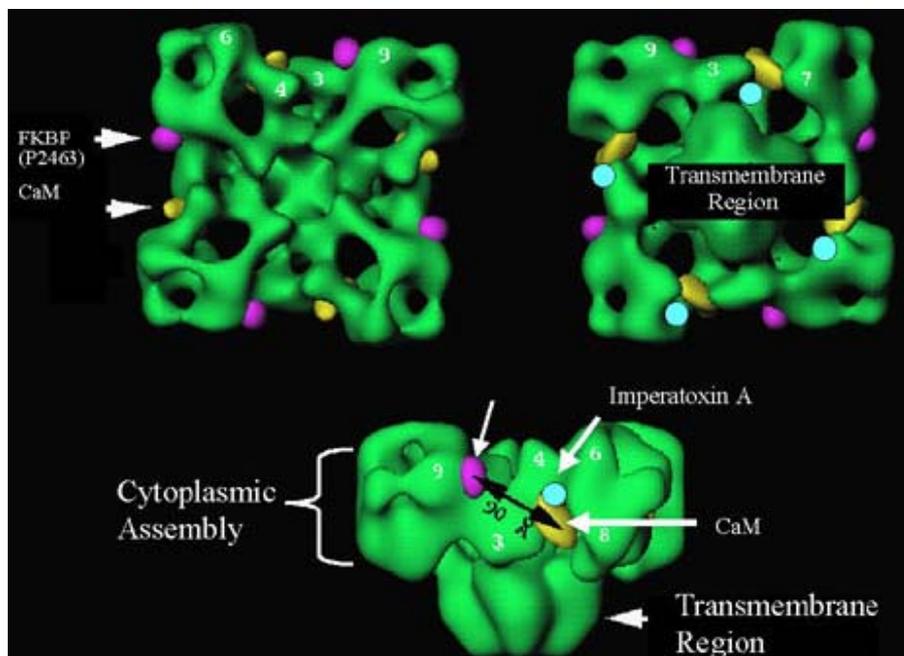
- Régulation par l'ATP, la calmoduline et le FKBP12

L'ATP cytosolique est un activateur des récepteurs à la ryanodine (Sonnleitner et al., 1997). Dans les conditions physiologiques, l'ATP forme un complexe avec le magnésium et c'est sous cette forme qu'il est le plus abondant. Cependant, il semblerait que ce soit sous sa forme libre qu'il régule les RyRs (Sonnleitner et al., 1997). L'action de l'ATP est également dépendante des isoformes, le type 1 des RyRs étant le plus sensible à son action.

La calmoduline a été le premier peptide dont l'interaction avec les récepteurs à la ryanodine a été mise en évidence dans des bicouches lipidiques (Smith et al., 1989) (Figure H-16). L'application de la calmoduline, qui est une calciprotéine, active les RyR1 et RyR3 à de faibles concentrations calciques (inférieures à 1  $\mu\text{M}$ ) et inhibe leur activité à des concentrations calciques élevées (supérieures à 1  $\mu\text{M}$ ) (Smith et al., 1989; Tripathy et al., 1995). Pour l'isoforme cardiaque des récepteurs à la ryanodine (RyR2), seule l'action inhibitrice de la calmoduline a été observée (Fruen et al., 2000).

Le FKBP12 et FKBP12.6 sont des protéines appartenant à la famille des FK506 binding protein (FKBP) qui sont des immunophilines, récepteurs de la molécule immunosuppressive FK506 (voir également chapitre II, partie 5.2.1). Ces protéines peuvent s'associer avec les RyRs dans des proportions stœchiométriques de 4 FKBP pour 1 tétramère RyR (1FKBP par monomère) (Timerman et al., 1993; Jayaraman et al., 1992) (Figure H-16). L'action

principale de la liaison des FKBP avec les RyRs serait de stabiliser le canal calcique dans les stades ouverts et/ou fermés du canal, mais également de permettre la synchronisation de plusieurs canaux voisins (Marx et al., 1998; Sattelle et al., 2008), tout en diminuant la probabilité d'ouverture des canaux (Kaftan et al., 1996). Inversement, la rupture de l'interaction entre FKBP et RyR augmente la probabilité d'ouverture du canal et renforce le signal calcique dépendant des RyRs (Ahern et al., 1994; Mayrleitner et al., 1994 ; Brillantes et al., 1994; McCall et al., 1996). En revanche, l'action de ces protéines sur l'isoforme cardiaque des RyRs (RyR2) n'est pas encore élucidée et son action est controversée. La modulation des RyR1 dans les muscles squelettiques par les FKBP est généralement acceptée (Qi et al., 1998), et son site de liaison sur le RyR serait proche de celui de la calmoduline (Wagenknecht et al., 1997) (Figure H-16). De plus, l'interaction FKBP12/RyR2 semble être modulée par l'ADP ribose cyclique, conduisant à l'activation de RyR2 (Fritz et al., 2005). Cette activation se ferait par découplage du FKBP12 et du RyR2, engendrant une augmentation de libération calcique, permettant ainsi d'amplifier le signal en recrutant les RyR1 par mécanisme de CICR. Il avait également été démontré que l'ADP ribose cyclique pouvait activer la libération calcique provenant des RyRs (Kuemmerle and Makhlof, 1995).



**Figure H-16 :** Représentation en 3 dimensions du RyR et localisation des sites de liaison du FKBP et de la calmoduline (CaM).

Source : Fleischer, 2008. d'après Wagenknecht and Radermacher, 1997.

- Effet de la ryanodine

La ryanodine est un alcaloïde d'origine végétale qui se lie avec une forte affinité aux RyRs. Son action induit un changement de conformation du canal de façon identique sur les 3 isoformes des RyRs. Cette action varie selon la concentration en ryanodine utilisée. A de faibles concentrations ( $\sim 10$  nM), la ryanodine augmente la fréquence d'ouverture du canal à un niveau de conductance normal (Buck et al., 1992). A des concentrations intermédiaires ( $\sim 1$   $\mu$ M), elle produit des événements d'ouverture du canal prolongés et elle réduit simultanément la conductance ionique du pore (Rousseau et al., 1987; Smith et al., 1988). En revanche, utilisée à forte dose ( $\sim 100$   $\mu$ M) elle inhibe le canal et bloque la libération de calcium (Zimanyi et al., 1992). Le site de liaison de la ryanodine sur les RyRs a été expérimentalement localisé au niveau du domaine C-terminal, entrant dans la structure du pore du canal (Callaway et al., 1994).

D'autres phénomènes entrent en jeu dans la régulation des RyRs, comme la phosphorylation des canaux par la protéine kinase A (PKA), qui activerait ces canaux. Il existe également d'autres molécules pouvant inhiber la libération calcique à travers ces canaux, tel que le rouge de ruthénium. Des toxines provenant de venin d'un scorpion africain *Pandinus imperator* peuvent activer ou inhiber les RyRs, ce sont les imperatoxines. L'imperatoxine A (IpTx<sub>a</sub>) est un peptide d'environ 33 acides aminés et active les RyRs avec une haute affinité (el Hayek et al., 1995; Zamudio et al., 1997b). Quant à l'imperatoxine I (IpTx<sub>i</sub>) c'est une protéine hétérodimérique d'une quinzaine de kDa qui a la propriété d'inhiber les RyRs (Zamudio et al., 1997a; Valdivia et al., 1992).

### 1.2.2. Les récepteurs à l'IP3

Les récepteurs à l'IP3 (IP3Rs) sont des canaux calciques ligand-dépendants. Ils sont activés par la liaison de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) qui est un second messenger résultant du métabolisme du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) (Berridge and Irvine, 1984) (Figure H-17). En effet, en réponse à une stimulation par un agoniste, les récepteurs transmembranaires couplés à des protéines G peuvent activer une phospholipase C (PLC). Cette PLC, activée par une protéine G, hydrolyse le PIP<sub>2</sub> membranaire en diacylglycérol (DAG) qui reste membranaire et en IP3 diffusant dans le cytosol (Berridge et al., 1984) (Figure H-17). La liaison de l'IP3 sur son récepteur induit une activation de celui-ci et donc l'ouverture du canal libérant le calcium du stock vers le cytosol, permettant ainsi la

transduction et/ou l'amplification du signal cellulaire (Berridge et al., 1984), que ce soit dans des cellules excitables ou non (Figure H-17). Les récepteurs à l'IP3 les plus sensibles à l'IP3 sont ceux de type 2, puis ceux de type 1 et enfin les moins sensibles à l'IP3 sont ceux de type 3 (Miyakawa et al., 1999). Ces canaux calciques intracellulaires sont retrouvés dans divers tissus, tels que le cerveau, les tissus nerveux, le foie, les reins, au sein desquels ils sont impliqués dans des processus biologiques variés incluant entre autres la sécrétion d'hormones, l'expression de gènes ou encore la prolifération cellulaire.

#### 1.2.2.1. Origine et structure

Les récepteurs à l'IP3 ont été purifiés pour la première fois dans du tissu provenant du cerebellum (Supattapone et al., 1988), suite à l'observation de la forte capacité de ce tissu à lier l'IP3 à forte densité (Worley et al., 1987a). En 1991, Maeda et collaborateurs ont démontré l'arrangement en homotétramère des IP3Rs (Maeda et al., 1991) (Figure H-18 A).

Le récepteur à l'IP3 a été cloné pour la première fois à partir d'ADNc provenant du cerveau (Furuichi et al., 1989; Mignery et al., 1990). De nos jours, 3 isoformes des IP3Rs sont bien connus (IP3R-1, IP3R-2 et IP3R-3), codés par 3 gènes distincts (Nakagawa et al., 1991). Cependant, la présence d'une quatrième isoforme de récepteur à l'IP3 a été évoquée (Ross et al., 1992). Les isoformes 2 et 4 présentant de fortes similarités, l'hypothèse qu'elles soient issues de l'épissage d'un même gène a été avancée (Ross et al., 1992). Toutefois des informations supplémentaires de la séquence de ces gènes entiers de ces isoformes sont requises afin de déterminer leur lien véritable avec les IP3Rs.

Chez les mammifères, les 3 isoformes IP3R-1, IP3R-2 et IP3R-3 sont exprimées et possèdent une homologie de séquence d'environ 65% avec des propriétés distinctes, un poids moléculaire d'environ 300 kDa et une séquence d'environ 2700 acides aminés. Il existe trois variantes de récepteur à l'IP3 de type 1 (SI, SII et SII), qui résultent de la présence de sites d'épissage alternatif (Nakagawa et al., 1991; Ross et al., 1992; De Smedt et al., 1994). Bien qu'étant ubiquitaires, les différentes isoformes des IP3Rs peuvent être majoritaires dans certains tissus. L'IP3R-1 est l'isoforme privilégiée des tissus nerveux, notamment le cervelet (De Smedt et al., 1997), mais il est également présent dans des lignées cellulaires de muscle squelettique (Balghi et al., 2006a) et dans le cœur. La localisation principale de l'isoforme IP3R-2 est le foie, alors que l'IP3R-3 se retrouve majoritairement dans le muscle lisse mais également dans le muscle squelettique (De Smedt et al., 1997).

La région du canal calcique possède des homologies de séquences avec la région du canal du récepteur à la ryanodine. Cette région du canal est localisée au niveau du domaine C-terminal (Nakade et al., 1991), caractérisée par 6 segments transmembranaires et la projection cytoplasmique de l'extrémité C-terminale (Jiang et al., 2002) (Figure H-18 B et D). La séquence du pore du canal possède des similarités de structures avec celles des canaux potassiques et calciques dépendants du voltage. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer la sélectivité calcique du canal au niveau du résidu Asp2550 (Boehning et al., 2001). La partie N-terminale correspond au domaine de liaison à l'IP<sub>3</sub>, des résidus 224 à 578 (Yoshikawa et al., 1999) (Figure H-18 B). De multiples sites du domaine N-terminal sont nécessaires à la liaison de l'IP<sub>3</sub> sur son récepteur, mettant en évidence une structure tertiaire de la protéine, correspondant à une poche de liaison à l'IP<sub>3</sub> (Yoshikawa et al., 1996; Yoshikawa et al., 1999; Bosanac et al., 2002) (Figure H-18 B). Il est intéressant de noter que l'extrémité N-terminale d'une sous-unité peut se lier à l'extrémité C-terminale de la sous-unité adjacente du tétramère (Boehning and Joseph, 2000), permettant de former une liaison plus stable au sein du tétramère (Figure H-18 A). Entre le domaine N-terminal de liaison à l'IP<sub>3</sub> et le domaine C-terminal du pore, se trouve le domaine central correspondant au domaine de régulation du canal, contenant des sites de liaison au calcium, à la calmoduline et autres facteurs de modulation (Figure H-18 C). L'étude de la structure en 3 dimensions de l'IP<sub>3</sub>R a montré deux stades conformationnels du récepteur, l'un en carré et l'autre en moulin à vent (Hamada et al., 2002). La conversion d'un état à l'autre est régulée par le calcium.

#### 1.2.2.2. Localisation intracellulaire et rôle de l'IP<sub>3</sub>R

Des études ont montré une localisation intracellulaire des récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, notamment au niveau des sites de libérations calciques du RE et de l'appareil de Golgi (Lin et al., 1999). Les IP<sub>3</sub>R ont également été identifiés dans des granules sécrétoires et à la membrane plasmique des cellules (Khan et al., 1992) et plus récemment au niveau du réticulum nucléoplasmique (Leite et al., 2003; Echevarria et al., 2003). La localisation des IP<sub>3</sub>R dans différents organelles des cellules suggère leur implication dans une multitude de processus biologiques.

L'implication des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> lors de libérations calciques au sein du muscle reste controversée. Cependant, leur présence et leurs fonctionnalités ont été établies au début des années 80. En effet, en 1986, Volpe et collaborateurs ont proposé une hypothèse d'implication des IP<sub>3</sub>R dans les libérations calciques au sein des cellules musculaires, basée sur des

travaux effectués par différentes équipes (Volpe et al., 1986). Ils y recensent la localisation de libérations calciques médiées par les IP3Rs au niveau des citernes terminales des tubules-T et du RS des fibres pelées (Volpe et al., 1985; Vergara et al., 1985), ainsi qu'une augmentation des phospho-inositides après stimulation électrique tétanique ou dépolarisation  $K^+$  prolongée (Vergara et al., 1985; Novotny et al., 1983). Toutes ces observations leur permettent de proposer l'hypothèse selon laquelle le signal calcique généré par les récepteurs à l'IP3 dans le muscle squelettique pourrait amplifier le signal calcique déjà existant. Cependant, les IP3Rs ne sont pas les acteurs majeurs du couplage excitation-contraction des muscles squelettiques.

Plus récemment, les travaux successifs de Powell et Jaimovich ont permis de définir plusieurs implications possibles des libérations calciques générées par les IP3Rs au sein de divers processus biologiques. En effet, après avoir localisé les IP3Rs dans des zones proches des tubules T (Carrasco et al., 1988) et démontré que les cellules musculaires possédaient toute la machinerie nécessaire à la voie de l'IP3 (Carrasco and Figueroa, 1995), ce groupe s'est intéressé au rôle des IP3Rs au sein des cellules musculaires. La présence des IP3Rs a été confirmée dans les cellules musculaires en culture (Liberona et al., 1998; Powell et al., 2001) (Figure H-19 A) ainsi que dans le muscle squelettique adulte (Moschella et al., 1995; Salanova et al., 2002), mais leur fonctionnalité restait à être certifiée. Lors des dépolarisations membranaires à l'aide d'une solution à forte concentration en  $K^+$ , la libération calcique engendrée comporte 2 composantes avec des cinétiques de libération différentes (Jaimovich and Rojas, 1994; Jaimovich et al., 2000) (Figure H-19 B): la composante rapide de libération calcique correspondant au calcium libéré par les RyRs et la composante lente due au calcium libéré par les IP3Rs (Figure H-19 B). De plus, il semblerait que lors de la dépolarisation membranaire par une solution riche en potassium il y ait une augmentation de la masse d'IP3 intracellulaire (Jaimovich et al., 2000). Une composante nucléaire de libération calcique portée par les IP3Rs a également été mise en évidence dans les cellules musculaires (Jaimovich et al., 2000; Estrada et al., 2001). Il a été suggéré que la composante calcique dépendante des IP3Rs au niveau cytoplasmique et nucléaire pouvait être impliquée dans la régulation de gènes (Powell et al., 2001; Carrasco et al., 2003). A la même période, ce groupe a également mis en évidence la présence des récepteurs à l'IP3 dans les cellules satellites et au niveau de la jonction neuromusculaire, suggérant leur implication dans la régulation de gènes des cellules satellites et leur contribution à la croissance des fibres musculaires ainsi qu'à la stabilisation de la jonction neuromusculaire (Powell et al., 2003). La possible implication des IP3Rs dans le concept de couplage excitation-transcription au sein des cellules musculaires

suqlettiques a été proposé par Araya en 2003 (Araya et al., 2003). Dans certains types cellulaires, ces canaux peuvent également participer à l'amplification des processus conduisant à la mort cellulaire, par la libération massive de calcium dans le cytoplasme (voir paragraphe « mort cellulaire » de ce chapitre). Comme l'ont montré des travaux au sein de notre laboratoire (Balghi et al., 2006b), ces canaux calciques, dans les myotubes, peuvent aussi intervenir dans les évènements de libération calcique spontanés localisés (phénomènes de type spark) et jouer un rôle de régulateur de la concentration calcique du RS.

### 1.2.2.3. Régulation des IP3Rs

- Régulation par le calcium

Il a été montré, sur des récepteurs à l'IP3 isolés, que le calcium à des concentrations physiologiques faibles pouvait avoir un effet coopératif positif sur la probabilité d'ouverture du canal et un effet d'inhibition à des concentrations plus élevées (Bootman and Berridge, 1995). Les récepteurs à l'IP3 fonctionneraient alors en mode CICR (calcium induced-calcium release) pour des concentrations calciques de l'ordre du  $\mu\text{M}$  (Iino and Endo, 1992). D'autres études menées elles aussi sur des IP3Rs purifiés n'ont pas rapporté d'effet inhibiteur du calcium sur le canal, suggérant la perte d'une molécule intermédiaire qui inhiberait le récepteur à l'IP3 (Danoff et al., 1988). Plusieurs sites de fixation de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  ont été mis en évidence (Mignery et al., 1992; Mak et al., 1999), le plus important étant celui localisé au niveau du résidu Asp-2100 (Miyakawa et al., 2001). De plus, suivant la charge calcique du RS, les récepteurs à l'IP3 semblent être plus ou moins sensibles à l'IP3. En effet, lorsque le RS présente un taux calcique important, les IP3Rs sont plus sensibles à l'IP3 et sont donc activés plus facilement (Missiaen et al., 1991). La sensibilité des IP3Rs au calcium est variable d'une isoforme à l'autre, les récepteurs à l'IP3 de type 2 et 1 étant les plus sensibles au calcium et les IP3R-3 les moins sensibles (Miyakawa et al., 1999).

- Régulation par phosphorylation

Les récepteurs à l'IP3 peuvent être phosphorylés par une multitude de protéines kinases. La protéine kinase dépendante de l'AMP-cyclique (PKA) et la protéine kinase dépendante du GMP-cyclique (PKG) peuvent phosphoryler les IP3Rs en deux sites, sur la serine 1589 (S1589) et sur la serine 1755 (S1755) (Ferris et al., 1991a), régulant ainsi l'activité du canal. De même, la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase II calcium-calmoduline

dépendante (CAMK-II) peuvent phosphoryler les IP3Rs, sur des sites différents de ceux de la PKA et PKG, augmentant la libération calcique des IP3Rs médiée par l'IP3 (Ferris et al., 1991b; Matter et al., 1993).

- Régulation par l'ATP

L'ATP influence l'activité des IP3Rs indépendamment de l'état de phosphorylation de la protéine. A des concentrations physiologiques, l'ATP peut stimuler l'ouverture du canal et permettre la libération de calcium (Mak et al., 1999). Le mécanisme faisant intervenir l'ATP serait la stabilisation du canal dans son état ouvert (Mak et al., 1999). Les IP3Rs de type 1 sont les plus sensibles à l'ATP suivis des IP3R-2, alors que les IP3R-3 n'y sont pas sensibles (Miyakawa et al., 1999).

- Régulation par la calmoduline et FKBP12

La calmoduline peut se lier aux IP3Rs en deux régions, une au niveau du domaine N-terminal et l'autre au niveau du domaine régulateur (Yamada et al., 1995; Adkins et al., 2000). La liaison de la calmoduline sur l'IP3Rs semble inhiber la liaison de l'IP3 sur son récepteur (Sipma et al., 1999).

De la même façon que pour les RyRs, le FKBP12 peut se lier aux IP3Rs (Cameron et al., 1995; Cameron et al., 1997). Lors de l'ajout de FK506, drogue immunosuppressive ayant pour récepteur le FKBP12, qui va dissocier la liaison établie entre le FKBP12 et les IP3Rs, il y a une augmentation de la libération calcique médiée par les IP3Rs (Cameron et al., 1995). Cette observation suggère la stabilisation des IP3Rs dans un état inactif lorsqu'ils sont liés au FKBP12.

- Modulation des IP3Rs par des agents pharmacologiques

Un antagoniste des récepteurs à l'IP3 largement utilisé est le 2-aminoéthoxydiphényl borate (2-APB) (Maruyama et al., 1997). Cette molécule inhibe la libération de calcium par les IP3Rs mais n'est pas un bloqueur spécifique de ces canaux. En effet, il bloquerait également les pompes calciques intracellulaires (Missiaen et al., 2001), dont la pompe ATPasique du RS (la SERCA pour sarco-endoplasmisue reticulum calcium ATPase) (Peppiatt et al., 2003), favorisant la sortie passive du calcium des stocks et donc l'augmentation progressive du calcium intracellulaire. De plus, le 2-APB peut également

moduler les entrées de calcium membranaires par les canaux impliqués dans les SOCEs (Soulsby and Wojcikiewicz, 2002).

Une autre molécule est généralement utilisée comme inhibiteur des IP3Rs, isolée à partir d'une éponge d'Australie de l'espèce *Xestospongia*, la xestospongine C (XeC) (Gafni et al., 1997; Wilcox et al., 1998). Plusieurs xestospongines existent mais c'est la XeC qui est le composant le plus actif. Cependant, cette molécule n'est pas spécifique des IP3Rs car elle inhibe également les pompes calciques ATPasiques du RS (Castonguay and Robitaille, 2002).

La cyclosporine A (CsA), drogue immunosuppressive se liant à son immunophiline, la cyclophiline, peut également inhiber les IP3Rs en empêchant l'IP3 de se lier à son récepteur (Misra et al., 1998). De plus, son utilisation à long terme permettrait de diminuer la transcription de l'IP3R-1 par son action d'inhibition de la calcineurine (Genazzani et al., 1999).

L'héparine de bas poids moléculaire peut elle aussi diminuer la libération de calcium provenant des IP3Rs en inhibant la liaison de l'IP3 à son récepteur (Worley et al., 1987b; Cullen et al., 1988; Ghosh et al., 1988).

## **2. Les voies d'extrusion et les systèmes tampons du calcium cytoplasmique**

Lors de la dépolarisation membranaire, une grande quantité de calcium est libérée dans le myoplasme, afin de permettre la contraction musculaire. Cependant, une concentration intracellulaire élevée de calcium de manière prolongée peut être fatale à la cellule et doit être rapidement régulée. Il existe donc différents systèmes permettant de diminuer rapidement le taux de calcium intracellulaire au sein des cellules.

### ***2.1. Repompage vers le RS***

Le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le RS se fait contre le gradient de concentration à l'aide de la SERCA (sarco-endoplasmique reticulum calcium ATPase), protéine ubiquitaire. Il existe plusieurs isoformes de SERCA codées par 3 gènes différents (Otsu et al., 1993). C'est une protéine de 100 kDa constituée d'une large tête cytoplasmique (Figure H-20). Elle possède 10 segments transmembranaires qui participent à la formation du pore calcique ainsi qu'une boucle cytoplasmique, située entre les segments 4 et 5, impliquée dans l'hydrolyse de l'ATP

(MacLennan et al., 1985) (Figure H-20). Cette pompe permet le transport de deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Zhang et al., 2000).

Les SERCAs peuvent être inhibées par différentes molécules comme la thapsigargine (Inesi and Sagara, 1994) ou encore l'acide cyclopiazonique (Demaurex et al., 1992). Cette inhibition diminue le phénomène de relaxation du muscle et provoque une libération passive du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS vers le cytoplasme.

## ***2.2. Extrusion vers le milieu extracellulaire***

### ***2.2.1. La pompe calcique ATPasique du sarcolemme (PMCA)***

La pompe calcium ATPase du sarcolemme, la PMCA (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) permet l'extrusion du calcium du cytoplasme contre son gradient de concentration. De la même façon que la SERCA, elle hydrolyse l'ATP pour expulser le  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire. Elle possède des structures similaires à la SERCA du RS (Strehler and Zacharias, 2001), tels que les segments transmembranaires et la boucle cytoplasmique possédant l'activité catalytique (Figure H-21). Il existe 5 isoformes de cette protéine chez l'Homme : PMCA1, PMCA2, PMCA3, PMCA4 et PMCA5 (Monteith et al., 1998).

### ***2.2.2. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$***

Comme nous l'avons noté en 1.1.4 où l'on en trouvera une description plus détaillée, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) situé au sarcolemme participe à la diminution de la concentration calcique cytoplasmique.

Cette protéine serait impliquée dans la régulation du calcium lors d'une contraction musculaire intense et prolongée (Balnave and Allen, 1998).

## ***2.3. Rôle des mitochondries***

Les mitochondries sont des organites intracellulaires d'une taille de l'ordre du  $\mu\text{m}$ , dont le rôle principal est la production d'énergie sous forme d'ATP grâce à la phosphorylation oxydative. La mitochondrie permet de fournir une grande quantité d'énergie nécessaire à la contraction musculaire grâce au cycle de Krebs et à la respiration mitochondriale.

Cependant, une autre caractéristique de la mitochondrie est sa capacité à séquestrer le calcium (Rizzuto et al., 1992; pour revue, Rizzuto et al., 2000). Cette organelle participerait

activement à l'homéostasie calcique de la cellule. Cette régulation pourrait être impliquée dans l'apoptose des cellules par augmentation de la concentration calcique intramitochondriale engendrant la libération du cytochrome c, protéine pro-apoptotique (Green and Reed, 1998; McCormack and Denton, 1990). De plus, les mitochondries semblent être impliquées dans la régulation des évènements de libération calcique spontanée (Isaeva and Shirokova, 2003). Lors des influx calciques importants dans les myotubes déficients en dystrophine les mitochondries ont une recapture calcique augmentée, contrairement aux myotubes exprimant la mini-dystrophine où les influx calciques sont plus faibles avec une recapture mitochondriale également diminuée (Vandebrouck et al., 2006).

#### ***2.4. Calciprotéines cytoplasmiques***

Le myoplasme contient des protéines capables de fixer le calcium et donc de jouer le rôle de tampon calcique. Les trois protéines liant le calcium avec une haute affinité dans le muscle sont la troponine C, la parvalbumine et la calmoduline, et sont impliquées dans la régulation de la concentration calcique ainsi que de la contraction et de la relaxation musculaire (Berchtold et al., 2000).

La troponine C fait partie des protéines impliquées dans la contraction musculaire. Elle appartient à la famille des protéines fixant le  $\text{Ca}^{2+}$  par ses domaines « EF hands » (Farah and Reinach, 1995). Ces sites « EF hands » de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  sont localisés sur les domaines globulaires (C et N terminal) de la troponine C (2 sites par domaine). Lors de l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induite par une dépolarisation membranaire, la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur les sites « EF hands » de la troponine C engendre un changement de conformation de la protéine, levant ainsi l'inhibition exercée par la troponine I sur la tropomyosine. C'est le début de la contraction musculaire.

La parvalbumine est une protéine cytosolique soluble découverte en 1952 par J.G Henrotte (Henrotte, 1952). Elle appartient elle aussi à la famille des protéines à motif « EF hands » et possède deux sites de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$ . Chez les mammifères, il existe deux isoformes de parvalbumine. L'isoforme  $\alpha$  est celle du muscle adulte et l'isoforme  $\beta$  est présente chez l'embryon (Fohr et al., 1993). Son implication dans la relaxation a longtemps été controversée. Cependant, elle semble être en quantité plus importante dans les muscles composés majoritairement de fibres rapides, contrairement aux muscles composés majoritairement de fibres lentes (Fuchtbauer et al., 1991; Carroll et al., 1997). Ceci suggère

une implication de la parvalbumine dans la relaxation des fibres musculaires rapides de mammifères.

Autre calciprotéine cytoplasmique, la calmoduline qui fait elle aussi partie des protéines à domaines « EF hands » et fixant le calcium. Cependant, étant plus faiblement exprimée que la troponine C ou la parvalbumine, elle ne peut jouer de véritable rôle de tampon calcique. En revanche, elle permet la régulation des canaux calciques du RS, tels que les IP3Rs (Kasri et al., 2006) et les RyRs (Wright et al., 2008).

### **3. Le signal calcique dans la cellule musculaire squelettique**

Le calcium est un messager intracellulaire universel dont dépendent de nombreux processus biologiques. Les signaux calciques, c'est-à-dire les variations du niveau de calcium (sa concentration libre), engendrant les diverses voies de signalisation vont ainsi avoir une action différentielle en fonction du niveau de calcium libéré et du contexte spatio-temporel. Cette variabilité de signaux calciques permet à la cellule de contrôler différents phénomènes comme la prolifération, le développement, l'apprentissage et la mémoire ou encore la sécrétion et la contraction. Mais à de forts taux et sur une durée trop longue, le calcium peut être toxique pour la cellule et engendrer la mort cellulaire.

Dans cette partie, trois processus majeurs de la cellule musculaire squelettique, sous contrôle du calcium, vont être abordés : le couplage excitation-contraction, la transcription de gènes et la mort cellulaire.

#### ***3.1. Le couplage excitation-contraction***

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de la contraction et de la relaxation musculaire se fait par le calcium et la régulation de son homéostasie au sein des cellules musculaires. Le couplage excitation-contraction (CEC) regroupe la succession de mécanismes de la dépolarisation membranaire, passant par la libération de calcium dans le cytoplasme, jusqu'à la contraction de la cellule musculaire. Ici nous envisagerons le CEC dans son acceptation restreinte aux mécanismes permettant le lien entre la dépolarisation de la membrane et la libération de calcium par le RS. Après dépolarisation locale de la membrane provoquée par un influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire, il y a induction

d'un potentiel d'action qui se propage le long de la membrane jusqu'au cœur de la fibre via les tubules T. C'est au niveau des tubules T que le couplage excitation-contraction a lieu, permettant la transduction du signal du sarcolemme au RS.

Schneider et Chandler ont observé le premier signal du processus de couplage qui apparaît comme un courant (dans le sens entrant conventionnel) prenant origine dans le mouvement de charges au niveau de la membrane des tubules T (Schneider et al., 1973). Il a été montré plus tard qu'à ce mouvement de charges était associé une capacité de la fibre à libérer du calcium provenant du RS, pouvant induire une force de contraction (Chandler and Schneider, 1976). Ces phénomènes ont lieu au niveau de la triade où sont localisés les canaux participant au couplage (Figure H-22 A). Ces canaux sont d'une part les canaux calciques/récepteurs aux dihydropyridines sarcolemmiens - sensibles au voltage - et d'autre part les canaux calciques/récepteurs à la ryanodine du RS libérant le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme (Figure H-22 B). La structure de la triade permet le rapprochement entre les RyR de deux citernes terminales du RS, situées de part et d'autre d'un tubule T, et les DHPR localisés au niveau de la membrane du tubule T (Figure H-22 A).

Le mouvement de charges membranaires est expliqué par le changement de conformation des parties chargées des DHPRs sous l'effet de la variation de potentiel. La description du lien fonctionnel entre ce changement de conformation et la libération calcique du RS, médiée par les RyRs, repose sur 3 modèles : (i) un couplage par un mécanisme de "calcium-induced calcium release" (CICR), (ii) un mécanisme impliquant un second messager autre que le calcium et (iii) un lien mécanique direct entre les canaux dépendants du voltage du sarcolemme et les canaux calciques du RS (Figure H-22 C). Dans le muscle squelettique, c'est le lien mécanique direct qui prédomine alors que dans le muscle cardiaque c'est le phénomène de CICR qui permet d'activer la contraction.

(i) Le couplage par CICR (Figure H-22 C.1)

Ce couplage est celui impliqué dans la contraction du muscle cardiaque (Endo, 1977) et fait intervenir les RyRs de type 2. Ce mécanisme a largement été décrit dans le muscle cardiaque dans différents travaux de Fabiato (Fabiato, 1983). Lors de la dépolarisation membranaire, les DHPRs s'activent, laissant entrer du calcium dans la cellule. Ces ions  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent à leur tour activer les RyR2 du RS, permettant alors la libération secondaire de calcium du RS vers le cytoplasme afin de permettre la contraction de la cellule musculaire.

Ce mécanisme est prépondérant dans les cellules musculaires cardiaques mais ne semble pas intervenir de façon majoritaire dans le muscle squelettique (Rios et al., 1987), du moins dans le muscle adulte sain car ce type de couplage a pu être mis en évidence lors de la myogenèse in vitro (Cognard et al., 1992a). Le mécanisme de CICR est tout de même présent dans le muscle squelettique, notamment dans la propagation des vagues calciques.

(ii) Mécanisme impliquant un 2<sup>nd</sup> messenger (Figure H-22 C.2)

L'hypothèse d'un second messenger pouvant être impliqué dans le CEC a été proposée en 1985 par Volpe et collaborateurs ainsi que par Vergara et collaborateurs (Volpe et al., 1985; Vergara et al., 1985). Le candidat proposé au rôle de 2<sup>nd</sup> messenger fut l'IP3 qui pourrait induire une libération calcique via sa fixation sur les RyRs. En revanche, l'implication de l'IP3 et de ses récepteurs (IP3Rs) dans le CEC reste très controversée (discuté dans le paragraphe 2.2.2 du chapitre II). Il semblerait que l'IP3 et ses récepteurs localisés à la membrane du RS soient impliqués dans la régulation du CEC et pourraient jouer un rôle d'amplification du signal calcique (Araya et al., 2003).

(iii) Le couplage par lien mécanique direct (Figure H-22 C.3)

Nous avons vu précédemment qu'il y a un lien physique entre le DHPR et le RyR1 dans le muscle squelettique. Lors du potentiel d'action, la variation de potentiel de la membrane engendre un changement de conformation des DHPRs qui se répercute au niveau de la boucle II-III cytoplasmique de la sous unité  $\alpha 1s$  du DHPR, faisant le lien physique entre les DHPRs et le RyR1 du RS (Tanabe et al., 1990; Leong et al., 1998). La boucle II-III des DHPRs semble être en interaction avec deux régions R9 et R10 du RyR1 (Nakai et al., 1998; Proenza et al., 2002). Le changement de conformation de la boucle cytoplasmique des DHPRs entraîne l'ouverture du RyR1 par lien physique et permet la libération massive de calcium dans le cytoplasme, engendrant ainsi la contraction musculaire. L'hypothèse d'un lien mécanique direct entre les canaux du sarcolemme et du RS est supportée par une transduction rapide du signal de l'ordre de 2 ms.

### ***3.2. La transcription de gènes***

Comme dans toutes les cellules, les facteurs de transcription jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes lors de la myogenèse, du développement et de la

différenciation des cellules musculaires. La régulation de ces facteurs de transcription est intimement liée au calcium intracellulaire qui y joue un rôle central (Berridge et al., 2000; Carrasco et al., 2003). Le concept de couplage excitation-transcription a émergé dans les années 90 pour les cellules excitables notamment les cellules musculaires cardiaques et lisses (Atar et al., 1995; Barlow et al., 2006; Wamhoff et al., 2006) et il est peu caractérisé dans les cellules musculaires squelettiques où la majorité des études a été effectuée par le groupe de Jaimovich.

Le couplage excitation-transcription définit la succession des événements se produisant lors de l'activation de la cellule, de la dépolarisation membranaire à la transcription de gènes en passant par la libération de calcium intracellulaire. Tous ces phénomènes font en particulier intervenir des canaux de libération calcique ainsi que divers effecteurs tels que la calcineurine et les facteurs de transcription. Les canaux de libération calcique impliqués dans ce couplage sont les RyRs et les IP3Rs (Jaimovich et al., 2000; Valdes et al., 2007; Valdes et al., 2008).

L'un des facteurs de transcription les plus étudiés dans le muscle strié est le cAMP/Ca<sup>2+</sup>-response element binding (CREB) protein, impliqué dans la transcription de gènes régulant la prolifération et la migration cellulaire. D'autres facteurs tels que le « muscle regulatory factor » (MRF) ou le « myocyte enhancer factor 2 » (MEF2) sont impliqués dans l'établissement du lignage myogénique et le contrôle de la différenciation cellulaire.

Le « nuclear factor of activated T-cells » (NFAT) étant un des facteur de transcription de cytokines, a beaucoup été étudié dans les cellules immunitaires (Crabtree and Clipstone, 1994). Il en est de même pour le « nuclear factor  $\kappa$ B » (NF $\kappa$ B), qui joue un rôle dans l'initiation de la mort cellulaire (pour revue, Mourkioti and Rosenthal, 2008) et dans la transcription de cytokines. Ces deux facteurs de transcription sont particulièrement intéressants pour notre thématique car ils apparaissent être en relation avec les récepteurs à l'IP3 (Jaimovich and Carrasco, 2002). En effet, la translocation du NFAT dans le noyau induit l'augmentation de l'ARNm du récepteur à l'IP3 de type I dans les cellules musculaires squelettiques (Valdes et al., 2008). De plus, la translocation du NF $\kappa$ B dans le noyau semble être induite par le calcium libéré entre autre par les IP3Rs (Valdes et al., 2007).

### 3.2.1. La Calcineurine : un intermédiaire essentiel dans la signalisation

La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase ubiquitaire, détectée pour la première fois dans le cerveau par Wang et Desai en 1976 et purifiée en 1978 par Klee et Krinks (Wang

and Desai, 1976; Klee and Krinks, 1978). Un an plus tard, Klee et collaborateurs mettent en évidence l'affinité de cette protéine du système nerveux pour le calcium et la calmoduline et de ce fait la baptisent « calcineurine » (Klee et al., 1979).

Cette phosphatase est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique de 59 kDa qui lie la calmoduline, c'est la calcineurine A, et d'une sous-unité régulatrice intrinsèque de 19 kDa liant le calcium, la calcineurine B (pour revue, Rusnak and Mertz, 2000) (Figure H-23 A). La sous-unité A de la calcineurine possède un domaine catalytique, homologue aux autres protéines sérine/thréonine phosphatases, ainsi que trois domaines régulateurs situés en C-terminal qui lui sont propres (Figure H-23 A). Ces trois domaines régulateurs sont le site de liaison à la calcineurine B, le site de liaison à la calmoduline, ainsi que le domaine « autoinhibiteur » (Figure H-23 A). Cette sous-unité possède également des sites de phosphorylation qui semblent jouer un rôle dans sa régulation (pour revue, Rusnak et al., 2000). La calcineurine B peut lier avec une haute affinité quatre ions calcium, chacun sur des sites individuels « EF-hands » (Figure H-23 A). Lorsque la calmoduline et le calcium sont liés à la calcineurine, il y a levée de l'inhibition et exposition du site actif de la calcineurine, qui peut alors déphosphoryler diverses protéines, telles que NFAT (pour revue, Rusnak et al., 2000) (Figure H-23 B). De plus, la calcineurine pourrait également activer le NF $\kappa$ B, mais le mode d'action de la calcineurine sur ce facteur de transcription n'est pas encore entièrement élucidé dans le muscle squelettique (Alzuherri and Chang, 2003).

La cyclosporine A (CsA) et le FK506, deux drogues immunosuppressives, se lient spécifiquement à leur immunophiline, formant les complexes CsA-cyclophiline et FK506-FKBP (FKBP, FK506 binding protein) (Figure H-23 B). Ces complexes vont alors pouvoir inhiber l'activité phosphatase de la calcineurine (Liu et al., 1991; Schreiber and Crabtree, 1992) (Figure H-23 B). Ces deux molécules ont permis de montrer l'implication de la calcineurine dans la transcription de plusieurs gènes, notamment celle de l'IP3R1 (Genazzani et al., 1999).

### 3.2.2. NFAT

Ce facteur de transcription, découvert en 1988 par Shaw et collaborateurs dans les cellules Jurkat (Shaw et al., 1988), est connu pour induire la transcription de cytokines telles que l'IL-2 ou l'IL-3 (pour revue, (Crabtree et al., 1994). NFAT est une famille multigénique composée de 5 membres (entre parenthèses : nouvelle terminologie) : NFAT1 (NFATc2), NFAT2 (NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3) et NFAT5 (TonEBP). Ces différentes

isoformes sont distribuées dans divers tissus et impliquées dans l'expression de plusieurs cytokines et de gènes participant à la réponse immunitaire (pour revue, Rao et al., 1997).

Deux grandes régions d'homologie de séquence sont présentes dans toutes les isoformes : le « DNA-binding domain » (DND) et le « NFAT homology region » (NHR). Le domaine DND, qui lie l'ADN, est hautement conservé dans chaque isoforme et possède également des similarités de séquences avec le DND des facteurs de transcription de la famille Rel (dont NFκB est membre). Le deuxième domaine hautement conservé est le NHR, liant la calcineurine et présent seulement dans les protéines de la famille du NFAT. Les domaines variables d'un facteur à l'autre sont les « transactivation domain » (TAD) localisés en C- et N-terminal (pour revue, Rao et al., 1997).

La translocation du NFAT dans le noyau est dépendante de la calcineurine (Figure H-24). Une fois activée par le calcium et la calmoduline, cette dernière va déphosphoryler le NFAT, lui permettant alors d'entrer dans le noyau, en exposant son signal de localisation nucléaire (NLS, nuclear localization signal), et d'activer la transcription de gènes cibles (pour revue, Hogan et al., 2003) (Figure H-24).

Dans le muscle squelettique trois isoformes de NFAT sont présentes : NFATc1, NFATc2 et NFATc3. Ces trois isoformes sont exprimées à un niveau similaire au stade de myoblaste, myotube natif ou myotube mature (Abbott et al., 1998). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans divers processus du développement des cellules musculaires comme la maturation des myotubes ou encore la différenciation et la détermination des myotubes en fibres lentes ou rapides (pour revue, Schulz and Yutzey, 2004).

Dans les myotubes matures, l'isoforme NFATc1 répond aux augmentations de calcium (Abbott et al., 1998). Il a également été démontré, dans des conditions physiologiques normales, que la libération de calcium provenant des IP3Rs augmente la translocation de NFATc1 dans les myoblastes mais pas dans les myotubes matures. En revanche, la translocation de NFATc1 dans le noyau dans les myotubes matures requiert la libération de calcium par les RyRs (Stiber et al., 2005). En 2008, Valdés et collaborateurs ont confirmé que la translocation de NFAT dans les myotubes matures est initiée par la libération de calcium via les RyRs et non les IP3Rs, dans des conditions physiologiques (Valdes et al., 2008). L'apport de calcium extracellulaire n'est pas nécessaire à l'initiation de la translocation du NFAT dans le noyau, mais prolonge sa localisation nucléaire. Cependant, leur étude démontre qu'il y a une augmentation de l'ARNm de l'IP3R1 dans les cultures primaires après stimulation électrique ou dépolarisation membranaire par une solution riche en potassium. De

plus, l'inhibition de la calcineurine bloque l'activation de NFAT et diminue le taux d'ARNm de l'IP3R1 après stimulation (Valdes et al., 2008).

Tout cela suggère que l'activité de NFAT est régulée par le calcium provenant de différentes sources suivant le stade de maturation des cellules musculaires. De plus, le NFAT semble être impliqué dans la régulation de l'expression de l'IP3R1 dans les cellules musculaires squelettiques.

### 3.2.3. NFκB

Le NFκB, découvert en 1986 par Sen et Baltimore (Sen and Baltimore, 1986), est un facteur de transcription impliqué dans divers processus biologiques tels que la réponse immunitaire (Li and Verma, 2002), notamment en activant la transcription de l'IL-2. Il est également impliqué dans la prolifération cellulaire, la tumorigenèse ou encore l'apoptose (pour revue, Siebenlist et al., 1994). Cette famille NFκB/Rel est composée de plusieurs protéines, dont cinq membres sont présents chez les mammifères et qui ont pour forme active : p65 (autrement dénommé Rel A), p50, p52, cRel et RelB (pour revue, Mourkioti et al., 2008). Ces sous-unités peuvent s'assembler en homo ou hétérodimères. L'hétérodimère p65/p50 est considéré comme étant la forme canonique de NFκB car c'est le complexe le plus abondant (pour revue, Siebenlist et al., 1994). Ces protéines sont caractérisées par un domaine hautement conservé de 300 acides aminés en N-terminal. Ce domaine d'homologie de séquence a été nommé « NRD domain » (NFκB/Rel/dorsal domain) et depuis peu « Rel homology domain » (RHD) (pour revue, Mourkioti et al., 2008). Il possède différentes fonctions nécessaires à l'activité du facteur de transcription car il participe à la dimérisation des sous-unités ainsi qu'à leur liaison avec l'ADN au niveau des promoteurs. Au niveau C-terminal du domaine RHD, se trouve une série d'acides aminés positifs servant de signal pour la translocation du NFκB dans le noyau des cellules. Cette séquence d'acides aminés est appelée « nuclear localization signal » (NLS) (pour revue, Grimm and Baeuerle, 1993). Dans les cellules non excitables, NFκB est retenu dans le cytoplasme par sa protéine inhibitrice IκB, appartenant à une famille comportant plusieurs membres (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε and Bcl-3) (Figure H-25). Les deux principaux représentants sont IκBα et IκBβ, spécifique de la protéine cRel et NFκB respectivement (Kerr et al., 1991).

La translocation de NFκB dans le noyau par la voie dite classique se fait par la levée de l'inhibition de IκB sur NFκB par l'intermédiaire d'un complexe protéique IKK (Figure H-25). Ce complexe comporte une protéine kinase formée par deux sous-unités catalytiques,

IKK $\alpha$ /IKK1 et IKK $\beta$ /IKK2, régulées par une troisième sous-unité, IKK $\gamma$  (ou NEMO pour « named NF $\kappa$ B essential modulator ») (Figure H-25). Une fois phosphorylée et ubiquitinylée, I $\kappa$ B va être dégradée par le protéasome, libérant NF $\kappa$ B dans le cytoplasme pouvant alors être transloqué dans le noyau (pour revue, Mourkioti et al., 2008) (Figure H-25). Le complexe IKK peut être activé par différents signaux extracellulaires, tels que le « tumor necrosis factor » (TNF), diverses interleukines, ou encore des composants de la paroi des bactéries comme les lipopolysaccharides (LPS). Ces ligands vont se lier à leurs récepteurs qui vont alors activer le complexe IKK, conduisant ainsi à la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau et à la transcription de gènes cibles (pour revue, Mourkioti et al., 2008).

Dans le muscle squelettique, ce facteur de transcription semble être impliqué dans différentes étapes de la myogénèse, ainsi que dans l'activation des cellules satellites lors de la régénération musculaire. Ceci suggère un rôle potentiel de NF $\kappa$ B dans la régénération musculaire dans diverses pathologies. Le calcium impliqué dans la translocation du NF $\kappa$ B dans le noyau des cellules musculaires squelettiques paraît provenir, entre autres, des IP3Rs ainsi que des RyRs (Valdes et al., 2007). La modulation de la libération calcique de ces canaux pourrait donc contrôler la transcription de gènes dépendants de la voie NF $\kappa$ B.

Les libérations calciques provenant du RS permettent donc le couplage excitation-contraction mais également le couplage excitation-transcription de gènes. En effet, en fonction de la cinétique de libération calcique ainsi que la localisation (Valdes et al., 2008), le calcium provenant du RS peut induire la translocation de divers facteurs de transcription, tels que NFAT et NF $\kappa$ B, et donc l'expression de différents gènes suivant le stade de maturation de la cellule musculaire squelettique (Valdes et al., 2008) (Figure H-26).

### **3.3. La mort cellulaire**

Le calcium est un messager important dans divers processus biologiques permettant le bon fonctionnement de la cellule et le maintien de son intégrité, mais lorsqu'il y a une dérégulation de son homéostasie, cet ion peut induire la mort cellulaire de plusieurs façons. Son rôle dans l'induction de la mort cellulaire reste complexe. Ici deux aspects seulement seront évoqués, celui impliquant la mitochondrie et celui impliquant le facteur NF $\kappa$ B.

La mitochondrie possède la capacité de stocker le Ca<sup>2+</sup> et peut participer à la régulation de l'homéostasie calcique de la cellule, générant un flux calcique continu entre le RS et la mitochondrie (pour revue, Berridge et al., 2000). Nous avons vu précédemment, que lorsque la mitochondrie est en surcharge calcique, elle libère le cytochrome c dans le cytoplasme de la

cellule, qui va alors initier la mort cellulaire par apoptose (Green et al., 1998; McCormack et al., 1990). Cette libération du cytochrome c est régulée par deux types de protéines, les protéines de survie cellulaire de la famille de Bcl-2 et les protéines de mort cellulaire de la famille Bax, Bad. Ces protéines sont localisées au niveau de la membrane de la mitochondrie où se trouve le pore mitochondrial de grande conductance (mPTP, mitochondrial permeability transition pore). Ce pore oscille entre l'état fermé ou ouvert afin de réguler la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  de la matrice mitochondriale. Lorsqu'il reste trop longtemps dans l'état d'ouverture, il induit la libération du cytochrome c et donc l'activation de la voie des caspases conduisant à l'apoptose. Bax et Bad accélèrent l'ouverture du mPTP et contribuent donc à la libération du cytochrome c contenu dans la membrane de la mitochondrie (Shimizu et al., 1999), alors que Bcl-2 semblent bloquer l'apoptose induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Barr and Tomei, 1994; Reed, 1994).

Le calcium peut induire la mort cellulaire par le biais d'un autre mécanisme impliquant le facteur de transcription NF $\kappa$ B. Différents signaux peuvent activer le complexe NF $\kappa$ B, engendrant une variété de réponses allant de la survie cellulaire à la mort cellulaire selon les facteurs de transcription activés. La voie du NF $\kappa$ B reste relativement complexe car elle fait intervenir une multitude de récepteurs et différentes isoformes du NF $\kappa$ B, impliqués dans diverses réponses cellulaires tissu-dépendantes (pour revue, Mourkioti et al., 2008). Cependant, dans le muscle squelettique l'inhibition de la voie NF $\kappa$ B prévient la dégénérescence musculaire ainsi que la mort des fibres musculaires dans plusieurs modèles d'atrophie musculaire (Cai et al., 2004; Mourkioti et al., 2006; Hunter et al., 2002). De plus, il a été montré un lien critique entre le stress mitochondrial, la signalisation calcique et l'activation de la voie NF $\kappa$ B dans la mort cellulaire dans des lignées myogéniques (C2C12) (Biswas et al., 2003). Il semblerait que cette voie soit également impliquée dans la mort des fibres musculaires chez les souris *mdx* (modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne) car l'inhibition du NF $\kappa$ B permet d'augmenter la force des muscles, de diminuer la fatigue musculaire et d'induire la régénération musculaire (Messina et al., 2006).

Les récepteurs à l'IP3 pourraient également participer à la mort cellulaire, notamment l'isoforme de type 1 dans les lymphocytes B immatures (Figure H-27). Il semblerait que la caspase 3 pourrait cliver l'IP3R-1 en un site particulier, engendrant une conformation active du canal permettant une libération continue du  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du RE vers le cytoplasme (Nakayama et al., 2004), ce phénomène accélérant la mort cellulaire (Assefa et al., 2004) (Figure H-27). De plus, le cytochrome c (protéine pro-apoptotique), libérée par la mitochondrie, se fixerait sur l'IP3R et le maintiendrait en conformation ouverte permettant la

libération de  $\text{Ca}^{2+}$  (Boehning et al., 2003) (Figure H-27). Ces deux phénomènes participeraient à l'amplification du processus de mort cellulaire, ce qui pourrait également être le cas dans des pathologies présentant une dérégulation calcique (Figure H-27).

La balance entre mort cellulaire et survie cellulaire est en perpétuel équilibre et peut facilement basculer vers de la mort cellulaire par une simple dérégulation calcique. Ce phénomène se retrouve dans de nombreuses pathologies, dont la dystrophie musculaire de Duchenne.

#### **4. Les évènements de libération calcique spontanée et localisée**

##### ***4.1. Généralités***

Des évènements de libération calcique spontanée et localisée ont pu être observés pour la première fois grâce à l'avancée technologique de la microscopie confocale et des sondes calciques fluorescentes dynamiques, telles que le fluo-3. Ils ont été mis en évidence initialement dans les myocytes cardiaques (Cheng et al., 1993; Niggli et al., 1994) et dans les muscles squelettiques d'amphibiens (Tsugorka et al., 1995; Klein et al., 1996). Ces premiers évènements visualisés dans le muscle cardiaque ont été caractérisés et nommés « sparks » signifiant étincelles en anglais, de part leurs propriétés de cinétique temporelle rapide (Figure H-28). Ces évènements de libération calcique apparaissent au repos dans les muscles squelettiques des amphibiens (Klein et al., 1996) mais également après stimulation par dépolarisation membranaire (Klein et al., 1996; Lacampagne et al., 1996). La fréquence d'apparition des sparks est augmentée lors de la dépolarisation membranaire (Klein et al., 1996; Lacampagne et al., 1996), sans pour autant modifier les caractéristiques d'amplitude, cinétiques et spatiales de l'évènement unitaire lui-même. De même, l'utilisation de potentialisateur du phénomène de CICR (caféine) augmente la fréquence de ces évènements (Brum et al., 2000), alors que l'utilisation d'inhibiteurs de CICR et de RyRs diminue cette activité de libération calcique spontanée (Hui et al., 2001). Il a également été observé que lors du couplage excitation-contraction dans les cellules musculaires cardiaques, des phénomènes de sparks étaient provoqués par l'influx calcique provenant des DHPRs, via le phénomène de CICR (Wang et al., 2001).

Une multitude de types cellulaires présente ces événements de libération calcique spontanée et localisée, au repos ou lors de dépolarisation membranaire (pour revue, Cheng and Lederer, 2008), dont les 3 types de cellules musculaires : le muscle lisse (Arnaudeau et al., 1996; Gordienko et al., 1998; Jaggar et al., 1998), le muscle cardiaque (Cheng et al., 1993), et le muscle squelettique (Lacampagne et al., 1996; Shirokova et al., 1998). Ces événements peuvent revêtir différents aspects spatio-temporels correspondant à un terme défini (pour revue, Cheng et al., 2008). Traditionnellement, le terme de « spark » est employé pour des événements de libération calcique provenant des RyRs, alors que le terme de « puff » ou « blip » fait référence aux événements médiés par les IP3Rs. Ainsi le « blip » est un petit « puff ». Cependant, l'appellation « spark » est utilisée pour des événements mixtes faisant intervenir les RyRs et les IP3Rs. De manière générale, ce terme est employé pour désigner tout événement de libération calcique localisée. Un autre phénomène bien connu dans le muscle squelettique est celui de l'évènement de libération calcique de faible amplitude et de longue durée, nommé « ember » (Gonzalez et al., 2000). A ces libérations calciques dans le cytoplasme correspondent des déplétions calciques locales simultanées du RS, appelées « blink » (Brochet et al., 2005), autrement nommées « skrap » (nom à l'envers de « sparks ») dans le muscle squelettique (Launikonis et al., 2006) (Figure H-29).

#### ***4.2. Les sparks et autres événements de libération calcique dans le muscle squelettique de mammifère***

Contrairement aux amphibiens, il y a une absence de libération calcique spontanée localisée dans le muscle de mammifère adulte à l'état de repos (Shirokova et al., 1998), et une libération calcique diffuse à cinétique rapide lors de la dépolarisation membranaire, mais pas d'activité sparks (Shirokova et al., 1998; Shirokova and Rios, 1997). Cependant, certaines conditions expérimentales permettent de provoquer l'apparition de ces événements calciques dans les fibres musculaires de mammifères adultes (pour revue, Csernoch, 2007; Cheng et al., 2008).

Des événements de libération calcique spontanée localisée ont été observés dans des fibres pelées de muscle de mammifère adulte (Kirsch et al., 2001) ainsi que dans des fibres de mammifère adulte perméabilisées à la saponine (Zhou et al., 2003; Ward et al., 2004). Dans les fibres perméabilisées de rat, les événements de libération calcique n'ont pas les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux observés dans les fibres musculaires d'amphibiens

(Zhou et al., 2003; Ward et al., 2004). En effet, ils ont une amplitude plus faible, une cinétique de montée plus lente et une largeur spatiale plus importante (Zhou et al., 2003; Ward et al., 2004). De plus l'échange de glutamate (anion intracellulaire majoritaire) par des ions sulfates modifie la fréquence des événements de libération calcique spontanée dans les fibres pelées (Zhou et al., 2003). De même, la présence de  $\text{SO}_4^{2-}$  dans la solution interne, révèle l'apparition d'évènements de libération calcique provoqués par dépolarisation membranaire sous forme d'embers de durée longue et de faible amplitude dans les fibres intactes de mammifère adulte (Zhou et al., 2003; Csernoch et al., 2004). Il a été mis en évidence la présence d'évènements de libération calcique induits par dépolarisation membranaire dans des fibres musculaires intactes de rat perméabilisées à leurs extrémités, par la technique de « double vaseline-gap » (Csernoch et al., 2004). Une étude récente utilisant la technique d'isolation des fibres intactes par silicone couplée au voltage clamp a montré la présence de signaux calciques ayant les caractéristiques des embers dans les fibres musculaires squelettiques de souris (Csernoch, 2007). Ces événements sont activés par la dépolarisation membranaire et interrompus par la repolarisation membranaire. Une autre méthode est utilisée pour visualiser les sparks dans les fibres intactes de muscle de mammifère adulte, celle du choc osmotique (Wang et al., 2005). Les fibres musculaires squelettiques sont plongées dans une solution hyposmotique, puis sont réintroduites dans une solution isotonique. Des événements de libération calcique spontanée apparaissent dans les régions sous-membranaires (Wang et al., 2005). Ces événements calciques sont des « bursts », avec une amplitude large comparable à celle des sparks et une phase de plateau au niveau temporel correspondant aux embers. Les sparks sont également présents dans les cellules musculaires de souris en développement (Shirokova et al., 1999; Balghi et al., 2006b).

#### ***4.3. Mécanismes impliqués dans ces libérations calciques spontanées***

Les événements de libération calcique spontanée semblent être localisés à l'endroit présumé des tubules T dans les muscles squelettiques adultes de mammifère (Kirsch et al., 2001). Dans les cellules musculaires de mammifères en culture (en développement), les libérations calciques spontanées semblent être localisées dans des régions périphériques où les complexes entre les tubules-T et le RS ne sont pas encore formés (Shirokova et al., 1999; Zhou et al., 2006). Ces observations suggèrent l'implication d'une protéine du tubule T (le DHPR) dans l'inhibition des événements de libération calcique spontanée du muscle

squelettique, qui pourraient être médiés par les RyRs (pour revue, Csernoch, 2007). Dans les cellules musculaires squelettiques de mammifères ce sont les isoformes RyR1 et RyR3 qui sont exprimées, dont les homologues sont RyR $\alpha$  et RyR $\beta$  respectivement chez les amphibiens (voir paragraphe sur les RyRs de ce chapitre). Cependant, dans les fibres musculaires squelettiques de mammifère les RyR3 ont une expression majoritaire après la naissance puis leur taux d'expression diminue pour atteindre un niveau négligeable dans le muscle adulte (Tarroni et al., 1997; Flucher et al., 1999). L'hypothèse de l'implication des RyR3 dans ces événements de libération calcique a été proposée, d'autant plus que cette isoforme n'est pas couplée et donc pas régulée par les DHPRs. Ces récepteurs sont localisés dans des régions parajonctionnelles (non couplés aux DHPRs) dans les cellules musculaires squelettiques des amphibiens et dans les cellules musculaires embryonnaires de mammifères et ne sont pas sous le contrôle direct des tétrades de DHPRs, contrairement aux RyR1 (Felder and Franzini-Armstrong, 2002) ; (pour revue, Cheng et al., 2008) (Figure H-30). Des études menées dans des cellules musculaires squelettiques en culture provenant de souris KO pour les RyR1 ou RyR3 montrent que des sparks peuvent être générés dans ces deux types cellulaires (Conklin et al., 2000; Ward et al., 2000). Les canaux RyR3 non couplés et donc non contrôlés par les DHPRs pourraient initier la libération calcique qui pourrait s'amplifier par ouverture des RyR1. Chaque type de canal peut provoquer des événements de libération calcique lorsqu'il est exprimé seul, mais lorsque les deux sont co-exprimés, il y aurait amplification du signal. Un travail récent utilisant l'électrotransfection d'ADNc de RyR1 ou RyR3 dans le muscle squelettique adulte de souris a permis de montrer l'implication de ces canaux dans les événements de libération calcique lors de dépolarisation membranaire (Pouvreau et al., 2007). En effet, l'expression de RyR3 exogène mais pas de RyR1 engendre la présence de sparks lors de la dépolarisation membranaire des cellules musculaires squelettiques. Les sparks produits par le RyR3 exogène lors de la dépolarisation membranaire peuvent amplifier la réponse calcique à la dépolarisation par le phénomène de CICR. Ces sparks sont spécifiques des RyR3 qui ne sont pas en contact avec les canaux senseurs de voltage du sarcolemme (DHPRs). Ces récepteurs à la ryanodine peuvent alors être activés par le phénomène de CICR médié par calcium transitant à travers les RyR1 couplés aux DHPRs, et libérer du calcium sous forme de sparks. Les deux types de canaux seraient donc nécessaires aux sparks contrôlés par le voltage. De plus, lors de choc osmotique, il y a apparition de sparks sous-sarcolemmiens (Wang et al., 2005) dans les fibres de muscle de mammifère adulte. Les auteurs expliquent ce phénomène par le découplage des RyRs du RS et des DHPRs du

sarcolemme par le gonflement de la cellule pendant le choc hyposmotique. Lors du retour en milieu isotonique les récepteurs restent dans leur état découplé. Les RyRs ne sont plus sous contrôle des DHPRs et peuvent alors libérer spontanément du calcium (Wang et al., 2005).

Les IP3Rs peuvent également intervenir dans les événements de libération calcique spontanée et localisée dans les cellules musculaires. Effectivement, dans les myocytes de veine porte de lapin, les IP3Rs auraient la capacité de recruter des domaines proches contenant des RyRs, provoquant ainsi une libération calcique plus large et une propagation saltatoire de vague calcique (Gordienko and Bolton, 2002). Il y aurait donc interaction entre RyRs et IP3Rs pour moduler l'activité calcique spontanée (Boittin et al., 1999). Ces canaux (IP3Rs) sont également impliqués dans les sparks générés dans les myotubes de cellules musculaires déficientes en dystrophine ou exprimant la mini-dystrophine (Balghi et al., 2006b).

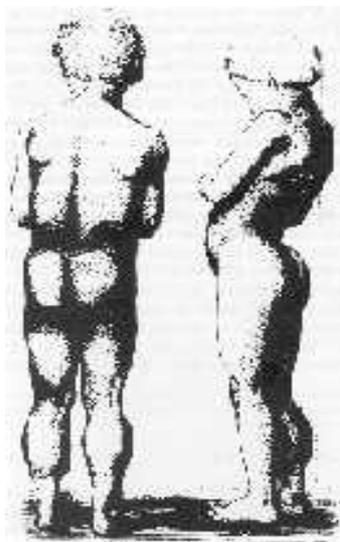
### III. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

#### 1. Caractéristiques cliniques de la DMD

##### 1.1. *Historique*

La dystrophie musculaire de Duchenne est une pathologie musculaire sévère (Figure H-31) qui a été caractérisée en 1861 par Guillaume Duchenne de Boulogne. Elle fut précédemment décrite par William John Little et Edward Meyron mais associée à une carence nutritionnelle. En 1868, Duchenne découvrit que cette pathologie était liée aux muscles et observa le remplacement du tissu musculaire par le tissu fibreux ou conjonctif. Il établit également des critères diagnostiques et des traitements par hydrothérapie et massages accompagnés de stimulations électriques pour améliorer la condition des patients.

William Richard Gowers observa en 1886 que la transmission de la maladie était augmentée dans des familles présentant des antécédents du côté de la mère. Il remarqua également qu'une femme pouvait mettre au monde des enfants de pères différents mais souffrant tous de dystrophie. Ces premières observations établirent que la pathologie était musculaire et probablement transmise par la mère.



**Figure H-34 : Représentation d'un patient atteint de la DMD.**

On peut observer une hypertrophie des mollets caractéristique, ainsi qu'une déformation de la colonne vertébrale.

Source : d'après le site [www.unige.ch](http://www.unige.ch)

##### 1.2. *Pathologie*

La dystrophie musculaire de Duchenne est une myopathie génétique affectant tous les muscles (muscles squelettiques, lisses et cardiaques) et principalement les garçons avec une incidence de 1/3500 nouveau-nés mâles (Emery, 1993). Elle se caractérise par une

dégénérescence progressive des tissus musculaires entraînant une diminution puis une perte de la force musculaire. Les premiers signes sont généralement visibles vers l'âge de 3 ans et se manifestent par l'apparition retardée de la marche, ainsi que de nombreuses chutes et des difficultés à se relever. La marche est souvent chancelante et sur la pointe des pieds, une hypertrophie des mollets est également observée. Au fil des années, la dégénérescence des muscles proximaux se fait ressentir par une augmentation des contractures musculaires et de raideurs articulaires, obligeant l'enfant à se lever par la méthode dite de Gower (Figure H-32). Vers l'âge de 10-12 ans, la montée des escaliers puis la marche deviennent impossibles. Les enfants perdent alors leur faculté ambulatoire et l'utilisation d'un fauteuil roulant devient nécessaire. Les muscles dorsaux sont alors atteints, provoquant une scoliose généralement grave et l'utilisation de leurs membres supérieurs se limite peu à peu. L'affaiblissement des muscles respiratoires provoque une rétention du monoxyde de carbone ainsi qu'une anoxémie (diminution de la quantité d'oxygène dans le sang), et rend l'enfant sensible aux infections broncho-pulmonaires. Une défaillance du muscle cardiaque apparaît plus tardivement mais doit cependant être surveillée dès le plus jeune âge. Le décès par insuffisance cardiaque et respiratoire survient vers l'âge de 25 ans.

Une autre forme de dystrophie liée au sexe existe, c'est la dystrophie musculaire de Becker (DMB), caractérisée en 1955 par Becker et Kiener (Becker and Kiener, 1955). Elle est moins sévère que la DMD et présente une évolution plus lente mais variable. Les muscles perdent progressivement leur force, leur volume et leur souplesse. La démarche est moins assurée et les crampes sont fréquentes. La marche est possible tardivement (jusqu'à l'âge de 40 ans passés) et les muscles des bras peuvent également être touchés. L'atteinte cardiaque peut être présente et doit être surveillée.

### ***1.3. Diagnostic***

Le diagnostic se fait par l'observation d'un déficit moteur ainsi qu'une hypertrophie musculaire. D'autres signes cliniques permettent de certifier le diagnostic, comme une augmentation du taux de créatine kinase sérique (enzyme musculaire libérée dans le sang lors de lésions musculaires). Une biopsie musculaire et l'analyse de la quantité de dystrophine exprimée permet d'affiner le diagnostic et de définir le type de myopathie (BMD ou DMD) dont le patient est atteint. De plus, l'analyse de la séquence d'ADN contenu dans les globules blancs (obtenus lors d'une prise de sang) permet de déterminer le type de mutation impliquée.

#### ***1.4. Origine génétique et hérédité***

Le gène impliqué dans la DMD et la DMB a été identifié en 1986 (Monaco et al., 1986) et il est localisé sur le bras court du chromosome X au niveau du locus Xp21 (Figure H-33 A). Le produit de ce gène, nommé DYS, est une protéine, la dystrophine, caractérisée en 1987 par Hoffman (Hoffman et al., 1987)(Figure H-33 B). Cette protéine est exprimée dans différents types cellulaires mais elle est principalement retrouvée dans tous les tissus musculaires (lisses, squelettiques et cardiaques). Les mutations du gène les plus fréquentes conduisent à une protéine tronquée, ne pouvant assurer sa fonction. Le gène de la dystrophine est un gène très long (plus de 2,6 millions de paires de bases) ce qui augmente le nombre de mutations potentielles. La partie codante du gène est composée de 79 exons séparés par des introns pouvant atteindre 200 kilobases (Koenig et al., 1987). Les mutations peuvent revêtir différentes formes, comme la délétion d'exons, la duplication ou la mutation ponctuelle en un point. Ceci conduit généralement à un décalage du cadre de lecture entraînant un codon stop prématuré et donc à la formation d'une protéine tronquée. La dystrophine, qui est une protéine sous-membranaire, n'est alors plus localisée à la membrane (Figure H-33 C).

La transmission de cette pathologie est récessive et liée au chromosome X (Figure H-34). Les mères sont alors porteuses génétiques mais saines car ne présentant pas de signes de la maladie. Les femmes ayant 2 chromosomes X et en transmettant un à leurs enfants, la probabilité qu'une mère porteuse le transmette à son enfant est de 1 sur 2 (Figure H-34). Il peut également survenir une mutation spontanée dans l'ovule, la mère n'est alors pas porteuse de l'anomalie génétique.

## **2. Approches et découvertes expérimentales de la DMD**

### ***2.1. Les modèles animaux***

Plusieurs modèles animaux existent, présentant une absence d'expression de la dystrophine dans les fibres musculaires. Trois modèles animaux sont bien connus et utilisés en laboratoires : la souris *mdx*, le chien GRMD et le chat HFMD.

### 2.1.1. La souris *mdx* (X-linked Muscular Dystrophy) (Figure H-35)

Cette souris est issue de la souche C57BL/10ScSn, sur laquelle est apparue une mutation ponctuelle sur l'exon 23 du gène codant la dystrophine, conduisant à un codon stop prématuré (Sicinski et al., 1989) et donc à une protéine de la dystrophine tronquée non fonctionnelle.

Cependant, la faiblesse musculaire n'est pas une caractéristique évidente chez les souris *mdx* et leur durée de vie n'est pas extrêmement réduite comparativement aux humains atteints de DMD (Lynch et al., 2001; Pastoret and Seville, 1995). Ces souris présentent quand même un pic de nécrose musculaire à 3-4 semaines (Tanabe et al., 1986). Les fibres sont régénérées et la majorité d'entre elles exhibent des noyaux centraux. Après la crise de nécrose précoce, le cycle de dégénération/régénération est continu et le remplacement des fibres musculaires par du tissu conjonctif est limité. Cependant, le diaphragme de la souris *mdx* possède un phénotype pathologique plus marqué que les autres muscles et plus proche des patients DMD (Stedman et al., 1991). De même, les souris *mdx* âgées présentent plusieurs caractéristiques de la pathologie, mais à des stades plus tardifs de leur vie comparativement aux patients DMD.

Cette différence observée entre les souris *mdx* et les patients DMD peut être expliquée par de multiples phénomènes. En effet, il semblerait que la souris compense l'absence de la dystrophine par une autre protéine ayant 80% d'homologie de séquence avec la dystrophine, l'utrophine (De La et al., 1999). Il a été montré que des souris *mdx* également déficientes en utrophine exhiberaient des caractéristiques phénotypiques plus sévères et similaires aux patients DMD (Deconinck et al., 1997; Grady et al., 1997). D'autres hypothèses suggèrent que les cellules satellites des souris possèdent un potentiel régénératif élevé (Grounds and McGeachie, 1992).



**Figure H-35** : Photographie de souris *mdx*, modèle murin de la DMD.

### 2.1.2. La dystrophie musculaire canine

La déficience en dystrophine a été observée dans plusieurs races de chiens mais le phénotype le mieux caractérisé est celui du golden retriever (GRMD pour golden retriever muscular dystrophy) (Cooper, 1989). La faiblesse musculaire est progressive et apparaît vers deux mois. La durée de vie de ces animaux est significativement réduite, contrairement aux souris *mdx* (Valentine et al., 1992). Les études histologiques des muscles des chiens GRMD présentent une nécrose, une fibrose ainsi qu'une régénération (Valentine et al., 1990). La stature de ces chiens est raide et leur démarche est hésitante. Ces animaux ont également une difficulté à ouvrir leur mâchoire et donc à se nourrir. Ce modèle animal est plus proche du phénotype DMD que le modèle murin mais peu pratique pour une l'expérimentation courante en raison des contraintes d'élevage et des problèmes d'éthique.

### 2.1.3. La dystrophie musculaire féline

La dystrophie musculaire féline (hypertrophic feline muscular dystrophy, HFMD) est rare et on observe une nette diminution d'expression de la dystrophine dans les muscles ainsi qu'une délétion du promoteur de la dystrophine musculaire (Winand et al., 1994). Les symptômes sont visibles au cours de la première ou deuxième année de vie de l'animal. Ceux-ci présentent une hypertrophie musculaire, une démarche anormale, une langue proéminente, ainsi que des signes histologiques de nécrose mais pas de fibrose musculaire (Gaschen et al., 1992). Ces chats sont également atteints de cardiomyopathie et l'avancée de la maladie provoque la mort prématurée (dans les 2 premières années de vie) chez la majorité des individus.

## ***2.2. La dystrophine et son complexe protéique associé***

### 2.2.1. Structure de la dystrophine

C'est une protéine intracellulaire du cytosquelette, de 427 kDa, appartenant à la famille des protéines  $\beta$ -spectrine/ $\alpha$ -actinine (Koenig et al., 1988). Elle est présente dans le muscle, le cortex cérébral et les cellules de Purkinje du cervelet, son expression étant sous l'influence de trois promoteurs spécifiques à chaque isoforme majoritaire dans chacun des tissus (pour revue, Blake et al., 2002). La dystrophine n'est pas exprimée au stade de myoblaste, mais elle est détectable lorsque les cellules se différencient au stade de myotube (Lev et al., 1987;

Nudel et al., 1988). Elle est présente dans tous les tissus musculaires squelettiques, lisses et cardiaques (Byers et al., 1991; North et al., 1993).

La structure de la dystrophine est organisée en quatre régions distinctes (pour revue, Blake et al., 2002) (Figure H-36 A).

- Le domaine N-terminal, domaine de liaison à l'actine, composé de 240 acides aminés.
- Le domaine central (suivant le domaine N-terminal), le plus long, est composé de 24 unités répétées similaires à la structure triple hélice de la spectrine. Ce fragment, le « rod domain », confère la propriété de flexibilité à la dystrophine. Le « rod domain » est terminé par une région contenant quatre prolines, suivit d'un domaine WW identifié comme pouvant lier d'autres protéines (notamment le  $\beta$ -dystroglycane).
- A la suite du domaine central, se trouve un domaine riche en cystéines. Il contient un domaine « EF-hand » similaire à celui de l' $\alpha$ -actinine, pouvant lier le calcium intracellulaire. Il comprend également un domaine ZZ, composé d'une quinzaine de cystéines. Ce domaine ZZ est semblable à celui retrouvé dans les motifs à doigt de zinc et peut lier la calmoduline de façon dépendante au calcium.
- Le domaine C-terminal contient deux domaines en hélice  $\alpha$  formant des domaines « coiled coil » impliqués dans la liaison de la dystrophine avec la dystrobrevine et d'autres protéines du complexe protéique associé à la dystrophine.

La structure et la localisation sous-membranaire de la dystrophine lui confèrent le rôle de lien entre la matrice extracellulaire, via le complexe protéique associé à la dystrophine (DAPs, dystrophin-associated proteins), et le cytosquelette, par sa liaison à l'actine (Figure H-36 B).

### 2.2.2. Le complexe protéique associé à la dystrophine

La dystrophine est liée au sarcolemme par un complexe protéique composé de plusieurs protéines (10 à 18 selon les auteurs) (Figure H-36 B). Ce complexe traverse la membrane plasmique pour lier le cytosquelette d'actine à la lame basale musculaire. Il peut être dissocié en trois sous-complexes, (i) le complexe des dystroglycane, (ii) le complexe sarcoglycane/sarcospane et (iii) le complexe protéique cytoplasmique (pour revue, Blake et al., 2002).

---

(i) Le complexe dystroglycane

Dans le muscle squelettique, deux isoformes de dystroglycanes cohabitent, l' $\alpha$ -dystroglycane qui est extracellulaire et de poids moléculaire de 156 kDa, et le  $\beta$ -dystroglycane qui est intra-membranaire et de poids moléculaire de 43 kDa (Figure H-36 B). Le domaine C-terminal du  $\beta$ -dystroglycane est cytoplasmique et riche en proline, permettant sa liaison avec la dystrophine (Jung et al., 1995; Suzuki et al., 1994), via le domaine « WW » et « EF hands » de la dystrophine (Rentschler et al., 1999). Le  $\beta$ -dystroglycane peut également lier son domaine C-terminal à la protéine adaptatrice Grb2 par son domaine SH3. Ceci suppose une participation possible du  $\beta$ -dystroglycane à la transduction de signaux extracellulaires dans le cytosquelette des cellules musculaires (Yang et al., 1995a). La cavéoline-3, spécifiquement exprimée dans le muscle, semble aussi se lier au domaine C-terminal du  $\beta$ -dystroglycane (Sotgia et al., 2000) et elle est surexprimée chez les patients DMD. Cette protéine est impliquée dans l'élaboration d'invaginations de la membrane plasmique dans la plupart des cellules. L'isoforme extracellulaire  $\alpha$ -dystroglycane lie la laminine- $\alpha$ 2 ainsi que d'autres protéines de manière dépendante du calcium. Toutes ces interactions impliquent le complexe dystroglycane dans divers processus cellulaires.

(ii) Le complexe sarcoglycane

Des protéines autres que les dystroglycanes sont localisées au niveau de la membrane plasmique et interagissent avec la dystrophine, ce sont les sarcoglycanes (Figure H-36 B). Dans le muscle cardiaque et squelettique, ce complexe est composé de quatre protéines transmembranaires,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ -sarcoglycanes (Lim and Campbell, 1998) (Figure H-36 B). Aux sarcoglycanes s'ajoute une protéine de la famille des tetraspanes, le sarcospane (Crosbie et al., 1997) (Figure H-36 B). L' $\alpha$ -sarcoglycane semble être spécifique du muscle cardiaque et squelettique, alors que le muscle lisse ne semble exprimer que les isoformes ( $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ). Ce complexe protéique est lié à la dystrophine mais les isoformes à l'origine de l'interaction restent encore à définir (pour revue, Blake et al., 2002). De plus, il semblerait que le  $\gamma$ -sarcoglycane porte des résidus tyrosine, suggérant un signal bidirectionnel avec les intégrines (Yoshida et al., 1998).

(iii) Le complexe protéique cytoplasmique

Ce complexe cytoplasmique comporte plusieurs protéines : les syntrophines ( $\alpha$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -syntrophine), la dystrobrevine, ainsi que la « nitric oxyde synthase » (NOs) (Figure H-36 B).

Les syntrophines sont distribuées de manière différentielle dans le muscle. En effet, l' $\alpha$ -syntrophine est localisée au sarcolemme de toutes les fibres musculaires, la  $\beta_1$ -syntrophine est principalement retrouvée dans les fibres musculaires rapides, alors que la  $\beta_2$ -syntrophine est concentrée à la jonction neuromusculaire (pour revue, Blake et al., 2002). Les syntrophines se lient directement à la dystrophine et à la dystrobrevine. Il a été montré que quatre syntrophines peuvent se lier au complexe protéique associé à la dystrophine (Newey et al., 2000). Ces liaisons se font sur deux sites du domaine C-terminal de la dystrophine, ainsi que sur deux sites de la dystrobrevine. Les syntrophines sont connues pour interagir avec une variété de molécules différentes dans le muscle, principalement par leur domaine PDZ (pour revue, Blake et al., 2002). L'une de ces protéines est la NOs qui se lie à l' $\alpha$ -syntrophine. Cette enzyme produit de l'oxyde nitrique, messager permettant de moduler la force contractile des fibres et inhibant la vasoconstriction lors d'exercices musculaires.

La dystrobrevine est une protéine de 87 kDa co-précipitant avec le récepteur à l'acétylcholine (Carr et al., 1989). C'est une protéine analogue à la dystrophine, possédant une forte homologie de séquence avec la terminaison carboxyle de la dystrophine (Wagner et al., 1993). Elle est particulièrement abondante au niveau des jonctions neuromusculaires. Les différentes isoformes de dystrobrevines ont la capacité de se lier à la dystrophine par des structures hélicoïdales répétées (Suzuki et al., 1995), elles peuvent également se lier aux syntrophines par l'intermédiaire de sites spécifiques (Peters et al., 1997). La distribution des différentes dystrobrevines dans le muscle est maintenant connue. L' $\alpha$ -dystrobrevine-1 et l' $\alpha$ -dystrobrevine-2 sont concentrées au niveau de la jonction neuromusculaire. L' $\alpha$ -dystrobrevine-3 est clairement présente dans le muscle cardiaque et squelettique, mais sa localisation reste encore à éclaircir (pour revue, Blake et al., 2002). Une récente étude a suggéré une liaison entre les  $\alpha$ -dystrobrevines et le complexe des sarcoglycanes (Yoshida et al., 2000). Cette association permettrait d'ancrer les différentes dystrobrevines au complexe protéique associé à la dystrophine.

### 2.2.3. Rôle de la dystrophine et de son complexe protéique associé

De nombreuses études sur l'absence de la dystrophine et/ou de son complexe protéique associé dans différentes pathologies a permis de mettre en avant un rôle mécanique de ce complexe mais également un rôle de signalisation.

Lors de la découverte de la dystrophine et des protéines qui lui sont associées, est apparue la notion de protection des fibres musculaires contre les dommages dus aux contraintes

mécaniques lors de la contraction et de la relaxation musculaire. En effet, chez les patients DMD, il y a une dégénérescence des fibres musculaires pouvant être due à un manque de maintien de l'intégrité de la membrane des cellules musculaires (Mokri and Engel, 1975; Rowland, 1976), en raison de l'absence de la dystrophine et de son complexe protéique au niveau du sarcolemme.

L'implication de la dystrophine et de son complexe protéique n'est pourtant pas cloisonnée à ce rôle. Plusieurs études ont montré l'implication de ces protéines dans des mécanismes de signalisation variés. Par exemple, le  $\beta$ -dystroglycane semble être impliqué dans la transduction du signal extracellulaire vers le cytosquelette de la cellule (Yang et al., 1995b). D'une manière plus générale, les dystroglycanes sont impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques comme la formation de la jonction neuromusculaire, la formation de la matrice extracellulaire ou encore la stabilisation des amas de récepteurs à l'acétylcholine au niveau de la plaque motrice. Ce complexe protéique n'a pas seulement un rôle de support structural mais il est également impliqué dans des mécanismes de signalisation permettant le maintien de l'intégrité du muscle squelettique (pour revue, Blake et al., 2002). Cependant, le rôle de chacun des protagonistes dans ces mécanismes n'est pas encore élucidé.

#### 2.2.4. Mutations du gène de la dystrophine et les pathologies associées

Les mutations conduisant à la DMD induisent généralement une absence ou une expression très réduite de la dystrophine, alors que celles impliquées dans la DMB résultent en une protéine partielle mais fonctionnelle.

Approximativement 65% des cas de DMD et DMB sont dus à une délétion d'une partie du gène de la dystrophine. La taille et la position de la délétion du gène ne sont pas corrélées à la sévérité de la pathologie (Monaco and Kunkel, 1988). Si la délétion n'affecte pas le cadre de lecture du gène, la protéine sera plus petite mais fonctionnelle, c'est le cas de la DMB. En revanche, si la délétion affecte le cadre de lecture et conduit à la formation d'un codon-stop prématuré, la protéine résultante sera tronquée et souvent non fonctionnelle, c'est le cas du phénotype DMD (pour revue, Blake et al., 2002). Le domaine central de la dystrophine étant le plus long, il est le plus exposé à ce type de délétions.

Un tiers des cas de DMD provient de très petites délétions ou de points de mutation conduisant à un codon-stop prématuré (Lenk et al., 1993; Roberts et al., 1994). Les transcrits ou les protéines tronquées sont alors instables. La dystrophine n'étant pas exprimée à la membrane, elle ne peut alors jouer son rôle dans le maintien de l'intégrité de la cellule.

Des mutations localisées au niveau du domaine N-terminal ont permis de montrer l'importance de la liaison de la dystrophine à l'actine. Ces mutations induisent un phénotype DMD, associé à une diminution de la quantité de protéines (Prior, 1995).

Il a été montré que lors d'une délétion de 46% de la séquence codante du domaine central de la dystrophine (délétion des exons 17 à 48), sans changement du cadre de lecture, le patient était atteint d'une DMB moyennement sévère (England et al., 1990). Cette « mini-dystrophine » est fonctionnelle car elle conserve ses domaines de liaison aux autres protéines et elle est notamment utilisée en transfection dans les stratégies thérapeutiques ou expérimentales. D'autres mutations peuvent également intervenir au niveau du domaine C-terminal de la protéine, domaine important pour des interactions protéines-protéines.

Il existe également des mutations affectant les protéines du complexe protéique associé à la dystrophine, engendrant divers phénotypes cliniques plus ou moins sévères.

### ***2.3. Relation entre l'absence de la dystrophine et le phénotype dystrophique***

Dans la dystrophie musculaire de Duchenne, le lien entre l'absence de la dystrophine au sarcolemme et la dégénérescence des fibres musculaires n'est pas encore ou pas très bien établi. Cependant, divers phénomènes ont été observés, supportés par différentes hypothèses développées dans les paragraphes suivants (pour revue, Constantin et al., 2006; Deconinck and Dan, 2007).

#### **2.3.1. L'Hypothèse mécanique**

Comme développé précédemment, il semblerait que la dystrophine et son complexe associé soient impliqués dans le maintien de l'intégrité de la cellule musculaire. En effet, pendant longtemps la fragilité membranaire des fibres de patients DMD a été associée à la perte de la dystrophine et de son complexe à la membrane (Mokri et al., 1975; Pestronk et al., 1982). L'intégrité de la membrane des cellules dystrophiques serait largement compromise suite à des contractions musculaires, (Moens et al., 1993; Petrof et al., 1993) d'où l'émergence de la notion de dommages membranaires induits par l'exercice musculaire. Ces micro-ruptures permettraient alors l'entrée de  $Ca^{2+}$  extracellulaire dans le cytoplasme, conduisant à la surcharge calcique. Cette hypothèse a été soutenue par l'effet protecteur de l'expression forcée de la mini-dystrophine dans les muscles de souris *mdx*, contre les lésions mécaniques lors de la contraction musculaire (Deconinck et al., 1996).

La fragilité membranaire a été démontrée de diverses façons, dont l'accumulation cytoplasmique de protéines qui ne sont normalement pas présentes dans les fibres musculaires, ainsi que l'observation de protéines spécifiques des fibres se retrouvant dans le sérum de patients DMD ou de souris *mdx*, comme la créatine kinase (Florence et al., 1985). Il a également été observé l'incorporation de colorant vital (bleu Evans ou orange Procion) dans les cellules dystrophiques (Bradley and Fulthorpe, 1978; Straub et al., 1997). Les micro-ruptures membranaires provoqueraient l'entrée de calcium dans la cellule, engendrant une déstabilisation des protéines formant les canaux calciques de fuite (leak channels), qui feraient entrer plus de calcium dans la cellule. Cette surcharge calcique sous-membranaire pourrait activer des protéases sous-sarcolemmiennes qui à leur tour activeraient les canaux calciques de fuite par protéolyse (Turner et al., 1991; Constantin et al., 2006). L'accumulation des ces phénomènes engendrerait un dysfonctionnement de la signalisation cellulaire associée à ces protéines.

Cependant, la validité de l'implication des micro-ruptures membranaires dans le phénotype dystrophique reste controversée car des études ont montré que la tension nécessaire pour casser la membrane plasmique de fibres provenant de souris *mdx* n'était pas différente de celle nécessaire pour les fibres de muscles sains (Franco, Jr. and Lansman, 1990; Hutter et al., 1991).

### 2.3.2. La surcharge calcique

A l'état de repos, la concentration calcique intracellulaire est d'environ 100 nM dans les conditions physiologiques pour les cellules musculaires. Le contrôle et le maintien de cette concentration basale sont primordiaux et tout dysfonctionnement de la régulation de l'homéostasie calcique est susceptible d'engendrer une cascade de réactions aboutissant à la mort de la cellule. L'une des hypothèses évoquées pour expliquer la nécrose musculaire dans la DMD est la surcharge calcique. Les premiers travaux sur les muscles de patients DMD ont effectivement mis en avant une perturbation de l'homéostasie calcique ainsi qu'une concentration en calcium supérieure à celle des muscles sains (Bodensteiner and Engel, 1978; Bertorini et al., 1982; Jackson et al., 1985). Des résultats similaires ont été observés sur des myotubes en culture provenant de patients DMD (Imbert et al., 1995), ainsi que sur des myotubes de lignées cellulaires déficientes en dystrophine (Marchand et al., 2004). Cependant, le lien entre l'absence de dystrophine et la dérégulation de l'homéostasie calcique conduisant à la surcharge calcique et à la nécrose musculaire reste encore mal compris. Cette

---

hypothèse ne fait pas l'unanimité et reste très controversée. En effet, si plusieurs groupes ont observé une augmentation globale de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  au repos dans les fibres de souris *mdx* (Turner et al., 1988; Bakker et al., 1993) et des myotubes de patients DMD (Mongini et al., 1988), d'autres rapportent qu'il n'y a aucune surcharge calcique dans les muscles des souris *mdx* ou des patients DMD (Gailly et al., 1993; Pressmar et al., 1994; Collet et al., 1999). Le problème reste d'actualité et non résolu, mais divers groupes travaillant sur la surcharge calcique essaient de comprendre quels sont les différents acteurs impliqués dans la dérégulation de l'homéostasie calcique.

#### 2.3.2.1. Influx provenant du milieu extracellulaire

L'hypothèse d'influx calciques provenant de la diffusion passive du calcium à travers des micro-ruptures membranaires étant difficile à concevoir biophysiquement, il a été suggéré la présence de canaux de fuite laissant transiter le calcium (Turner et al., 1991; Fong et al., 1990). Ces études ont également démontré que leur activité serait plus importante dans les cellules de souris *mdx* par rapport aux souris saines (Hopf et al., 1996; Tutdibi et al., 1999). Ces canaux seraient sensibles aux agents pharmacologiques régulant les canaux calciques dépendants du voltage (Hopf et al., 1996; Tutdibi et al., 1999), mais il semblerait qu'ils soient activés par une déplétion des stocks calciques intracellulaires (Hopf et al., 1996). La suractivation des « store-operated channels » (SOCs) a également été observée dans les fibres de souris *mdx* par rapport aux fibres de souris normales (Vandebrouck et al., 2002). De plus, dans des myotubes de lignées myogéniques, l'expression forcée de la mini-dystrophine permet de réduire l'entrée de calcium par les SOCs par rapport aux myotubes déficients en dystrophine, ramenant l'influx calcique à des valeurs retrouvées dans des lignées exprimant la dystrophine entière native (Vandebrouck et al., 2006).

Cependant, ces canaux membranaires suractivés dans les cellules déficientes en dystrophine semblent avoir des propriétés de stretch-activated channels (SACs) (Franco, Jr. et al., 1990). En effet, la probabilité d'ouverture de ces canaux serait augmentée par des étirements de la membrane plasmique et elle serait plus importante dans les fibres de souris *mdx* par rapport aux souris saines (Franco-Obregon, Jr. and Lansman, 1994), ces résultats furent confirmés par plusieurs études (Leijendekker et al., 1996; Tutdibi et al., 1999). Des observations similaires ont été faites dans des myotubes provenant de patients DMD, où les SACs seraient plus actifs que dans des myotubes provenant de patients sains (Vandebrouck et

al., 2001). Ces canaux mécano-sensibles seraient aussi des SOCs et l'identité moléculaire impliquée serait les TRPC, notamment TRPC1 et TRPC4 (Vandebrouck et al., 2002).

Il semblerait que les canaux calciques voltage-dépendant s'activent plus facilement dans des myotubes obtenus à partir de biopsies de patients DMD, mais la densité de courant est plus faible que chez les patients sains (Imbert et al., 2001), posant le problème de leur implication dans l'augmentation de l'influx calcique global. Cependant, une autre étude montre que l'expression de la mini-dystrophine dans des cellules musculaires de souris *mdx* restaure au courant calcique de type L des propriétés similaires à celles trouvées dans les cellules saines (Friedrich et al., 2004). Ces canaux pourraient être régulés par la PKA via la dystrophine et le cytosquelette d'actine (Johnson et al., 2005).

### 2.3.2.2. Implication du réticulum sarcoplasmique

Le RS est le compartiment privilégié de stockage du calcium des muscles squelettiques et joue donc un rôle important dans la régulation de l'homéostasie calcique. Il est donc naturel de l'étudier pour essayer d'élucider l'origine de la surcharge calcique dans les muscles dystrophiques. La première cible étudiée fut la pompe calcique ATPase (la SERCA) du RS. En 1986, Landi et collaborateurs observèrent une altération de la fonction de capture du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS dans les cellules de patients DMD (Landi et al., 1986). Plus tard, ces observations furent confirmées dans des cellules de souris *mdx*, mais sans modification de la densité de SERCA à la membrane du RS ou encore de changement de leur sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  (Kargacin and Kargacin, 1996; Culligan et al., 2002). Ces résultats restent controversés car d'autres études montrent qu'il n'y a pas d'altération de fonctionnement de la pompe calcique du RS (Takagi et al., 1992; Khammari et al., 1998).

Le problème pourrait alors venir d'une altération de la capacité du RS à séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$ , dû à la surcharge calcique (Lamb and Cellini, 1999). Plusieurs groupes ont montré une diminution de la quantité de plusieurs protéines séquestrant le calcium dans le RS, dont la calséquestrine (Niebroj-Dobosz et al., 1989; Doran et al., 2004).

Une autre hypothèse avancée est celle de la fuite spontanée de calcium du RS dans les cellules déficientes en dystrophine (Takagi et al., 1992; Divet and Huchet-Cadiou, 2002). Une augmentation de libération calcique du RS dans les cellules de patients DMD a été observée par Deval et collaborateurs (Deval et al., 2002) suggérant une augmentation du phénomène de CICR. Cependant, l'expression des canaux DHPRs et RyRs ne semble pas être modifiée dans les muscles déficients en dystrophine (Culligan et al., 2002). L'autre canal calcique du RS

candidat au rôle de fuite du  $\text{Ca}^{2+}$  est le récepteur à l'IP3. Il a été montré qu'à l'état de repos, le taux basal d'IP3 était 2 à 3 fois supérieur dans les cellules déficientes en dystrophine par rapport aux cellules normales (Liberona et al., 1998). De plus, lors de la dépolarisation membranaire par une solution potassique, l'augmentation du taux d'IP3 dans les cellules dystrophiques était supérieure à celle des cellules normales et il restait plus longtemps à des niveaux élevés (Liberona et al., 1998). Les précédents travaux du laboratoire ont également montré qu'après stimulation, la libération calcique dépendante des IP3R est plus importante dans les myotubes déficients en dystrophine, comparativement aux myotubes exprimant la mini-dystrophine (Balghi et al., 2006a). De plus, les libérations calciques spontanées au repos sont plus nombreuses dans les cellules déficientes en dystrophine et sont en partie dépendantes des IP3R (Balghi et al., 2006b).

#### 2.3.2.3. Implication de la mitochondrie

La mitochondrie possédant des capacités de séquestration de calcium, elle peut participer à la régulation de l'homéostasie calcique des cellules musculaires. Ces organelles peuvent capturer rapidement le calcium entrant dans la cellule provenant des SOC, régulant ainsi les entrées capacitatives de calcium (Hoth et al., 1997; Gilabert and Parekh, 2000). Dans les cellules musculaires de patients DMD et de souris *mdx*, un déficit de calmitine (Lucas-Heron, 1996), protéine mitochondriale fixant le calcium, peut entraîner un excès d'ions libres dans la matrice mitochondriale, altérant ainsi son fonctionnement. L'utilisation d'une sonde calcique mitochondriale, l'aequorine recombinante, a permis de mettre en évidence une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries de myotubes de souris *mdx* supérieure à celle observée dans les myotubes de souris saines, pendant la dépolarisation membranaire (Robert et al., 2001). De même, la quantité de calcium entrant dans la mitochondrie après déplétion des stocks intracellulaires de calcium est plus importante dans les cellules déficientes en dystrophines que dans les cellules normales (Vandebrouck et al., 2006).

#### 2.3.2.4. Surcharge calcique et mort des fibres musculaires

Une des conséquences de la surcharge calcique serait l'activation de protéases calcium-dépendantes telles que les calpaïnes. Ces protéases seraient impliquées dans la dégradation des protéines et dans la nécrose du muscle dystrophique (Turner et al., 1988). En effet, ces protéases peuvent dégrader un nombre varié de protéines, notamment la pompe calcique ATPase du sarcolemme et les canaux ioniques de la membrane plasmique (Zaidi and

Narahara, 1989; Goll et al., 1983). La conséquence directe envisageable est qu'en absence de pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, le calcium ne peut plus être expulsé vers le milieu extracellulaire, la régulation de son homéostasie est moins performante, ce qui maintiendrait la surcharge calcique. Il a effectivement été montré que dans les cellules musculaires déficientes en dystrophine, l'activité des calpaïnes était augmentée par rapport à celle observée dans les cellules saines (Turner et al., 1993; Spencer et al., 1995). Il a également été rapporté qu'un influx calcique persistant pouvait activer la protéolyse et la phospholipolyse dépendante du calcium (Turner et al., 1991; Alderton and Steinhardt, 2000), engendrant la dégradation du muscle dystrophique et également l'activation des canaux calciques du sarcolemme (Turner et al., 1993). Les mitochondries jouent également un rôle important dans l'homéostasie calcique et la balance entre la mort et la survie cellulaire (voir paragraphe sur « la mort cellulaire » du chapitre « Homéostasie calcique du muscle squelettique»). Tous ces phénomènes engagent la cellule dans un processus de mort cellulaire inéluctable.

### 2.3.3. Implication du stress oxydatif et de l'inflammation

Le stress oxydatif, caractérisé par une dérégulation de la synthèse de molécules oxydantes et la capacité de la cellule à les évacuer, pourrait être impliqué dans la DMD (Austin et al., 1992; Ragusa et al., 1997). A ces découvertes s'ajoutent des observations préalables, notamment de changements biochimiques dans les muscles déficients en dystrophine, suggérant un stress oxydatif et une augmentation de l'oxydation des protéines et de peroxydation lipidique (Hunter and Mohamed, 1986; Ragusa et al., 1997), ainsi que des dommages au niveau de l'ADN (Rodriguez and Tarnopolsky, 2003). Le stress oxydatif a également été détecté comme signe primaire de dégénérescence musculaire chez les souris *mdx* (Disatnik et al., 1998). Des essais de traitements antioxydants ont été réalisés avec succès chez les souris *mdx* (Buetler et al., 2002) mais ils se sont soldés par un échec chez les patients DMD (Backman et al., 1988; Fenichel et al., 1988).

Il a également été observé une réponse inflammatoire chronique chez les patients DMD (Haslett et al., 2002). Des tests de déplétions de certains acteurs de la réponse immunitaire, comme les lymphocytes T  $\text{CD4}^+$  et  $\text{CD8}^+$  ainsi que les neutrophiles, ont montré une diminution du phénotype pathologique chez les souris *mdx* (Spencer et al., 2001). De plus, il a également été démontré une surexpression du  $\text{TNF-}\alpha$  dans les muscles déficients en dystrophine (Porreca et al., 1999). Ce processus inflammatoire pourrait donc accentuer la maladie. Depuis de nombreuses années, les patients DMD sont traités avec des

---

corticostéroïdes ayant des propriétés anti-inflammatoires, le principal utilisé étant la Prednisolone, ce qui retarde significativement la progression de la maladie et la perte de la faculté ambulatoire (Merlini et al., 2003; Yilmaz et al., 2004). Cependant, ce traitement est seulement palliatif et non curatif.

### **3. Approches thérapeutiques**

Les différentes approches thérapeutiques mises en place dans le cadre de la DMD ou DMB sont soit curatives (thérapies visant la correction de la mutation du gène de la dystrophine), soit palliatives (thérapies limitant les effets indésirables de la pathologie). Ces thérapies peuvent être regroupées en 3 composantes majeures, la thérapie cellulaire, la thérapie génique et la thérapie pharmacologique.

#### ***3.1. Stratégies thérapeutiques visant la réexpression de la dystrophine***

##### **3.1.1. Thérapie cellulaire**

Le principe général de la thérapie cellulaire est de prélever des cellules chez un donneur sain, de les purifier, de les multiplier et ensuite de les réimplanter chez le patient. Différents essais ont été effectués chez la souris *mdx* et chez des enfants DMD, en injectant des myoblastes ou des cellules souches embryonnaires. Les premiers résultats obtenus chez la souris furent prometteurs avec une réexpression de la dystrophine. En revanche, aucun effet bénéfique n'a été constaté chez les enfants DMD (Voisin and De La, 2004). D'autres problèmes majeurs sont apparus lors de l'injection de myoblastes, notamment celui du rejet des cellules implantées par le système immunitaire. Le taux de mortalité des cellules injectées s'élève à 70-80% dans les 72 heures (Guerette et al., 1997) suivant l'injection et peut atteindre 99% après plusieurs jours (Beauchamp et al., 1999). De plus, les myoblastes injectés dans les muscles ont une faible capacité à proliférer et à migrer vers les zones cibles. De ce fait, se pose le problème d'implanter beaucoup de cellules en de multiples injections (Voisin et al., 2004). Tous ces résultats non concluants ont permis de rediriger la recherche vers un autre aspect de la thérapie cellulaire, en utilisant les cellules souches. Ces premières approches semblent prometteuses, mais deux problèmes apparaissent, celui de la durée de vie des cellules exprimant la dystrophine chez le patient (Ferrari and Mavilio, 2002), et celui de

---

l'éthique et de la législation du point de vue de l'utilisation de cellules souches embryonnaires.

Cette approche fut donc une immense source d'espoir pour la guérison des malades mais les résultats actuels ne permettent cependant pas d'envisager, du moins à l'heure actuelle, une thérapie à long terme.

### 3.1.2. Thérapie génique (Figure H-37)

Une autre approche développée permettant de restaurer la dystrophine à la membrane des cellules musculaires est d'introduire le gène de la dystrophine non muté dans le génome humain. Comme la thérapie cellulaire, la thérapie génique s'avéra être un énorme défi à relever. Cependant, au cours des années, d'importantes avancées ont permis d'optimiser les vecteurs d'expression ainsi que les méthodes permettant l'expression de la dystrophine au sein des cellules atteintes. Divers vecteurs d'expression furent utilisés, mais le problème récurrent fut celui de la taille du gène de la dystrophine, beaucoup trop grand pour la capacité des vecteurs d'expression classique. L'utilisation de la mini-dystrophine ou de la micro-dystrophine, produisant une dystrophine tronquée mais fonctionnelle, apporta la solution au problème (Voisin et al., 2004; Wagner, 2008). Les vecteurs les plus utilisés sont les adéno-virus associés (AAV, adeno-associated virus), qui n'ont pas de difficulté à franchir la membrane plasmique (Pruchnic et al., 2000). Cependant, ils ont une faible capacité d'encapsulation et nécessitent l'utilisation de la mini ou micro-dystrophine. Ces vecteurs sont également intéressants pour leur haute capacité de transfert de gène, leur stabilité d'expression du transgène et leur faible prédisposition à induire la réponse immunitaire. L'utilisation combinée des AAVs et de la mini-dystrophine a été bénéfique chez les souris *mdx*. Effectivement, il a été observé une restauration membranaire du complexe protéique associé à la dystrophine, une diminution du nombre de fibres à noyaux centraux, ainsi qu'une protection de l'intégrité de la fibre musculaire, même après exercice (Wang et al., 2000; Fabb et al., 2002). L'utilisation du vecteur AAV contenant une micro-dystrophine sous le contrôle d'un promoteur cytomegalovirus est en phase I d'essai clinique chez de jeunes garçons DMD. Cet essai clinique doit apporter beaucoup de réponses, notamment sur l'induction de réponse immunitaire ou encore l'expression sélective de la dystrophine dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques.

### 3.1.3. Saut d'exon (Figure H-38)

Les deux tiers des patients atteints de la DMD présentent une mutation ou une délétion affectant le cadre de lecture, ce qui conduit à la formation d'un codon-stop prématuré et donc à une dystrophine tronquée non fonctionnelle. La stratégie du saut d'exon consiste à épisser de façon artificielle et forcée l'exon sur lequel a lieu la mutation, permettant ainsi le maintien du cadre de lecture et aboutissant à une dystrophine tronquée mais fonctionnelle. En 1998, Dunckley et al., ont fait des essais précliniques sur des souris *mdx* en utilisant des oligonucléotides antisens (AONs, antisense oligonucleotides) encadrant l'exon muté (Dunckley et al., 1998). Chez la souris *mdx*, la mutation engendrant le décalage du cadre de lecture est positionnée sur l'exon 23. Cette équipe a donc utilisé un oligonucléotide antisens permettant l'épissage de l'exon 22 à 30 inclus, sautant ainsi l'exon 23 portant la mutation. Cette étude a montré une expression membranaire de la dystrophine tronquée chez les souris *mdx* (Dunckley et al., 1998).

En 2002, une équipe du généthon (Goyenvalle et al., 2004) a obtenu des résultats prometteurs grâce à l'utilisation d'un ARN nucléaire de petite taille (snRNA, small nuclear RNA), l'U7, inclus dans un AAV. Ce snRNA a été choisi pour sa capacité à s'inclure dans le "spliceosome" (complexe permettant l'épissage), ainsi que sa capacité à permettre la localisation des oligonucléotides se traduisant par l'épissage du seul exon 23. Après injection intramusculaire ou intraveineuse chez la souris *mdx*, ils ont observé la réexpression de la dystrophine tronquée à la membrane dans 70% des fibres musculaires ainsi que le réadressage des DAPs à la membrane. Cette expression membranaire serait stable et il y aurait également une récupération de la force musculaire.

Récemment, un essai clinique a été mis en place pour l'utilisation de l'oligonucléotide antisens 2-O-methyl phosphothioate. Cette étude a montré un saut de l'exon 51 et la réexpression de la dystrophine tronquée à la membrane, 28 jours après l'injection unique de l'oligonucléotide dans le tibialis antérieur de 4 patients DMD (van Deutekom et al., 2007)).

## 3.2. Autres stratégies thérapeutiques

### 3.2.1. Surexpression d'utrophine (Figure H-39)

La découverte de l'utrophine (Love et al., 1989) a ouvert une nouvelle voie thérapeutique à explorer. En effet, l'intérêt de cette protéine est qu'elle contient 80% d'homologie de séquence avec la dystrophine (Blake et al., 1996). Cette protéine de 395 kDa est présente sous

la membrane des fibres musculaires au niveau des jonctions neuromusculaires. Elle conserve les mêmes propriétés structurales que la dystrophine, à savoir un domaine de liaison à l'actine en N-terminal, un domaine central, un domaine riche en cystéine ainsi qu'un domaine C-terminal pouvant se lier à un complexe protéique.

Le rôle de l'utrophine a été établi grâce à l'utilisation de souris *mdx* « knock out » (KO) pour le gène de l'utrophine (souris *mdx utr*<sup>-/-</sup>). Ces souris présentent un phénotype dystrophique plus sévère que les souris *mdx* et comparable à celui des patients DMD (Deconinck et al., 1997). Cette double déficience conduit à la mort prématurée de l'animal. L'expression d'un transgène codant pour une utrophine tronquée réduit le taux de créatine kinase sérique de 75%, ainsi que le nombre de fibres musculaires à noyaux centraux (Tinsley et al., 1996). Elle permet également la relocalisation au sarcolemme du complexe protéique associé à la dystrophine et l'amélioration des performances mécaniques des muscles. On observe aussi un retour à la normale du taux calcique intracellulaire au repos (Tinsley et al., 1996). Des effets similaires ont été décrits avec l'utilisation d'un transgène codant pour l'utrophine entière (Tinsley et al., 1998). De plus, la surexpression d'utrophine dans des cellules non musculaires ne semble pas être toxique (Fisher et al., 2001), ne nécessitant pas de cibler les cellules musculaires lors des thérapies.

Diverses stratégies ont été mises en place permettant la surexpression d'utrophine chez les souris *mdx*, dont la thérapie génique et cellulaire. Une autre thérapie développée est la pharmacologie, par l'utilisation de molécules stimulant l'expression d'utrophine (Voisin et al., 2004).

### 3.2.2. Thérapies pharmacologiques

Les stratégies pharmacologiques développées permettent une amélioration de la vie quotidienne des patients, mais pas une guérison. Elles visent à stimuler la myogénèse, limiter la dégénérescence des fibres musculaires ou encore réguler l'homéostasie intracellulaire.

#### 3.2.2.1. Les corticostéroïdes

Ce sont les molécules les plus étudiées dans la DMD, le principal stéroïde utilisé étant la prednisolone. Dans les cellules en culture, cette molécule stimule la myogénèse (Hardiman et al., 1993) et prévient le stress hypoosmotique pouvant induire une augmentation du taux de calcium intracellulaire (Leijendekker et al., 1996). Il a été montré par des études cliniques, des

effets bénéfiques sur la force musculaire, qui semblent optimaux dans les phases précoces de la maladie. En revanche, les traitements à la prednisolone ne prolongent pas la capacité ambulatoire des patients DMD et ne retarde pas non plus leur décès prématuré (pour revue, (Voisin et al., 2004). Plusieurs théories sur le mécanisme d'action des stéroïdes ont été proposées, mais ce mécanisme reste non élucidé.

#### 3.2.2.2. La créatine

La créatine semble activer la pompe calcique ATPase du reticulum sarcoplasmique (SERCA) des cellules en culture (Pulido et al., 1998), réduisant ainsi l'augmentation du taux de calcium intracellulaire. La créatine aurait également la propriété de protéger les cellules en culture de la mort cellulaire et se stimuler la myogénèse. De plus, la respiration mitochondriale serait stimulée, augmentant le taux d'ATP, énergie nécessaire à l'activité des pompes calciques SERCA (Passaquin et al., 2002). Les différents modes d'action de la créatine vont dans le sens d'une régulation de l'homéostasie calcique des cellules musculaires, et donc de la survie cellulaire.

#### 3.2.2.3. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)

L'IGF-1 est un facteur de croissance clé, car il intervient dans la régénération musculaire en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules satellites (Engert et al., 1996). L'expression de l'IGF-1 chez les souris *mdx Igf<sup>+/+</sup>* (*mdx : Igf<sup>+/+</sup>*) montre une hypertrophie musculaire, une augmentation de la force musculaire ainsi qu'une diminution de la nécrose et de la fibrose (Barton et al., 2002). Des effets contraires de l'IFG-1 ont été observés chez des souris transgéniques, notamment un effet cardiaque délétère avec une augmentation de la fibrose et une diminution de la performance systolique (DeLaughter et al., 1999). Ces différences semblent être dues au degré d'implication du promoteur induisant l'expression de l'IGF-1.

#### 3.2.2.4. La gentamicine

La gentamicine est un antibiotique aminoglycoside pouvant supprimer les mutations non-sens chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Singh et al., 1979). Lorsqu'elle est utilisée sur des cellules musculaires en culture provenant de souris *mdx*, elle améliore l'expression de la dystrophine et de sa localisation membranaire. In vivo, le traitement à la gentamicine de souris *mdx* induit une réexpression de la dystrophine à la membrane plasmique des fibres

musculaires (Barton-Davis et al., 1999). Il a également été démontré que chez les souris *mdx*, l'expression protéique du RyR2 était diminuée dans les myocytes vasculaires. L'utilisation de la gentamicine permet d'augmenter l'expression protéique du RyR2 à des niveaux similaires à ceux trouvés chez la souris saine et permet également de rétablir le signal calcique dépendant de la réserve intracellulaire de calcium (Morel et al., 2009).

#### 3.2.2.5. La myostatine

La myostatine est un membre de la famille des facteurs TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). La myostatine régule la myogénèse en prévenant la transition de la phase G<sub>1</sub> à S du cycle cellulaire et diminue donc la prolifération des myoblastes en culture (Thomas et al., 2000) en réprimant l'activité des facteurs myogéniques. Les souris *mdx* KO pour le gène de la myostatine présentent un phénotype pathologique moins sévère avec une augmentation de la force musculaire, une réduction de la fibrose et une diminution du remplacement du tissu musculaire par du tissu adipeux (Wagner et al., 2002). La thérapie pharmacologique mise au point par le groupe de Khurana consiste à injecter des anticorps monoclonaux dirigés contre la myostatine chez les souris *mdx* afin de bloquer la myostatine endogène. Ils ont observé un taux de créatine kinase sérique faible, une diminution de la dégénérescence et une augmentation de la masse musculaire (Bogdanovich et al., 2002).

Parmi les différentes thérapies curatives, celle de la thérapie génique et du saut d'exon paraissent être les plus prometteuses. Effectivement, des essais cliniques ont débuté chez l'Homme. Le problème reste à savoir si les cellules musculaires pourront exprimer la dystrophine sur le long terme et si cela sera suffisant pour stopper la nécrose des muscles et que ceux-ci gagnent en force. En attendant une réelle thérapie curative, des progrès dans la thérapie pharmacologique peuvent être une voie intéressante afin de limiter la progression de la maladie chez les patients atteints.

## Position du problème et objectifs du travail

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique caractérisée par une dégénérescence musculaire progressive liée à une nécrose des cellules musculaires. L'origine de cette pathologie est l'absence de la dystrophine qui est une protéine sous-membranaire permettant le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Le lien entre l'absence de dystrophine et la mort des cellules musculaires reste encore mal établi. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence une dérégulation de l'homéostasie calcique des cellules musculaires déficientes en dystrophine, aboutissant à la surcharge calcique de ces cellules (Bodensteiner et al., 1978 ; Jackson et al., 1985; Imbert et al., 1995).

De plus, les précédents travaux du laboratoire ont montré qu'une lignée cellulaire myogénique déficiente en dystrophine présentait également une surcharge calcique et une mort cellulaire prématurée (Marchand et al., 2004). Ainsi, l'expression expérimentale de la mini-dystrophine, une version courte mais fonctionnelle de la dystrophine, au sein de ces cellules ramène à la normale le taux basal de calcium et les protège de la mort cellulaire (Marchand et al., 2004; Constantin et al., 2006). Il a également été mis en évidence une entrée de calcium de type capacitatif, c'est-à-dire dépendante de l'état des réserves intracellulaires, supérieure dans les cellules déficientes en dystrophine par rapport aux cellules exprimant la mini-dystrophine (Vandebrouck et al., 2007), ainsi qu'une recapture plus importante du calcium par les mitochondries lors de ces influx calciques (Vandebrouck et al., 2006). La surcharge calcique des mitochondries ainsi que l'influx calcique plus important des cellules déficientes en dystrophine peuvent conduire à la mort prématurée de ces cellules.

Par ailleurs, Araya et collaborateurs (Araya et al., 2003) ont également montré une production plus importante d'IP3 dans des cellules musculaires déficientes en dystrophine comparativement aux cellules contrôles, lors de dépolarisations membranaires par une solution hyperpotassique. De plus, les cellules déficientes en dystrophine présentent également une suractivation de la voie de l'IP3, conduisant à des libérations calciques (spontanées ou par dépolarisation membranaire) à travers ses récepteurs (IP3Rs) plus importantes dans les cellules sans dystrophine (Balghi et al., 2006a; Balghi et al., 2006b). Ces travaux suggèrent donc une implication de la voie de l'IP3 et de ses récepteurs dans la surcharge et la dérégulation calcique des cellules musculaires déficientes en dystrophine.

Le but général du présent travail a alors été de comprendre plus profondément cette implication de la voie des IP3.

Dans un premier temps, l'objectif du travail a été d'explorer les mécanismes conduisant à la suractivation de la voie de l'IP3. Pour cela, nous avons étudié le niveau d'expression des récepteurs à l'IP3 dans les lignées cellulaires exprimant ou non la mini-dystrophine, ainsi que les mécanismes régulant le taux d'expression de ces récepteurs.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la relation entre la mort cellulaire prématurée des cellules déficientes en dystrophine et la suractivation de la voie de l'IP3.

Ensuite nous avons étendu l'étude aux myotubes provenant de cultures primaires de souris *mdx* et de souris contrôles B110 afin d'observer la présence ou non d'une suractivation de la voie de l'IP3 dans les cellules déficientes en dystrophine.

Et enfin, nous avons amorcé l'étude des phénomènes de « calcium-induced calcium-release » à différents stades du développement des cellules musculaires, c'est à dire les myotubes en développement et les fibres matures des souris *mdx* et B110. Par cette dernière étude, à l'aide d'expériences de « décageage » calcique nous avons voulu savoir si, au-delà des différences dans les mécanismes de constitution de la surcharge calcique, il était possible d'observer des différences, entre les deux types de cellule ou de fibre, dans la diffusion et/ou le management de ce calcium.

# I. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé provient de lignées cellulaires myogéniques ou de modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Les lignées cellulaires, SolD(+) exprimant la mini-dystrophine et SolC1(-) n'exprimant pas la mini-dystrophine, permettent d'obtenir rapidement et facilement des myotubes matures pour les différentes études comparatives.

Les souris C57 Black 10 (contrôles) et C57 Black 10 *mdx* (déficientes en dystrophine), permettent d'effectuer des études comparatives à deux stades de maturation du muscle squelettique : les myotubes matures et les fibres.

## **1. Lignées cellulaires**

### ***1.1. Obtention des lignées***

Deux types de lignées cellulaires ont été utilisées, la lignée SolC1(-) et la lignée SolD(+), toutes deux sont issues de la lignée myogénique Sol8 (don du Pr. Isabelle Martelly, Université de Paris XII, Créteil). Cette lignée a été isolée à partir du muscle soléaire de souris normale C3H (Mulle et al., 1988). La perte de l'expression de la dystrophine de la lignée Sol8 s'est faite après clonages successifs par dilution limite. Cette lignée a ensuite été transfectée par un vecteur rétroviral d'expression (pTG5251, sélection par la néomycine) contenant ou non l'ADNc codant pour la mini-dystrophine, donnant lieu à la lignée SolD(+) exprimant la mini-dystrophine de façon stable et à la lignée SolC1(-) n'exprimant pas la dystrophine (Marchand et al., 2004). Ces deux lignées ayant une capacité importante à fusionner.

L'ADNc codant pour la mini-dystrophine a été isolé chez un patient asymptomatique atteint d'une forme légère de myopathie: la dystrophie musculaire de Becker (BMD). Cet ADNc a l'avantage d'être de taille réduite (6,3 kb) par rapport à celui de la dystrophine entière (14 kb) le rendant ainsi plus facile à transfecter. La protéine alors exprimée est une dystrophine tronquée en son domaine central, de 229 kDa (427 kDa pour la dystrophine entière). Gardant ses extrémités N et C terminales, la mini-dystrophine conserve ses propriétés de liaison à l'actine et à son complexe glycoprotéique.

### ***1.2. Décongélation des cellules***

Les cellules sont conservées dans des cryotubes placés dans l'azote liquide (-196°C), dans un milieu de congélation spécifique (Annexe 1) contenant du DMSO (Sigma) afin d'assurer la cryoprotection des cellules. La décongélation des myoblastes se fait rapidement en plongeant le cryotube dans l'eau du bain-marie à 37°C. Les cellules décongelées sont resuspendues dans un grand volume (10 ml) de milieu de décongélation (Annexe 1) afin de réduire la toxicité du DMSO. Ce volume de suspension cellulaire est ensuite réparti dans deux flacons à bouchon ventilé de 25 cm<sup>2</sup> (5 ml par flacon). Les myoblastes sont ensuite conservés dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 99% humidité). Le milieu de décongélation est remplacé par du milieu de prolifération (Annexe 1) au bout de 24 heures pour ne pas prolonger le contact des cellules avec le DMSO. Ces cellules peuvent être repiquées lorsqu'elles ont atteint une confluence de 50 à 60%.

### ***1.3. Entretien des cellules***

Lorsque les cellules en culture atteignent un niveau de confluence suffisant, elles sont repiquées afin d'entretenir une routine et/ou de les ensemercer en vue d'expérimentations ultérieures. Le degré de confluence avant repiquage ne doit pas dépasser 80% car elles pourraient fusionner et entrer en différenciation terminale.

Le milieu de culture est retiré et remplacé par 1 ml de trypsine-EDTA (Gibco) pour un flacon de routine de 25 cm<sup>2</sup>. La trypsine est retirée au bout d'une minute, laissant un film à la surface des cellules. Le flacon est ensuite placé à l'incubateur (37°C) pendant 5 minutes, permettant une meilleure efficacité de la trypsine. Une fois les cellules décollées (décollement contrôlé au microscope), elles sont resuspendues dans 5 ml de milieu de prolifération.

Cette suspension cellulaire permet de réaliser des routines de densités différentes suivant le besoin en cellules à venir (routine au 1/10 ; au 1/25 ou au 1/50). Le volume désiré de suspension cellulaire est dilué dans du milieu de prolifération et distribué dans des flacons à bouchon ventilé qui sont ensuite placés à l'incubateur.

La même suspension cellulaire est utilisée pour ensemercer les cellules dans différents supports suivant les expérimentations à venir. Les cellules sont comptées sur cellule de Mallassez et diluées à différentes concentrations afin d'obtenir une confluence de 80% plus ou moins rapidement. Cette suspension cellulaire est alors répartie dans des plaques à 6 puits (Ø 33 mm), plaques à 12 puits (Ø 21 mm), plaques à 96 puits (Ø 6 mm), dans lesquels sont disposées des lamelles de verre recouvertes de gélatine (sauf pour les plaques à 96 puits). Lorsque les myoblastes sont confluent (80% de confluence), le milieu de prolifération est

remplacé par du milieu de fusion (Annexe 1), ce qui va permettre la différenciation des myoblastes en myotubes.

#### ***1.4. Congélation des cellules***

La congélation des cellules permet le renouvellement du stock cryogénique. Les cellules sont trypsinisées et resuspendues dans 10 ml de milieu de prolifération. Cette suspension cellulaire est centrifugée à 900 rpm pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans du milieu de congélation préparé extemporanément et conservé sur glace à 4°C, à une concentration de 1 million de cellule par ml. Cette suspension cellulaire est introduite dans des cryotubes stériles à raison de 1 ml par cryotube. Les cryotubes sont ensuite placés dans une boîte de congélation spéciale à -80°C toute la nuit. Cette boîte permet une congélation progressive des cellules en faisant baisser la température des cryotubes d'un degré par minute. Les cryotubes peuvent être transférés dans l'azote liquide (-196°C) le lendemain.

#### ***1.5. Utilisation et évolution des cellules en culture***

Lorsque les myoblastes atteignent une confluence de l'ordre de 80% la différenciation est induite en remplaçant le milieu de prolifération par du milieu de fusion (milieu pauvre en sérum de veau). Les myoblastes mononucléés s'alignent puis fusionnent pour former des myotubes plurinucléés. Les expérimentations se font sur des myotubes après 4 jours après l'induction de la fusion (D4). C'est le temps nécessaire à la dystrophine pour être correctement exprimée à la membrane des myotubes sans que ceux-ci n'aient amorcé leur nécrose.

## **2. Modèles animaux**

Les études sont réalisées de manière comparative sur deux types de préparation provenant de souris de la lignée contrôle C57BL/10 et de la lignée C57BL/10 *mdx*, qui est le modèle murin de la DMD (Bulfied et al., 1984). Les animaux utilisés pour les préparations sont âgés de 4 semaines, ce qui correspond au pic de dégénérescence musculaire (DiMario et al., 1991).

### ***2.1. Culture primaire provenant de muscles squelettiques***

La culture primaire a pour but de récupérer et de mettre en culture les cellules satellites se trouvant en périphérie des fibres musculaires. Ce sont des cellules dormantes qui participent à

la croissance et à la régénération musculaire. L'utilisation de 3 à 5 souris est nécessaire à l'élaboration d'une culture primaire. Les muscles prélevés sont ceux des pattes postérieures de la souris.

#### 2.1.1. Dissection

La souris est euthanasiée par dislocation cervicale puis lavée au savon bactéricide et trempée dans l'alcool iodé. L'ensemble des muscles des pattes postérieures est prélevé et disposé dans une solution physiologique, le phosphate buffer saline (PBS) (NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM ; pH 7,3). Les muscles sont alors soigneusement lavés au PBS chaud, puis débarrassés de l'essentiel de leurs tendons, vaisseaux sanguins et amas graisseux afin de limiter la contamination de la culture par des cellules non musculaires.

#### 2.1.2. Dissociation mécanique

Les muscles sont coupés en petits morceaux facilitant ainsi l'action des enzymes. Ils sont ensuite centrifugés 3 min à 90 g pour permettre la décantation des éléments sanguins, conjonctifs, osseux et autres débris cellulaires. Ces impuretés se retrouvent dans le surnageant et les morceaux de muscles dans le culot. Le surnageant est éliminé et le cycle de centrifugation peut être renouvelé jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Celui-ci est alors éliminé et le culot est resuspendu dans 10 ml de HamF12 (Lonza).

#### 2.1.3. Dissociation enzymatique

Aux 10 ml de HamF12 contenant les muscles, 20 ml de solution de dissociation enzymatique (Annexe 2) sont ajoutés. Cette solution contient de la collagénase de type I (1,5 mg/ml) et de la protéase de type IX (2 mg/ml), qui permettent la digestion de la membrane basale de l'endomysium et la libération des cellules satellites. La solution enzymatique est filtrée à l'aide de filtres 0,2 µm afin de limiter les contaminations fongiques et/ou bactériennes. La dissociation enzymatique se fait sous agitation à 37°C pendant 45 min à 1 heure suivant l'avancée de la digestion enzymatique.

#### 2.1.4. Récupération des cellules

Lorsque la dissociation enzymatique est suffisante, la solution obtenue est centrifugée pendant 3 min à 90 g afin de culotter les débris. Le surnageant est récupéré et filtré sur un filtre (pores de 25 µm) stérile. Un volume de milieu de prolifération (Annexe 2) équivalent à

la suspension cellulaire est ajouté (environ 30 ml). La forte concentration en sérum permet de neutraliser l'action des enzymes. Cette nouvelle solution est centrifugée pendant 20 min à 350 g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 10 ml de milieu de prolifération.

#### 2.1.5. Elimination des fibroblastes : pré-ensemencement

Les cellules contenues dans les 10 ml de milieu sont filtrées, ensemencées dans une boîte de Pétri et placées pendant 45 min à 37°C. Cette étape a pour but d'éliminer les fibroblastes qui ont la propriété d'adhérer plus rapidement que les cellules satellites.

#### 2.1.6. Ensemencement et entretien de la culture primaire

Après le pré-ensemencement, le surnageant est récupéré et distribué dans des flacons de 25 cm à bouchon ventilé, qui sont ensuite placés à l'incubateur pour permettre la prolifération des cellules.

Lorsque les myoblastes atteignent un degré de confluence suffisant (60 à 80%), ils sont trypsinisés de la même façon que les lignées et réensemencés dans différents supports en vue des expérimentations. Ils sont réintroduits dans l'incubateur et lorsqu'ils sont suffisamment confluent la différenciation est induite en remplaçant le milieu de prolifération par le milieu de fusion (Annexe 2). Les myotubes sont généralement utilisés à 6 jours après la mise en fusion (D6) temps nécessaire à l'obtention d'un myotube assez mature exprimant correctement la dystrophine au sarcolemme (dans le cas de souris B110).

#### 2.1.7. Evolution de la culture primaire

Lors de l'ensemencement, les cellules sont en suspension et arrondies. Elles vont adhérer progressivement au fond de la boîte et s'y étaler. Les myoblastes sont alors difficilement différenciables des fibroblastes. Au cours de la culture les fibroblastes vont avoir tendance à s'étendre plus que les myoblastes, arborant un vaste cytoplasme, contrairement aux myoblastes plus fusiformes à cytoplasme réduit avec un noyau occupant une grande partie de la cellule. Les myoblastes vont proliférer jusqu'à confluence où ils vont s'aligner avant de fusionner pour entrer en différenciation et former des myotubes plurinucléés. La fusion va nécessiter plus de temps que pour les lignées et va donner lieu à des myotubes plus longilignes et formant un véritable tapis cellulaire au fond de la boîte. Lorsque les myotubes ont un degré de maturation avancé, ils vont former un véritable tissu et vont présenter une activité contractile, qui peut entraîner le décollement des myotubes du fond de la boîte. Cette

activité de contraction est une propriété des myotubes de cultures primaires et ne se retrouve pas chez les myotubes issus des lignées.

## ***2.2. Culture des fibres musculaires squelettiques***

Les fibres sont dissociées à partir du muscle Flexor digitorum brevis (FDB), situé sous la voûte plantaire des pattes postérieures de l'animal. Le FDB est utilisé car il contient des fibres de petite taille, qui seront moins fragiles lors de la dissociation mécanique limitant ainsi le risque de casse. Il suffit d'un seul animal pour une culture de fibres qui seront utilisées dans les 24h.

### 2.2.1. Dissection

Après euthanasie par dislocation cervicale, l'animal est lavé au savon bactéricide et trempé dans l'alcool iodé. Le FDB de chaque patte postérieure est disséqué en gardant le tendon sur lequel il est posé. Les muscles sont ensuite déposés dans du Krebs (Annexe 3) stérile chaud, milieu physiologique permettant de garder l'intégrité du muscle. Un nettoyage minutieux des muscles est effectué avant la dissociation enzymatique.

### 2.2.2. Dissociation enzymatique

Les muscles sont introduits dans le milieu de dissociation contenant 2 mg/ml de collagénase de type IV (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluée dans du Krebs stérile. La dissociation se fait sous bullage et agitation, pendant 20 à 30 min à 37°C. Elle sert uniquement à fragiliser la liaison entre les fibres le muscle et elle est stoppée lorsque les fibres commencent à sortir du muscle.

### 2.2.3. Dissociation mécanique

Après la dissociation enzymatique, les muscles sont aussitôt introduits dans du milieu de culture (Annexe 3) afin de stopper l'action des enzymes. On procède alors à la dissociation mécanique à l'aide de pipettes rodées de diamètres décroissants. L'avancement de la dissociation est contrôlé au microscope. Les fibres qui se détachent au fur et à mesure du muscle sont immédiatement ensemencées.

### 2.2.4. Ensemencement

Les fibres isolées sont ensemencées dans des boîtes de Pétri Ø 30 mm à lamelle de verre collée. Les lamelles sont préalablement recouvertes de matrigel (Becton-Dickinson) au ½

dilué dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Lonza). Les fibres sont incubées dans du milieu de culture au minimum pendant 2 heures à l'incubateur (30°C, 5% CO<sub>2</sub>, saturé en humidité) pour permettre leur adhésion au fond de la boîte. Elles sont conservées dans les mêmes conditions et sont utilisées dans les 24 heures suivant leur extraction.

## II. Etude de l'homéostasie calcique intracellulaire par microscopie confocale

### 1. Principe de la microscopie confocale à fluorescence

Depuis quelques années, la microscopie confocale est en plein essor et représente l'une des avancées les plus importantes en microscopie optique. Cette technologie permet la visualisation de l'intérieur d'objets microscopiques transparents ainsi que la reconstitution numérique de leur image en 3 dimensions. Elle permet de pallier l'inconvénient majeur de la microscopie conventionnelle de fluorescence, à savoir la perte de résolution due à l'émission de fluorescence provenant de plans non focaux se superposant à l'image du plan focal. Le principe de la microscopie confocale à balayage laser est d'effectuer des coupes optiques virtuelles dans l'échantillon observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence provenant du plan focal. Pour cela, la lumière blanche de la microscopie conventionnelle est remplacée par un laser qui va pénétrer dans l'échantillon préalablement marqué par des fluorochromes et balayer toute la zone de focalisation. Il y a alors émission de fluorescence provenant de différents plans de la préparation provenant de toute l'épaisseur de l'échantillon (système simple photon). Les rayons émis sont filtrés selon leur longueur d'onde et envoyé sur le système de détection : un ou des photomultiplicateur(s) (PMT). Pour sélectionner la fluorescence provenant seulement du plan focal et éliminer celle provenant des autres plans, les rayons passent par un diaphragme variable placé en position confocale devant chaque PMT. Le signal est ensuite numérisé et permet la reconstitution des images numériques qui pourront être analysées.

85

---

### 2. Systèmes de microscopie confocale du laboratoire

Le laboratoire est équipé de deux systèmes confocaux simple photon : le microscope confocal Bio-Rad MRC1024 et le microscope confocal Olympus FV1000. Ces deux systèmes ont été utilisés pour différentes acquisitions.

#### *2.1. Microscope confocal Bio-Rad MRC1024*

Ce système est équipé autour d'un microscope inversé Olympus IX70 pourvu de différents objectifs dont un objectif 60X à immersion à eau avec une ouverture numérique de

1,4 (Olympus PLAPO). Ce microscope est couplé à un équipement de microscopie de fluorescence conventionnelle permettant la vision binoculaire des échantillons fluorescents. Il est également couplé à un équipement de microscopie de fluorescence confocale (module MRC1024, Bio-Rad) équipé d'un laser Argon/Krypton ionisé (15 mW), pouvant générer 3 longueurs d'onde d'excitation : 488 nm, 568 nm et 647 nm. La fluorescence émise est recueillie par 3 photomultiplicateurs (PMT) indépendants permettant la détection simultanée ou séquentielle des fluorescences. Des filtres passe-bandes sont placés devant chaque PMT, sélectionnant ainsi les longueurs d'onde d'émission arrivant sur les capteurs. Un quatrième détecteur permet l'acquisition d'image en transmission. Tous les paramètres d'excitation, d'acquisition et de reconstitution des images sont gérés par informatique grâce au programme Lasersharpe 3.2 (Bio-Rad).

## **2.2. Microscope confocal Olympus FV1000**

Ce système est constitué d'un microscope inversé Olympus IX81 motorisé, équipé de plusieurs objectifs dont un 60X à immersion à eau avec une ouverture numérique de 1,4 (PLAPO). Cet appareillage est pourvu d'un équipement de microscopie de fluorescence conventionnelle pour la vision binoculaire des échantillons fluorescents. L'équipement de microscopie de fluorescence confocale couplé au dispositif est constitué d'un combiné de 3 lasers comprenant un total de 5 raies d'excitation : un laser Argon multi-raies (457 nm/ 476 nm/ 488 nm et 515 nm, 40 mW), un laser Hélium/Néon vert (543 nm, 1 mW) et un laser Hélium/Néon rouge (633 nm, 10 mW). Il est également doté d'un quatrième laser proche UV, une diode laser UV 405 nm, qui est synchronisé avec le combiné laser et placé sur un second scanner, permettant ainsi la stimulation de l'échantillon sans interrompre l'acquisition. Trois photomultiplicateurs assurent la détection et l'acquisition de la fluorescence et deux d'entre eux sont équipés d'un système de détection spectrale. Un quatrième capteur permet l'acquisition d'image en transmission. Le système est piloté par le logiciel FluoView (Olympus) qui gère les paramètres d'excitation, d'acquisition et l'analyse des images.

## **3. Caractéristiques de la sonde calcique Fluo-4**

Les premières sondes calciques fluorescentes ont été synthétisées dans les années 1980 et se composaient d'un chélateur de calcium (EGTA ou BAPTA) associé à un fluorophore. La liaison du calcium à cet indicateur entraînait une variation de l'intensité de fluorescence ou

des caractéristiques de son spectre. Ces sondes calciques de première génération furent à la base des sondes calciques actuelles, quelles soient ratiométriques ou non.

La sonde calcique utilisée ici est le Fluo-4-AM (Invitrogen). C'est une sonde mono excitation/mono émission qui permet d'enregistrer des cinétiques rapides de variation de calcium, mais qui ne permet pas une mesure de la concentration intracellulaire absolue du calcium. Elle est adaptée aux études de microscopie confocale et facilite également le couplage avec des techniques d'électrophysiologie. Cette sonde a été rendue perméante par l'ajout d'un groupement acétoxyméthylester (AM), qui masque les charges négatives des groupements carboxyles de la molécule (Figure MM-1). L'ester AM rend la molécule hydrophobe qui peut alors traverser la membrane de la cellule. Cependant, la sonde est insensible au calcium sous cette forme. Une fois dans le cytoplasme de la cellule, des estérases endogènes non spécifiques vont cliver le groupement AM du fluo-4, libérant ainsi la forme carboxylée active de la sonde. Cette conformation permet à la sonde de se lier au calcium. Lors d'une excitation à 488 nm, la sonde liée au calcium émet une fluorescence avec un spectre d'émission maximum à 512 nm, permettant les enregistrements de variation de fluorescence qui est le reflet de l'activité calcique intracellulaire (calcium libre).

#### **4. Mesure des libérations globales de calcium lors d'une dépolarisation membranaire**

##### ***4.1. Principe***

Afin d'enregistrer des libérations globales de calcium, les myotubes sont stimulés par une dépolarisation membranaire artificielle générée par une solution dépolarisante, E01 47 mM KCl (Annexe 4), avec une concentration de 47 mM de KCl (Powell et al., 2001; Balghi et al., 2006a). Cette forte concentration en KCl mime la dépolarisation induite par le motoneurone dans des conditions physiologiques. Un système de perfusion à gravité avec électrovannes permet les changements de milieu à proximité des myotubes sélectionnés pour l'acquisition des libérations calciques globales.

##### ***4.2. Appareillage***

Ces enregistrements sont réalisés sur le système Bio-Rad MRC1024 avec l'objectif 60X à immersion à eau. La sonde calcique Fluo-4 est excitée par le laser Argon/Krypton à une

longueur d'onde de 488 nM et la fluorescence émise est récoltée par un photomultiplicateur placé derrière un filtre passe-bande à 522 nm.

### **4.3. Protocole expérimental**

#### **4.3.1. Charge et traitements des cellules**

Le milieu de culture est retiré et les myotubes sont incubés avec la sonde calcique Fluo-4-AM à une concentration de 3  $\mu$ M dans une solution physiologique, le milieu E01 (Annexe 4), tamponné à l'Hepès. Le temps de charge des cellules est de 15 minutes, temps nécessaire à l'entrée de la sonde dans les cellules et à sa dé-estérification. Pour l'acquisition, le milieu de charge est remplacé par du E01 seul. Le traitement des cellules avec les différentes molécules se fait soit en même temps que la charge des cellules avec le Fluo-4 pour des temps courts, ou préalablement pour les traitements de long terme (Tableau T-2).

#### **4.3.2. Mode d'acquisition**

La réponse calcique par dépolarisation membranaire est une réponse relativement lente pouvant être enregistrer en X,Y avec une acquisition d'une image toutes les 300 ms, la taille de ces images étant de 256x256 pixels. Des régions d'intérêt sont placées sur le champ observé, à raison d'une région par myotube (Figure MM-2 A). Le logiciel Lasersharp 3.2 permet d'obtenir l'évolution de la fluorescence moyenne pour chacune des zones d'intérêt au cours du temps sous forme de courbes « Intensité de fluorescence en fonction du temps » (Figure MM-2 B).

### **4.4. Analyses**

L'analyse des courbes obtenues lors des acquisitions se fait à l'aide d'un programme développé à partir du logiciel IDL 5.3 (Boulder, CO, USA). Ce programme développé dans notre laboratoire permet l'analyse à grande échelle des données en extrayant automatiquement 4 paramètres de chacune des courbes. Ces paramètres étant l'amplitude maximale de fluorescence calculée en divisant la différence de fluorescence ( $F-F_0$ ) par  $F_0$  ( $\Delta F/F_0$ ); la vitesse de montée au pic (en U.A/s) calculée en divisant la valeur de la fluorescence à l'amplitude maximale par le temps pour atteindre cette amplitude; l'aire sous la courbe (ASC en U.A.s) et le temps de demi retour (s) représentant le temps nécessaire pour revenir à la moitié de l'intensité maximale de fluorescence (Figure MM-3). Les valeurs obtenues lors de plusieurs expérimentations sont moyennées et représentées sous formes d'histogrammes. Les

valeurs brutes sont normalisées en valeurs relatives par rapport aux valeurs obtenues pour les Sold(+) en conditions contrôles (100%), puis sont statistiquement analysées.

## **5. Mesure des évènements spontanés localisés de libération calcique**

### ***5.1. Principe***

Les évènements spontanés localisés de libération calcique, ou « sparks », sont visualisés à l'état de repos. Les myotubes sont chargés avec la sonde calcique Fluo-4-AM, ce qui nous permet de visualiser les variations dynamiques de calcium au sein de la cellule. Les sparks se caractérisent par une « étincelle » brève et très localisée.

### ***5.2. Appareillage***

Les acquisitions ont été effectuées sur le système Bio-Rad MRC1024 avec l'objectif 20X. La sonde calcique Fluo-4 est excitée par le laser Argon/Krypton à une longueur d'onde de 488 nm et la fluorescence émise est récoltée par un photomultiplicateur placé derrière un filtre passe-bande à 522 nm.

### ***5.3. Protocole expérimental***

#### **5.3.1. Charge et traitement des cellules**

Le milieu de culture est retiré et les myotubes sont incubés avec la sonde calcique Fluo-4-AM à une concentration de 3  $\mu\text{M}$  dans une solution physiologique, le milieu E01 (Annexe 4), tamponné à l'Hepès. Le temps de charge des cellules est de 15 minutes, temps nécessaire à l'entrée de la sonde dans les cellules et à sa dé-estérification. Pour l'acquisition, le milieu de charge est remplacé par du E01 seul. Le traitement des cellules avec les différentes molécules se fait soit en même temps que la charge des cellules avec le Fluo-4 pour des temps courts, ou préalablement pour les traitements de long terme (Tableau T-2).

#### **5.3.2. Mode d'acquisition**

L'acquisition se fait en X,Y et permet de quantifier le nombre d'évènement par  $\mu\text{m}^2$  de myotube. Pour cela, on fait une acquisition de 100 images par champ de myotubes à une vitesse d'une image toute les 300 ms. L'enregistrement se fait grâce à l'objectif 20X et avec une taille d'image de 256x256 pixels. La série d'image permet d'obtenir le profil de libération de chaque type cellulaire et de déterminer la densité de site par  $\mu\text{m}^2$  de myotube.

Les enregistrements obtenus ensuite analysés grâce à un programme développé sous le logiciel IDL.

#### **5.4. Analyses : détermination de la densité de sites**

La détermination de la densité de sites par  $\mu\text{m}^2$  de myotube se fait à partir des enregistrements obtenus en mode X,Y. Un programme développé sous le logiciel IDL (Sebille et al., 2005) permet de « compiler » la série de 100 images en X,Y de la même série et d'en faire une image moyenne (Figure MM-4). A partir de cette nouvelle image, le programme va calculer la déviation standard de chaque point et en créer une image. Les points dont la fluorescence reste stable au cours de l'enregistrement auront une déviation standard faible, alors que ceux dont la fluorescence varie beaucoup auront une déviation standard élevée. L'image de déviation standard est donc le reflet de la localisation des sites de libération et nous permet de déterminer le paramètre densité de sparks par  $\mu\text{m}^2$ . Ces valeurs obtenues sur plusieurs expérimentations sont moyennées et statistiquement analysées.

### **6. Mesure de la variation de calcium intracellulaire après décageage**

#### **6.1. Principe du décageage et caractéristique de la sonde NP-EGTA**

Afin de pouvoir étudier la régulation de l'homéostasie calcique dans un système mature sans en altérer la constitution, nous avons provoqué artificiellement des augmentations faibles de calcium, similaires à des sparks. Pour cela, nous avons utilisé la technique de « décageage » du calcium. Le principe de cette technique est de protéger une biomolécule, ici l'ion calcium, en la liant à un groupement photolabile qui va la rendre biologiquement inactive. L'illumination à une longueur d'onde adéquate du groupe photolabile obtenu va rompre la liaison et libérer la biomolécule qui va alors retrouver son activité biologique. Cette réaction de photodéprotection est appelée réaction de décageage. Les molécules ainsi protégées sont qualifiées de molécules cagées bien qu'elles ne soient pas physiquement encagées.

Le groupement moléculaire utilisée pour protéger le calcium est le *o*-nitrophenyl EGTA-AM (NP-EGTA-AM, Molecular Probes) qui est un dérivé de l'EGTA, ayant la capacité de chélater le calcium intracellulaire et pouvant être photolysée par la lumière (diode bleue proche UV) (Ellis-Davies and Kaplan, 1994). Ce groupement peut passer la membrane de la cellule grâce à son groupement AM (Figure MM-5). Une fois dans la cellule, il va être dé-estérifier et se lier au calcium intracellulaire libre. Ces ions calcium vont alors être protégés

et biologiquement inactifs. Lors d'un flash lumineux (UV, bleu), il va y avoir photolyse du NP-EGTA et libération du calcium qui était piégé dans ce groupement moléculaire. Cela va créer une augmentation localisée et transitoire de calcium libre, qui mime ainsi une augmentation physiologique de la concentration de cet ion sans nécessiter une activation des systèmes de stimulation physiologiques habituels comme la dépolarisation membranaire par exemple. Le calcium libéré par décaageage va pouvoir se lier à la sonde calcique Fluo-4 et être ainsi détecté par microscopie confocale à fluorescence (Figure MM-5).

## **6.2. Appareillage**

Cette technique est réalisée sur le système de microscopie confocale Olympus FV1000 possédant une diode laser proche UV placée sur un second scanner, permettant ainsi la stimulation UV en même temps que la détection de fluorescence. Ces enregistrements sont réalisés avec l'objectif 60X à immersion à eau. La sonde calcique Fluo-4 est excitée par le laser Argon/Krypton à une longueur d'onde de 488 nm et la fluorescence émise est récoltée par un photomultiplicateur placé derrière un filtre passe-bande à 522 nm.

## **6.3. Protocole expérimental**

### **6.3.1. Charge et traitements des cellules**

Le temps de charge et la concentration en NP-EGTA et en Fluo-4-AM varie selon le système étudié (myotubes ou fibres) (Tableau T-3). L'incubation se fait dans le milieu physiologique E01. Pour l'acquisition, le milieu de charge est remplacé par du E01 seul. Le traitement des cellules avec les différentes molécules se fait soit en même temps que la charge des cellules avec le Fluo-4 pour des temps courts, ou préalablement pour les traitements de long terme (Tableau T-2)

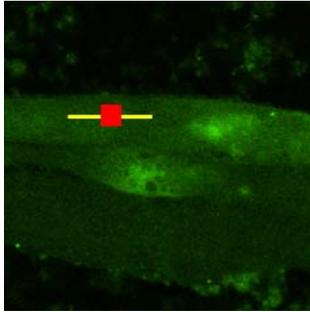
### **6.3.2. Protocoles d'acquisition et de stimulation Acquisition en X,T**

Le mode d'acquisition en X,T permet d'obtenir une résolution temporelle supérieure à l'acquisition en X,Y et nous donne ainsi accès à des infos plus précises sur la variation de fluorescence en fonction du temps. L'acquisition se fait sur une ligne en fonction du temps. Pour cela, la ligne d'acquisition est placée à proximité de la zone de stimulation du décaageage de calcium, puis on passe en mode X,T (Figure MM-6). Le mode X,T permet de recréer une image en 2 dimensions (X en fonction du temps, T) visualisant l'évolution de la fluorescence sur la ligne de scan en fonction du temps (Figure MM-6). Cette acquisition se fait sur une série de 500 lignes de scanne.

## Stimulation

Pour ces deux types d'acquisition (X,Y et X,T), différents protocoles ont été établis, utilisant différents types de stimulation et d'acquisition.

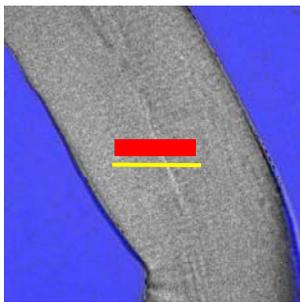
Protocole de stimulation dans les cultures primaires :



La zone de stimulation de décaage est délimitée par un carré (rouge). La ligne d'acquisition est placée sur la zone de stimulation et a une largeur supérieure à la zone de stimulation.

La stimulation se fait à une intensité de 60% de la diode UV.

Protocole de stimulation dans les fibres musculaires squelettiques



La zone de stimulation de décaage est délimitée par un rectangle (rouge). La ligne d'acquisition est placée en dehors de la zone de stimulation mais reste très proche de celle-ci. Elle est d'une largeur identique à la zone de stimulation.

La stimulation se fait à une intensité de 50% de la diode UV.

## **6.4. Analyses**

L'analyse des données de décaage se fait également avec un programme développé sous le logiciel IDL. De la même façon que pour les libérations globales de calcium, il nous permet de récupérer différents paramètres tels que : l'amplitude maximum de fluorescence ( $\Delta F/F_0$ ), l'aire sous la courbe (ASC en U.A.s) et la durée à mi-hauteur (en s) (Figure MM-7). Les valeurs obtenues lors de plusieurs expérimentations sont moyennées et représentées sous formes d'histogrammes. Les valeurs brutes sont normalisées en valeurs relatives par rapport aux valeurs obtenues pour les Sold(+) en conditions contrôles (100%), puis sont statistiquement analysées.

	Dépolarisation KCl	Densité de sparks	Décageage de calcium
<b>Lignées cellulaires</b>	✓	✓	
<b>Cultures primaires de souris mdx et B110</b>	✓	✓	✓
<b>Fibres musculaires squelettiques de souris mdx et B110</b>			✓

**Tableau T-4 : Récapitulatif des études de libération calcique en fonction des préparations biologiques**

### III. Biologie moléculaire et Biochimie

#### 1. La PCR inverse en temps réel (ou RT-PCR quantitative)

##### *1.1. Principe général*

La RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) comporte donc deux étapes distinctes qui sont la transcription inverse des ARN totaux (obtenus après extraction) en ADNc et l'amplification des ADNc du ou des gène(s) d'intérêt et de référence par PCR. La quantification de l'amplification se fait par détection d'un signal fluorescent qui est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé. La fluorescence est mesurée à chaque cycle de la PCR, permettant ainsi de suivre l'amplification en temps réel. La technique utilisée ici est basée sur l'utilisation de deux amorces (sens et anti-sens) spécifiques pour l'amplification d'ADNc ainsi que d'une sonde fluorescente. La PCR est une répétition de 35 cycles comportant 3 étapes de transition de température (Figure MM-8). La première étape étant la phase de dénaturation permettant d'obtenir des ADN linéaires simple brin. La deuxième étape du cycle est celle d'hybridation des amorces sens et anti-sens ainsi que de la sonde fluorescente. La sonde fluorescente comporte un fluorochrome en son extrémité 5' (ici le fluorochrome est le 6-FAM) et un « quencher » en son extrémité 3' (ici TAMRA). A ce stade du cycle de PCR, la sonde est intacte et la fluorescence du fluorochrome est atténuée par la proximité du « quencher ». La dernière étape du cycle est celle de l'élongation au cours de laquelle le brin complémentaire du brin matrice est synthétisé. Lors de cette phase, l'extrémité 5' de la sonde fluorescente va être dégradée libérant ainsi le fluorochrome de son « quencher », il y a donc émission de fluorescence. L'augmentation de fluorescence émise par la sonde est directement corrélée à la quantité de produits de PCR obtenus.

##### *1.2. Extraction des ARN totaux*

Le milieu de culture est enlevé et après rinçage au TBS un volume de RNable (Eurobio, France) est introduit et les cellules sont décollées et lysées par « grattage ». Le RNable contient du phénol qui contribue à la lyse des cellules et à la dégradation des protéines. Un volume de 100 µl de chloroforme pour 500 µl de RNable est ajouté à l'échantillon puis l'ensemble est vortexé et incubé sur glace pendant 5 min. Une centrifugation de 14 000 rpm à 4°C pendant 15 min permet de séparer deux phases. La phase supérieure aqueuse (incolore) contient les ARN totaux, la phase inférieure organique (bleue) contient les protéines et autres

débris cellulaires. A l'interface (blanchâtre) se trouvent les ADN. La phase supérieure aqueuse est récupérée et un volume équivalent d'isopropanol y est ajouté (précipitation des ARN). Après incubation de 15 min sur glace, le tout est centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 min à 4°C pour culoter les ARN. Ce culot est lavé à l'éthanol 75% et séché avant d'être dilué dans de l'eau désionisée stérile. L'extraction de l'ARN est vérifiée par électrophorèse des échantillons sur gel d'agarose.

### ***1.3. Transcription inverse : obtention d'ADNc simple brin***

La transcription inverse (ou reverse transcription) se fait à partir des ARN totaux précédemment extraits. La technique appliquée est basée sur utilisation d'hexamères nucléotidiques aléatoires qui vont se fixer aléatoirement à l'ARN afin d'amorcer la synthèse du brin d'ADNc. Après redissolution des ARN totaux (5 min à 65°C) 12 µl de prémix sont ajoutés à 10 µl de solution d'ARN. Le prémix est composé de 5µl de tampon 5X (Gibco, 250 nM Tris HCl pH 8,3 ; 375 mM KCl ; 15 mM MgCl<sub>2</sub>) ; 2,5 µl de DTT (Gibco, 100 mM) ; 1 µl de dNTP (25 mM) ; 2,4 µg d'hexamères nucléotidiques et eau désionisée qsp 12 µl. Les ARN totaux et le prémix sont pré-incubés 2 min à 65°C. Une fois les tubes refroidis, 2 µl de RNAsine à 40 U/µl (inhibiteur de RNase) et 4 µl de M-MLV à 200 U/µl (transcriptase inverse) sont ajoutés. La synthèse des ADNc se fait pendant 1 heure à 37°C. A la fin de la réaction, un ajout de 125 µl d'eau désionisée et une incubation de 2 min à 100°C permet de détruire l'enzyme et de casser les hybrides ARN/ADNc afin de stopper la réaction. Les ADNc peuvent être conservés à -20°C.

### ***1.4. La PCR quantitative en temps réel***

La réaction d'amplification se fait dans une plaque 96 puits, permettant de faire une PCR sur plusieurs échantillons en même temps. La quantification de produit amplifié à chaque cycle se fait par détection de fluorescence grâce à l'appareil ABI Prism 7700 Sequence Detecor System (Applied Biosystems). Le volume final de mélange réactionnel est de 15 µl par puits contenant 10 µl de Mix et 5 µl d'ADNc. Le Mix est préparé pour chaque ADNc à amplifier car il contient les amorces spécifiques : 7,5 µl de Master Mix à une concentration finale 1X (Applied Biosystems) ; 200 nM de sonde FAM fluorescente ; 900 nM d'amorce sens ; 900 nM d'amorce anti-sens et eau désionisée (qsp 10 µl). Le Master Mix contient la Taq polymérase (enzyme de la réaction), les dNTPs ainsi que les sels. Ce Mix est réparti dans les puits de la plaque et 5 µl/puits d'échantillon d'ADNc sont ajoutés.

**Gène d'intérêt : IP3R1**

Amorce sens : 5'-TGG-CAG-AGA-TGA-TCA-GGG-AAA-3'

Amorce anti-sens : 5'-GCT-CGT-TCT-GTT-CCC-CTT-CAG-3'

Sonde : (6-FAM) 5'-CCA-TGT-CCC-TGG-TCA-GCA-GCG-A-3' (TAMRA)

**Gène de référence : S6 ribosomale**

Amorce sens : 5'-TTT-GAT-TCT-GAA-AGC-CAT-GCG-3'

Amorce reverse : 5'-CGG-TCC-ATC-AGG-ATT-CTA-TTG-3'

Sonde (6-FAM) : 5'-CGG-CCA-GAG-ACC-GCT-GCT-GCT-3' (TAMRA)

**1.5. Analyse des résultats**

**1.5.1. Efficacité de PCR**

L'efficacité (E) de la PCR est calculée grâce à une gamme d'étalonnage. Les échantillons de cette gamme sont de concentration initiale en ADNc croissante et connue. Le Ct (cycle threshold) est déterminé pour chacun des échantillons de la gamme et correspond au nombre de cycle d'amplification nécessaire pour que la fluorescence émise soit significative par rapport au bruit de fond. La valeur de Ct pour chacun des échantillons de la gamme est ensuite reportée sur un graphique semi-logarithmique avec en abscisse la concentration initiale en ADNc des échantillons. La droite passant par chaque point est alors une régression linéaire modélisée par une équation de type  $y=ax+b$ , où la pente (a) est fonction de l'efficacité de PCR (calculées par le logiciel de l'appareil de PCR). Une PCR est acceptable si l'efficacité est d'au moins 95%, c'est donc un élément fondamental à prendre en compte pour obtenir une mesure quantitative de l'amplification des fragments d'ADNc.

**1.5.2. Normalisation des valeurs obtenues**

Afin de s'affranchir de la variabilité de la quantité d'ADNc d'un échantillon à l'autre, les valeurs d'ADNc sont exprimées en valeurs relatives. La normalisation du gène d'intérêt se fait par rapport à un gène endogène de référence dont l'expression reste constante. Le gène de référence utilisée ici est celui de la protéine S6 ribosomale. La normalisation se fait en calculant la différence des Ct telle que  $\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}$ . Ce calcul est effectué pour chacune des conditions et des gènes d'intérêt de la PCR.

### 1.5.3. Expression des résultats en valeur relative

Afin de comparer l'expression du gène d'intérêt dans différentes conditions, la valeur relative de 1 (ou 100%) sera attribuée à la condition contrôle et les valeurs relatives des autres conditions seront calculées en référence à celle-ci. L'expression relative du gène d'intérêt dans un échantillon se calcule suivant la formule  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , où  $\Delta\Delta Ct$  est la différence des  $\Delta Ct$  du gène d'intérêt obtenue entre l'échantillon et la condition contrôle ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  échantillon –  $\Delta Ct$  condition contrôle). Une analyse statistique peut ensuite être effectuée sur ces valeurs relatives calculées dans chaque condition.

## **2. Western-blot**

### *2.1. Généralités*

La technique de western-blot permet de révéler l'expression d'une protéine à partir d'un lysat cellulaire. Elle permet également de comparer l'expression d'une même protéine dans différents échantillons (et/ou différentes conditions). Elle peut aussi être utilisée pour mettre en évidence le changement de localisation d'une protéine au sein de la cellule, sur des échantillons ayant préalablement subi un fractionnement cellulaire (séparation des différentes fractions cellulaires).

### *2.2. Extraction protéique*

Les myotubes différenciés sont rincés dans du TBS (Annexe 5). Ils sont ensuite lysés dans du tampon de lyse (RIPA, Annexe 5) auquel est rajouté un cocktail inhibiteur de protéases (CIP, Sigma) ainsi que du  $Na_3VO_4$  et du NaF inhibant les phosphatases. Ceci est réalisé à 4°C et permet de minimiser la dégradation des protéines et de les conserver dans leur état de phosphorylation. Les extraits protéiques sont homogénéisés par passages dans une seringue à insuline et ils sont centrifugés à 20 000 g pendant 5 min à 4°C afin de se débarrasser des débris cellulaires. Ils peuvent être conservés à -80°C. La concentration protéique de chaque échantillon est dosée par la méthode colorimétrique de Lowry (Lowry et al., 1951) à l'aide du kit Biorad DC protein assay avant leur utilisation.

### *2.3. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide*

La séparation des protéines se fait sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate) en conditions dénaturantes, selon leur poids moléculaire. Les protéines sont dénaturées dans du tampon de charge (Annexe 5) pendant 10 min à 90°C. La même quantité de protéines (20 ou 60 µg) est déposée pour chacun des échantillons sur le gel

(gradient de polyacrylamide 4/12%) et la séparation des protéines se fait grâce à un champ électrique de 110V pendant 2 heures dans le tampon de migration (Annexe 5) (système XCell SureLock Novex mini-cell, Invitrogen). Le marqueur de poids moléculaire coloré permet de suivre la migration des protéines dans le gel (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen).

#### ***2.4. Electro-transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose***

Une fois la migration des protéines dans le gel d'acrylamide terminée, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le montage (Figure MM-9) est placé dans le dispositif Miniprotean III (BioRad) permettant le transfert des protéines à 35V pendant 2 heures à 4°C dans du tampon de transfert (Annexe 5).

#### ***2.5. Révélation des protéines d'intérêt***

Le transfert des protéines est vérifié par coloration réversible de la membrane au rouge ponceau, qui sera ensuite rincée (TBS Tween-20 0,2% v/v) (composition du TBS Annexe 5) avant d'être saturée. La saturation des sites non spécifiques se fait pendant une heure à température ambiante dans du TBS Tween-20 (0,2% v/v) contenant 2% (w/v) de BSA (bovin serum albumin) et 5% (w/v) de lait écrémé. L'incubation avec l'anticorps primaire se fait toute la nuit à 4°C dilué dans du TBS Tween-20 2% BSA. La membrane est rincée dans du TBS Tween-20 2% BSA pour éliminer l'excès d'anticorps primaire avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome reconnaissant l'anticorps primaire. L'incubation avec l'anticorps secondaire se fait pendant une heure à température ambiante. La membrane est à nouveau rincée avant révélation des protéines par immunofluorescence grâce à un scanner, le Typhoon 9400/9410 (GE Healthcare). La visualisation de la membrane se fait grâce au logiciel ImageQuant 5.2 (GE Healthcare). La bonne charge des protéines est vérifiée par une protéine de référence, l' $\alpha$ -tubuline. Cette protéine de référence permettra également la normalisation des valeurs lors de la quantification des bandes.

## **IV. Immunomarquage**

### **1. Généralités**

La technique utilisée est celle de l'immunomarquage indirect. L'anticorps primaire va reconnaître un l'antigène contre lequel il est dirigé et s'y fixer. Plusieurs anticorps peuvent se fixer sur l'antigène, ce qui amplifie le signal. Cet anticorps primaire est lui-même reconnu par un anticorps secondaire qui lui est couplé à un fluorochrome. L'utilisation de l'anticorps secondaire permet d'amplifier une nouvelle fois le signal. Cette technique permet donc la détection et la localisation de protéines d'intérêt au sein d'une cellule (immunocytochimie).

### **2. Immunocytochimie : immunomarquage des cellules**

#### ***2.1. Fixation, perméabilisation et saturation des sites non spécifiques***

Les myotubes différenciés sont rincés au TBS (Annexe 6) avant d'être fixés au paraformaldéhyde 4% (PFA) (Annexe 6) pendant 20 min à température ambiante. Après rinçage, les cellules sont perméabilisées au Triton X100 dilué à 0,5% dans du TBS, pendant 5 min à température ambiante. L'étape de saturation des sites non spécifiques se fait avec du TBS 1% BSA (w/v) à température ambiante pendant 10 min.

Une autre technique utilisant le méthanol (conservé à -20°C) permet la fixation et la perméabilisation des cellules en une seule étape avec une incubation de 6 minutes à température ambiante. Les étapes suivantes sont les même que lors de l'utilisation du PFA/Triton.

#### ***2.2. Révélation des protéines d'intérêt***

La révélation des protéines d'intérêt se fait par incubation successif des cellules dans l'anticorps primaire puis l'anticorps secondaire. L'incubation avec l'anticorps primaire se fait pendant une nuit à 4°C en chambre humide, afin d'éviter l'évaporation. Les cellules sont rincées pour éliminer l'excès d'anticorps. L'incubation avec l'anticorps secondaire se fait également en chambre humide à l'obscurité (le fluorochrome couplé à l'anticorps est photosensible), pendant 30 minutes à température ambiante. Pour l'observation, les lamelles sont montées sur lame avec du milieu de montage Vectashield (Abcys).

## V. Test de viabilité cellulaire (test MTT)

### **1. Principe général**

C'est un test colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité cellulaire par mesure de la réduction du MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5(diphenyltetrazolium bromide) en formazan. Cette réaction est faite par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes métaboliquement actives. Le produit absorbe fortement vers 570 nm. Il est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques. Sous condition contrôlée, l'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes qui vont métaboliser le MTT en cristaux de formazan violets donnant l'intensité de la coloration.

### **2. Ensemencement et traitement des cellules**

L'ensemencement des cellules se fait dans une plaque 96 puits, à raison de 200 µl de suspension cellulaire par puits. Une fois arrivées à 70 – 80% de confluence, la fusion des myoblastes est induite en remplaçant le milieu de prolifération par du milieu de fusion.

Pour le test de viabilité cellulaire au cours du temps, les cellules ne subissent pas de traitement mais le test de viabilité s'effectue tous les jours de D4 (4 jours après l'induction de la fusion), à D7. Afin d'observer l'effet des agents pharmacologiques sur la viabilité cellulaire, les cellules sont traitées avec la molécule à tester le lendemain de la mise en fusion (D1), à différentes concentrations. Les cellules contrôles sont elles incubées avec le solvant de l'agent pharmacologique testé. L'incubation se poursuit jusqu'à D5 où a lieu le test de survie cellulaire à proprement parlé.

### **3. Test MTT**

Une fois le milieu de culture retiré des puits, ceux-ci sont rincés avec une solution physiologique incolore (ne comprenant pas de rouge de phénol). Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de MTT à 0,5 mg/ml dilué dans une solution physiologique incolore (par exemple du PBS), à raison de 100 µl par puits. Les cellules sont placées à l'incubateur (37°C) pendant 4 heures. Après l'incubation, le surnageant de solution MTT est délicatement retiré, laissant les cristaux de formazan (violets) au fond des puits. Les cristaux sont ensuite dissous dans du DMSO (100 µl par puits). La densité optique de chaque puits est lue sur le lecteur de microplaque à deux longueur d'onde : 570 nm (signal) et à 630 nm (bruit de fond).

## **VI. ARN interférence**

### **1. Principe général**

L'ARN interférence est une technique permettant l'extinction spécifique de l'expression de gènes cibles. Le principe repose sur la dégradation de l'ARNm du gène cible par hybridation de façon séquence-spécifique d'ARN double-brin (Bosher and Labouesse, 2000; Nishikura, 2001). Les ARN double-brin sont des duplex synthétisés spécifiquement pour éteindre l'ARNm du gène cible. La technique mise en place ici est celle des siRNA («small interfering RNA») qui sont des fragments d'ARN de petite taille correspondant t spécifiquement à la séquence de l'ARNm du gène cible. Une fois transfectés à l'intérieur des cellules, les siRNA vont êtres reconnus par le complexe protéique RISC (Figure MM-10). Le complexe siRNA/RISC nouvellement formé va s'hybrider spécifiquement à l'ARNm contre lequel il a été synthétisé et l'envoyer vers la voie de dégradation. Ceci va éteindre spécifiquement l'ARNm du gène cible.

Nous avons envoyé la séquence codante du récepteur à l'IP3 de type 1 à la société Eurogentec qui a ensuite synthétisé 3 duplex (ARN double brin) de siRNA dirigés contre l'ARNm de l'IP3R-1. Ces 3 duplex sont nommés 1A, 1B et 1C, le duplex utilisé étant le 1A car le plus efficace en termes d'extinction de l'ARNm et de la protéine de l'IP3R-1.

#### **Séquences du duplex 1A :**

Sens: 5'UCAGCACCUUAGGCUUGGUdTdT 3'

Anti-sens:3'AGUCGUGGAAUCCGAACCAdTdT 5'.

### **2. Technique de transfection des ARN interférence**

La transfection des siRNA à l'intérieur des cellules a été effectuées par l'utilisation du Kit V de nucleofaction pour lignée cellulaire d'Amara (Amara Cell Line Nucleofactor Kit V, Amara Inc., USA). Ce système de nucléofaction est basé sur le principe de l'électroporation mais avec pour cible le noyau de la cellule à transfecter. Les myoblastes sont trypsinisés lorsque le nombre nécessaire de cellules est atteint (1 million de cellule par réaction). Pour une réaction de transfection, le volume de suspension cellulaire suffisant pour 1 million de cellules est prélevé et centrifugé à 90 g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 100 µl de solution V du Kit V Amara. Cette suspension cellulaire

est mise en présence de 3  $\mu\text{g}$  de siRNA. Le tout est transféré dans une cuvette de transfection qui est ensuite mise en place dans l'appareil. Le programme utilisé pour la transfection de nos cellules est le B-32. Une fois la nucléofection effectuée, 500  $\mu\text{l}$  de milieu de culture sont ajoutés à la suspension cellulaire contenue dans la cuvette de transfection, avant d'êtreensemencé dans les boîtes de culture. Les cellules sontensemencées de façon à pouvoir être mises en fusion le lendemain de la transfection. La transfection se fait avec le duplex 1A du siRNA dirigé spécifiquement contre l'isoforme 1 des IP3Rs et en parallèle avec un siRNA contrôle n'ayant aucune cible particulière. Les myoblastes sont induits en fusion le lendemain de la transfection (D0) et les différentes expérimentations ont lieu à D3 (trois jours après la mise en fusion) car les siRNA ne sont plus efficaces au-delà de ce laps de temps.

La validation de l'efficacité de l'extinction de l'expression du gène d'intérêt est effectuée par RT-PCR quantitative et par western-blot.

## **VII. Tests statistiques**

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne de  $n$  expérimentations  $\pm$  erreur standard de la moyenne (S.E.M, standard error of the mean).

Les analyses statistiques sont réalisées par un test Anova à double entrée, suivi d'un test post-hoc de Tukey lorsque l'Anova est significatif. Le test Anova à double entrée est utilisé lorsqu'il y a deux variables à prendre en considération (type cellulaire et traitement ou type cellulaire et variable temporelle). L'autre test statistique utilisé est le test de Student ( $t$ ) non apparié lorsqu'il y a seulement deux échantillons à comparer. Pour ces deux tests statistiques, les valeurs sont considérées comme significatives pour une valeur de  $P < 0,05$ .

Les analyses statistiques sont effectuées sous la version 5.0 du logiciel GraphPad Prism pour le système d'exploitation Windows (GraphPad Software).

## I. Les libérations calciques globales

Les libérations calciques globales définissent des libérations de calcium provenant du RS sur l'ensemble du myotube après dépolarisation membranaire par perfusion dans l'environnement de la cellule (périfusion) d'une solution dépolarisante. Il s'agit, par ce type d'expérimentation, de mimer, en son absence, le résultat de l'action des potentiels d'action (PA) généré par le motoneurone.

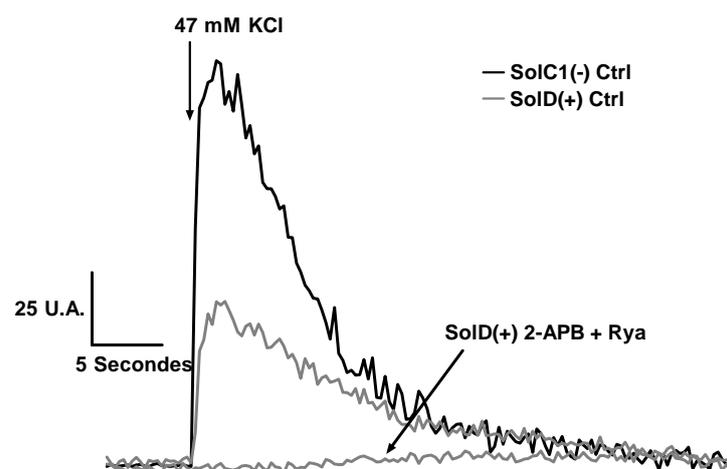
L'enregistrement des libérations globales a été réalisé par microscopie confocale à l'aide de la sonde calcique fluorescente Fluo4-AM avec laquelle les cellules sont chargées. La variation de fluorescence reflète la variation de calcium intracellulaire engendrée par la dépolarisation membranaire, suite à la périfusion de la solution hyperpotassique (47 mM KCl). Afin d'enregistrer la variation de fluorescence, des régions d'intérêt (regions of interest, ROIs) sont positionnées sur les myotubes et la moyenne de la variation de fluorescence par ROI est calculée, permettant l'acquisition de plusieurs régions sur plusieurs myotubes en fonction du temps. Ces courbes de variation de fluorescence en fonction du temps sont ensuite extraites et analysées grâce à une application développée sous IDL (IDL, « Image data language »), permettant d'extraire différents paramètres cinétiques des libérations calciques globales (Voir Matériels et Méthodes). La dérivée maximale de la phase de montée (vitesse de montée) de la variation de fluorescence est un paramètre cinétique reflétant la vitesse de la libération de calcium. Le temps de demi-retour est un paramètre cinétique permet d'estimer la durée du phénomène. Quant à l'aire sous la courbe, elle donne une idée de l'importance des effets provoqués puisqu'elle prend en compte à la fois l'amplitude du phénomène et sa durée, permettant de considérer l'importance de l'exposition des composants intracellulaires à des taux élevés de calcium. Ces paramètres permettent la comparaison des libérations calciques entre les cellules déficientes en dystrophine et les cellules contrôles, en présence ou en absence de divers agents. Les paramètres sont analysés statistiquement en utilisant le test Anova à double entrée, suivi du test post-hoc de Tukey (voir Matériel et méthodes).

## 1. Etude des libérations calciques globales dans les lignées cellulaires myogéniques

Afin d'explorer l'implication des IP3Rs dans les libérations calciques globales, cette étude a tout d'abord été réalisée dans les myotubes d'une lignée cellulaire déficiente en dystrophine (SolC1(-)) ou exprimant la mini-dystrophine (SolD(+)) en présence d'inhibiteurs de la voie IP3. Le test Anova à double entrée nous montre une différence statistiquement significative pour l'interaction des deux variables (type cellulaire et traitement) pour chacun des trois paramètres ( $P < 0.001$  pour l'aire sous la courbe et la vitesse de montée ;  $P = 0.037$  pour le temps de demi-retour), nous permettant de faire suivre cette analyse statistique par le test post-hoc de Tukey et de comparer chaque condition une à une (Figure R-1).

### *1.1. Comparaison des deux types cellulaires dans les conditions contrôles*

En condition contrôle, nous observons (Figure R-1) une libération calcique plus importante dans les myotubes déficients en dystrophine, comparativement aux myotubes exprimant la mini-dystrophine (exemples de tracé : Figure R-2). L'analyse statistique des différents paramètres (Tableau T-4) confirme ces résultats, avec une quantité de calcium mobilisée significativement augmentée dans les myotubes SolC1(-) par rapport aux SolD(+) (aire sous la courbe, 159% d'augmentation), ainsi qu'une libération plus rapide (vitesse de montée augmentée de 52%).



**Figure R-2** : Exemples de tracés représentatifs de libérations calciques dans les myotubes SolC1(-) et SolD(+) après dépolérisation membranaire par une solution 47 mM KCl, dans les conditions contrôles et en présence de 2-APB + ryanodine (Rya) pour les SolD(+).

### 1.2. Effet de différents inhibiteurs des IP3Rs

L'utilisation du 2-APB, inhibiteur direct des IP3Rs, en pré-incubation de 50  $\mu\text{M}$  pendant 30 minutes diminue fortement les trois paramètres étudiés lors de la libération calcique globale dans les deux types cellulaires (Figure R-1). Cependant, le 2-APB provoque une diminution plus forte de l'aire sous la courbe dans les SolC1(-) par rapport aux SolD(+) (respectivement, 81% et 53% de diminution) ainsi que du temps de demi-retour (61% et 39% de diminution respectivement) (Figure R-1 A et B).

La cyclosporine A (CsA) est une molécule immunosuppressive connue pour inhiber directement les IP3Rs et la calcineurine. Ses effets à court terme (30 minutes) et à long terme (16 heures) ont également pu être explorés (Figure R-1). Il en résulte une diminution des paramètres de libération calcique principalement pour les myotubes déficients en dystrophine. L'analyse des différents paramètres montre un effet inhibiteur plus prononcé de la CsA lors de l'incubation à long terme (16 heures) par rapport à l'incubation à court terme (30 minutes). En effet, dans les myotubes SolC1(-), l'aire sous la courbe est diminuée de 30% lors de l'incubation à court terme (100  $\mu\text{M}$ ) et de 34% lors de l'incubation à long terme (300 nM). Il en est de même pour la vitesse de montée, 38% de diminution avec une exposition de 30 minutes à 100  $\mu\text{M}$  et une diminution de 42% en présence de 300 nM de CsA pendant 16 heures dans les cellules déficientes en dystrophine. Pour les myotubes exprimant la mini-dystrophine (SolD(+)), ces mêmes paramètres ne varient pas quels que soient la concentration et le temps d'incubation. Ces résultats mettent en évidence un effet moins important de la CsA sur les libérations calciques globales comparativement au 2-APB. De plus, la CsA semble avoir un effet majoritairement à long terme et à faible concentration, et principalement sur les cellules déficientes en dystrophine.

Le tableau T-5 résume les valeurs obtenues pour les différents paramètres cinétiques lors de l'incubation des myotubes avec le 2-APB à court terme, la CsA à long terme (16 heures) ainsi que lors d'incubations avec d'autres agents inhibiteurs des canaux calciques du RS.

La xestospongine C (XeC) connue pour inhiber les IP3Rs a également été utilisée à la concentration de 5  $\mu\text{M}$  à court terme (20 minutes). Les résultats reportés dans le tableau T-5 révèlent, en présence de XeC, une diminution de l'aire sous la courbe et de la vitesse de montée dans les deux types cellulaires (test Anova à double entrée significatif pour ces deux paramètres à  $P < 0.001$ ). Cependant, cette inhibition est plus marquée dans les cellules déficientes en dystrophine comparativement aux cellules exprimant la mini-dystrophine. La XeC diminue de 59% l'aire sous la courbe dans les myotubes SolC1(-) et de 44% dans les

myotubes Sold(+). De même, la vitesse de montée est abaissée de 59% dans les SolC1(-) et de 56% dans les Sold(+). En revanche, l'utilisation de la XeC provoque un allongement du temps de retour de la fluorescence à l'état basal et ce pour les deux types cellulaires.

L'utilisation de la ryanodine (inhibiteur des récepteurs à la ryanodine), permet de supprimer la composante de libération calcique dépendante de ces récepteurs. L'incubation des myotubes SolC1(-) et Sold(+) avec 100  $\mu$ M de ryanodine pendant 10 minutes provoque une très forte diminution de l'aire sous la courbe dans les deux types cellulaires (98% pour les SolC1(-) et 95% pour les Sold(+)), ainsi que de la vitesse de montée (93% pour les SolC1(-) et 88% pour les Sold(+)). Il est à noter que l'utilisation de la ryanodine n'engendre pas de différence de diminution de la quantité de calcium mobilisé (aire sous la courbe) entre les deux types cellulaires, contrairement à ce qui est observé avec les autres molécules testées. Le temps de demi-retour de la fluorescence est nettement augmenté pour les deux types cellulaires (61% dans les myotubes SolC1(-) et 79% dans les myotubes Sold(+)).

De plus, l'incubation simultanée des myotubes avec la ryanodine (100  $\mu$ M) et le 2-APB (50  $\mu$ M) révèle un signal calcique quasi absent dans les deux types cellulaires (exemple de tracé pour les Sold(+), Figure R-2), représenté par une très large diminution de l'aire sous la courbe et de la vitesse de montée ainsi qu'un allongement important du temps de demi-retour (Tableau T-5).

### ***1.3. Effet d'inhibiteurs de la voie calcineurine/NFAT***

Nous avons montré que l'utilisation de la CsA à long terme induit une diminution significative des paramètres de la libération calcique globale dans les myotubes déficients en dystrophine (Tableau T-5). Supposant que ces effets à long terme de la CsA peuvent être dus à son action inhibitrice sur la calcineurine (voir introduction partie calcineurine), nous nous sommes intéressés à la calcineurine et à l'un des facteurs de transcription régulé par la calcineurine et potentiellement impliqué dans la transcription des IP3Rs : le NFAT (voir introduction partie NFAT). Nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la calcineurine, la cypermethrine (Enan and Matsumura, 1992) (Figure R-3). La cypermethrine utilisée à long terme (16 heures) à 170 nM diminue de façon significative l'aire sous la courbe et la vitesse de montée dans les cellules déficientes en dystrophine (45% et 40% respectivement). L'exposition à la cypermethrine des myotubes exprimant la mini-dystrophine n'engendre pas de variation significative des différents paramètres de la libération calcique.

La mise en évidence de l'implication du NFAT dans la régulation à long terme des libérations calciques après dépolarisation est rendue possible par l'utilisation de son inhibiteur spécifique : le VIVIT (Aramburu et al., 1999; Noguchi et al., 2004) (Figure R-3). L'incubation à long terme (16 heures) des myotubes déficients en dystrophine en présence de 1  $\mu$ M de VIVIT provoque une réduction de la quantité de calcium mobilisée (38% de diminution de l'aire sous la courbe) ainsi que de la vitesse de montée (réduction de 37%). En revanche, de même que pour la cyperméthrine, l'utilisation de cette molécule n'engendre pas la variation significative de ces paramètres dans les cellules exprimant la mini-dystrophine.

#### ***1.4. Effet de l'extinction de l'IP3R-1 par siRNA sur les libérations calciques globales***

Il a été démontré que les isoformes de type 1, 2 et 3 des IP3Rs sont présentes dans les lignées exprimant ou non la mini-dystrophine. Cependant, l'isoforme de type 1 est majoritairement exprimée dans la lignée déficiente en dystrophine et de manière plus abondante que dans la lignée exprimant la mini-dystrophine (Balghi et al., 2006a). Afin de confirmer l'implication de l'IP3R de type 1 dans les libérations calciques globales, nous avons diminué son expression en utilisant des siRNA spécifiques de ce gène. L'extinction de l'IP3R-1 par les siRNA est validée au niveau de l'ARNm par RT-PCR quantitative (Figure R-4 A) et au niveau de l'expression protéique par western-blot (Figure R-4 B et C). L'analyse de l'expression du transcrite de l'IP3R-1 montre une expression plus importante de 190% dans les myotubes SolC1(-) par rapport aux myotubes Sold(+), dans les conditions contrôles (Figure R-4 A). Les siRNA dirigés spécifiquement contre l'IP3R-1 provoquent une extinction de 62% de l'ARNm de ce canal dans les myotubes déficients en dystrophine et de 47% dans les myotubes exprimant la mini-dystrophine. Il est également constaté une différence significative de l'expression protéique de l'IP3R-1 entre les deux types cellulaires. Effectivement, ce canal est plus exprimé dans les myotubes déficients en dystrophine comparativement aux myotubes exprimant la mini-dystrophine (55% de différence d'expression). L'analyse densitométrique révèle une diminution de l'expression de la protéine de l'IP3R-1 de 62% dans les myotubes SolC1(-) et de 55% dans les myotubes Sold(+) lors de l'utilisation des siRNA spécifiques de ce canal.

L'extinction de l'expression de l'IP3R-1 conduit à une diminution de la libération calcique dans les deux types cellulaires. En effet, l'aire sous la courbe est réduite de 58% dans les myotubes SolC1(-) et de 43% dans les myotubes Sold(+) (Tableau T-6). Les paramètres de

vitesse de montée et de temps de demi-retour sont également diminués dans les deux types cellulaires en présence des siRNA dirigés contre l'IP3R-1. Cependant, il est intéressant de noter une diminution plus importante de l'aire sous la courbe et de la vitesse de montée dans les lignées déficientes en dystrophine comparativement aux lignées exprimant la mini-dystrophine (vitesse de montée réduite de 75% dans les SolC1(-) et de 64% dans les Sold(+)). De plus, nous observons que l'utilisation des siRNA spécifiques de l'IP3R-1 dans les myotubes déficients en dystrophine réduit la quantité de calcium mobilisé dans le temps jusqu'à une valeur proche de celle présente dans les cellules exprimant la mini-dystrophine.

L'utilisation de ces différents agents pharmacologiques met en évidence l'implication des deux types de canaux calciques du RS (RyRs et IP3Rs) dans les libérations calciques globales induites par une solution dépolarisante, dans les myotubes de lignée cellulaire déficiente en dystrophine ou exprimant la mini-dystrophine. Ces résultats montrent également une suractivation de la libération calcique dépendante des IP3Rs dans les lignées déficientes en dystrophine et l'implication de l'isoforme 1 des IP3Rs dans ces libérations calciques.

## **2. Etude des libérations calciques globales dans les cultures primaires de muscles provenant de souris *mdx* ou B110**

L'exploration des libérations calciques provenant du réticulum sarcoplasmique après dépolarisation membranaire par une solution KCl (47 mM) a été conduite de façon identique dans les myotubes provenant de culture primaire de souris *mdx* et B110. Les paramètres cinétiques analysés sont comme précédemment : l'aire sous la courbe, le temps de demi-retour et la vitesse de montée.

Dans les conditions contrôles, les exemples de tracés (Figure R-5) montrent une libération calcique plus importante dans les myotubes déficients en dystrophine provenant de souris *mdx*, comparativement aux myotubes contrôles. L'utilisation du 2-APB et de la ryanodine diminue ces réponses calciques dans les deux types cellulaires, mettant en évidence, comme dans les lignées cellulaires, deux composantes de libération calcique. L'analyse statistique par le test Anova à double entrée révèle des différences significatives pour l'aire sous la courbe et la vitesse de montée (Figure R-6). Pour le temps de demi-retour, l'analyse statistique n'est pas significative pour l'interaction entre les variables type cellulaire et traitement mais elle révèle un effet significatif du traitement sur chacun des types cellulaires.

Dans les conditions contrôles, l'aire sous la courbe et la vitesse de montée sont plus importantes dans les myotubes provenant de souris *mdx* par rapport aux myotubes provenant de souris B110, respectivement 60% et 64% (Figure R-6). L'incubation de ces cellules avec 50  $\mu\text{M}$  de 2-APB pendant 30 minutes diminue de manière significative la quantité de calcium mobilisée dans les deux types cellulaires : 79% de diminution dans myotubes *mdx* et 64% dans les myotubes B110. La vitesse de montée est elle aussi réduite de moitié dans les cellules déficientes en dystrophine. Néanmoins, le temps de demi-retour reste inchangé dans les deux types cellulaires en présence de 2-APB. L'incubation avec la ryanodine (100  $\mu\text{M}$  pendant 10 minutes) provoque une diminution de l'aire sous la courbe de 76% dans les myotubes *mdx* et de 37% dans les myotubes B110. La vitesse de montée lors de la libération calcique est également réduite de 83% pour les myotubes déficients en dystrophine et de 73% pour les myotubes contrôles. Quant au temps de demi-retour, il est nettement allongé dans les myotubes *mdx* et B110, de 217% et 243% respectivement. Il est intéressant de noter un effet plus prononcé des traitements dans les myotubes provenant de culture primaire de souris *mdx* comparativement aux cellules provenant de souris B110, ainsi que des effets relativement similaires de ces traitements entre les cultures primaires et les lignées cellulaires.

De la même façon que dans les lignées cellulaires (SolC1(-) et SolD(+)), les libérations calciques globales ayant pour origine le RS proviennent des RyRs et des IP3Rs dans les myotubes de cultures primaires de souris *mdx* et B110. Cette libération est plus importante dans les myotubes déficients en dystrophine et serait également due à la suractivation de la libération calcique dépendante des IP3Rs.

### **3. Régulation de l'expression des récepteurs à l'IP3**

Comme on l'a vu les inhibiteurs des récepteurs impliqués dans la libération de calcium diminuent cette libération ce qui n'est pas une nouveauté. Le fait que les inhibiteurs des récepteurs à l'IP3 montrent un effet plus marqué dans les cellules (lignées ou cultures primaires) déficientes en dystrophine est plus intéressant. Encore plus intéressantes sont les expériences réalisées à l'aide de siRNA dirigés contre les récepteurs à l'IP3 qui confirment le rôle de ces récepteurs dans les libérations calciques exacerbées dans les cellules déficientes en dystrophine et conduisent à s'interroger sur les voies de régulation de l'expression de ces récepteurs.

La régulation de l'expression de l'IP3R de type 1 pourrait passer par la voie calcineurine/NFAT (Genazzani et al., 1999). Pour tester que la diminution des libérations calciques globales peuvent bien être la conséquence d'une diminution d'expression de l'IP3R-1, nous nous sommes intéressés à l'expression de son ARNm et à son expression au niveau protéique. La technique de RT-PCR quantitative montre un niveau expression de l'ARNm de l'IP3R-1 qui est significativement augmenté dans les myotubes SolC1(-) comparativement aux myotubes SolD(+) (160% d'augmentation de l'expression de l'ARNm) (Figure R-7 A). Les traitements à long terme (48 heures) avec la cyclosporine A diminuent fortement le niveau de l'ARNm de l'IP3R-1 dans les myotubes déficients en dystrophine (57% de diminution à 100 nM et 81% à 300 nM). En revanche, ces incubations ne modifient pas le niveau d'ARNm de l'IP3R-1 dans les myotubes exprimant la mini-dystrophine. Il est cependant intéressant de noter que l'incubation à 100 nM de CsA dans les myotubes SolC1(-) ramène le niveau d'expression de l'ARNm de l'IP3R-1 à des niveaux comparables à ceux trouvés dans les myotubes SolD(+) dans les conditions contrôles (Figure R-7 A). Le niveau d'expression de l'ARNm de l'IP3R-1 étant variable d'un type cellulaire à l'autre et en présence de CsA, il est nécessaire de regarder le niveau d'expression protéique de ce canal calcique. Les western-blots sont réalisés à partir de lysats cellulaires totaux et l'analyse densitométrique de chaque condition permet de faire un ratio protéine d'intérêt/protéine de référence et ainsi de quantifier l'expression de la protéine d'intérêt en valeur relative, permettant alors la comparaison des différentes conditions (Figure R-7 B). Il semblerait que l'expression protéique de l'IP3R-1 serait plus importante dans les cellules déficientes en dystrophine comparativement aux cellules exprimant la mini-dystrophine. (Figure R-7 C). Cependant, d'autres expérimentations seraient nécessaires afin que l'analyse statistique puisse éventuellement révéler une différence significative. La cyclosporine A (300 nM) en incubation à long terme (48 heures) induit une diminution de moitié de l'expression protéique de l'IP3R-1 dans les myotubes SolC1(-) et ramène cette expression à des niveaux similaires des myotubes SolD(+) (Figure R-7 C). Un autre inhibiteur plus spécifique de la calcineurine, la cyperméthrine, a été utilisée en incubation à long terme (48 heures) à la concentration de 170 nM, ainsi qu'un inhibiteur du NFAT, le VIVIT à la concentration de 1  $\mu$ M (Figure R-8). Bien que n'étant pas significative, l'utilisation de ces deux molécules montre une diminution de l'expression protéique de l'IP3R-1 dans les myotubes déficients en dystrophine (Figure R-8 B et D), qui reste à confirmer.

#### **4. Libérations calciques globales : discussion**

L'étude des libérations calciques induites par une dépolarisation membranaire, provoquée par une solution hyperpotassique, montre qu'il existe deux composantes/sources calciques de cette libération dans les cellules musculaires squelettiques en développement, que ce soit dans les cellules contrôles (B110 ou cellules avec mini-dystrophine) ou dans les cellules déficientes en dystrophine. Pour s'en rendre compte il suffit de comparer les valeurs de l'aire sous la courbe dans en condition contrôle et en présence d'inhibiteurs, que ce soit les inhibiteurs des récepteurs à l'IP3 ou les inhibiteurs des récepteurs à la ryanodine. Dans les deux cas le signal est diminué de façon importante.

Il faut cependant remarquer d'emblée que l'effet de la ryanodine est beaucoup plus complet que celui des inhibiteurs des récepteurs à l'IP3 et que les effets des différents inhibiteurs ne sont pas simplement additifs : la ryanodine est capable d'inhiber à elle seule la presque totalité du signal comme le fait l'utilisation conjointe de ryanodine et de 2-APB. Cela n'empêche pas les différents inhibiteurs des récepteurs IP3 d'avoir pourtant un effet, certe plus modéré mais cependant significatif.

Comment interpréter cette donnée ? Notre hypothèse réside dans un phénomène de « cross-talk » entre les deux récepteurs c'est-à-dire que le fonctionnement de l'un des deux types de récepteur est dépendant de l'autre. Compte-tenu de la forte efficacité de la ryanodine on peut en conclure que le système fonctionne de la façon suivante : les récepteurs à l'IP3 sont capables de fonctionner seuls mais la présence/fonctionnement des récepteurs à la ryanodine est capable de potentialiser le fonctionnement des récepteurs à l'IP3. Dès lors un bloqueur des RyRs pourra bloquer pratiquement toute la libération alors qu'un bloqueur des IP3Rs ne pourra que bloquer la partie de la libération qui passe par les IP3Rs mais dépend des RyRs.

De telles interrelations avaient déjà été observées par Gordienko et collaborateurs en 2002 (Gordienko et al., 2002), et par Balghi collaborateurs en 2006 (Balghi et al., 2006a; Balghi et al., 2006b) dans notre équipe. Ce comportement se trouve confirmé ici.

Si maintenant on s'attarde sur les cinétiques on peut alors montrer que ces composantes, bien qu'imbriquées, présentent des cinétiques différentes, la caractéristique essentielle étant l'augmentation de la durée du signal en présence de ryanodine mesurée par le temps de demi-retour. Il est cependant difficile d'étudier les différences cinétiques puisque la ryanodine ne laisse subsister qu'un signal assez faible.

Avec les inhibiteurs des IP3Rs les données cinétiques apparaissent contrastées : lors de l'incubation des deux types cellulaires (SolC1(-) et Sold(+)) avec du 2-APB ou de la XeC, autre inhibiteur des IP3Rs (Gafni et al., 1997), la vitesse de montée est inférieure à celle obtenue en présence de ryanodine ce qui peut s'expliquer par l'absence de l'effet potentialisateur des RyRs. Le temps de demi-retour quant à lui est inférieur lors de l'inhibition des IP3Rs par le 2-APB que lors de l'inhibition des RyRs par la ryanodine, ce qui met en évidence l'aspect rapide de la libération ryanodine sensible. En revanche, lors de l'utilisation de la XeC, le temps de demi-retour est peu modifié ou légèrement augmenté dans les deux types cellulaires, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus en présence de 2-APB. Ceci pourrait être dû à la propriété de la XeC de bloquer les pompes calciques ATPases du RS (les SERCAs) (De Smet et al., 1999; Castonguay et al., 2002), les empêchant de repomper efficacement le calcium dans le RS afin de diminuer sa concentration cytoplasmique.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ce qui a précédemment été montré dans les cellules musculaires squelettiques en développement par le groupe de Jaimovich (Jaimovich et al., 2000; Powell et al., 2001) et par les travaux réalisés au sein du laboratoire (Balghi et al., 2006a). L'étude des libérations calciques dans les myotubes provenant de cultures primaires issues de muscles de souris *mdx* et B110 montre qu'il existe également deux composantes dans les libérations calciques lors de dépolarisation membranaire par une solution hyperpotassique, dépendantes des IP3Rs et des RyRs.

Si maintenant on s'intéresse à la différence entre les deux types cellulaires on s'aperçoit que la libération calcique dépendante des IP3Rs semble plus importante dans les cellules musculaires déficientes en dystrophine. L'utilisation du 2-APB réduit plus fortement la libération calcique dans les myotubes déficients en dystrophine, que ce soit dans les lignées cellulaires ou dans les cultures primaires provenant de souris *mdx*. La xestospongine C, permet de confirmer l'implication de la voie dépendante des IP3Rs dans les libérations calciques induites par une solution 47 mM KCl. De plus, la quantité de calcium mobilisé dans le temps est supérieure dans les myotubes déficients en dystrophine comparativement aux myotubes contrôle (lignées ou cultures primaires) mais ne semble pas dépendre d'un problème de repompage ou de tamponnement du calcium cytoplasmique car le paramètre du temps de demi-retour est similaire dans ces différents types cellulaires.

On peut ici faire état du travail de Fabien Hubert effectué au cours de son stage de « Master 2 recherche » dans notre laboratoire qui a été d'étudier les libérations calciques des myotubes SolC1(-) et Sold(+) en contrôlant le potentiel de membrane de ces cellules (Hubert, 2009). Ce travail révèle que les libérations calciques sont dépendantes du potentiel de

membrane, c'est-à-dire que ces libérations augmentent avec des dépolarisations membranaires croissantes, résultat classique. Par contre, plus intéressant, le signal calcique apparaît plus durable et le calcium mobilisé plus important dans les myotubes déficients en dystrophine, ce qui vient confirmer l'observation faite en utilisant la solution dépolarisante. Cependant, l'étude pharmacologique n'ayant pas été réalisée, nous ne pouvons savoir quelle est la composante la plus active lors de ces libérations calciques. Cette étude a enfin permis de s'affranchir d'une possible entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire lors de ces enregistrements calciques (Figure R-9). En effet, si un courant calcique de type L est enregistré lors de la dépolarisation, celui-ci n'est pas en rapport direct avec l'augmentation intracellulaire de calcium puisqu'au niveau du maximum de fluorescence, aucun courant calcique entrant n'est visualisé ce qui indique que les variations de calcium intracellulaire lors des dépolarisations membranaires (par une solution hyperpotassique ou par contrôle du potentiel membranaire) sont bien dépendantes des libérations calciques provenant du RS. Ceci est également corroboré par l'utilisation simultanée du 2-APB et de la ryanodine, présentant un signal calcique quasi-inexistant lors des dépolarisations membranaires par solution hyperpotassique.

Que peut-on dire à propos des voies de signalisation liées à l'IP3 ? L'étude antérieure des effets pharmacologiques à court terme sur les libérations provenant du RS montre deux composantes de cette libération calcique globale, dépendantes des RyRs et des IP3Rs dans les cellules musculaires squelettiques (Araya et al., 2003; Balghi et al., 2006a). Elle a également permis de mettre en avant la sur-activation de la voie de l'IP3 dans les cellules déficientes en dystrophine (lignées et cultures primaires issues de muscles de souris). Il a été démontré que lors de la dépolarisation membranaire par une solution hyperpotassique, la quantité d'IP3 produite était plus importante dans les cellules dystrophiques comparativement aux cellules contrôles (Araya et al., 2003). Cette étude propose également l'implication d'une protéine G comme lien entre le DHPR (récepteur membranaire calcique sensible au voltage) et la PLC produisant l'IP3 à partir du PIP2. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la quantité de calcium mobilisé par les IP3Rs dans nos cellules déficientes en dystrophine car l'inhibition de la PLC par la PTX diminue également la libération de calcium après dépolarisation membranaire (Balghi et al., 2006a). Cette différence pourrait également être due à une quantité de récepteurs à l'IP3 plus importante dans ces mêmes cellules comparativement aux cellules contrôles (Balghi et al., 2006a).

Nous montrons ici que l'utilisation de la cyclosporine A à court terme ou à long terme diminue les libérations calciques après dépolarisation membranaire induite par une solution

47 mM KCl dans les deux types de myotubes des lignées cellulaires, avec un effet surtout présent dans les lignées déficientes en dystrophine. Cette molécule est utilisée comme immunosuppresseur dans les préventions cliniques de rejet de greffe et dans la thérapie de diverses pathologies (Billaud, 2000; Weinblatt, 1999). La cyclosporine, une fois liée à son récepteur cytoplasmique (la cyclophiline) peut directement inhiber la libération de calcium provenant des IP3Rs en empêchant la liaison de l'IP3 sur son site de fixation (Misra et al., 1998). De plus, la CsA inhibe également la calcineurine qui est en interaction avec les IP3Rs par l'immunophiline FKBP12 (récepteur cytoplasmique du FK506, autre inhibiteur de la calcineurine) (Cameron et al., 1997). Ceci a pour conséquence de réguler l'état de phosphorylation des IP3Rs, affectant ainsi leur perméabilité au calcium, réduisant les libérations calciques provenant du RS (Misra et al., 1998). Ces modes d'action expliqueraient l'effet à court terme de la CsA sur la diminution de la libération calcique observée dans nos cellules.

Cependant, l'effet d'inhibition de la CsA ne s'arrête pas à la régulation de la perméabilité calcique des IP3Rs, son inhibition de la calcineurine ayant d'autres conséquences. En effet, dans le contexte musculaire, il est bien établi que le calcium active la calcineurine par l'intermédiaire de la calmoduline ayant pour conséquence l'expression de phénotypes oxydatifs et/ou hypertrophiques (Dunn et al., 1999). L'activation de la calcineurine engendre la déphosphorylation du NFAT, exposant son NLS, lui permettant de migrer du cytoplasme au noyau de la cellule (Allen and Leinwand, 2002), pouvant alors initier la transcription de gènes cibles, dont celui de l'IP3R-1. Une étude menée dans des neurones montre que lors de la dépolarisation membranaire par une solution hyperpotassique il y a une augmentation de l'expression de l'IP3R-1, pouvant être inhibée en présence de CsA à long terme (diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine) (Genazzani et al., 1999). Ceci expliquerait l'effet à long terme de la CsA sur la diminution des libérations calciques dans les myotubes déficients en dystrophine. L'incubation à long terme avec la cypermethrine, molécule inhibitrice spécifique de la calcineurine (Enan et al., 1992), présente également une diminution des libérations calciques dans les myotubes déficients en dystrophine. Il en est de même lors de l'incubation des myotubes avec le VIVIT, inhibiteur spécifique du NFAT (Aramburu et al., 1999; Noguchi et al., 2004). De plus, la quantité protéique des IP3R-1 est supérieure dans les myotubes SolC1(-) comparativement aux myotubes SolD(+). Cette surexpression protéique est diminuée lors de l'utilisation de la CsA à long terme et les résultats préliminaires semblent aller dans le même sens lors de l'utilisation de la cypermethrine et du VIVIT. Nos résultats suggèrent donc l'implication de la voie

calcineurine/NFAT dans la régulation de l'expression de ces canaux calciques dans les cellules musculaires en développement. Cette diminution de la quantité d'IP3R-1 dans les myotubes SolC1(-) expliquerait la diminution de la libération calcique globale lors de la dépolarisation membranaire. De récents travaux présentent également l'influence du NFAT sur la transcription de l'IP3R-1 (Valdes et al., 2008). Néanmoins, les auteurs démontrent également qu'à l'état basal le NFAT reste cytoplasmique et ne migre vers le noyau que lors de la dépolarisation membranaire, grâce à l'augmentation intracellulaire de calcium. Cependant, il existe une surcharge calcique basale dans les cellules déficientes en dystrophine, celle-ci ne pouvant servir à la contraction musculaire, elle peut s'avérer suffisante pour activer la translocation du NFAT dans le noyau via le complexe calmoduline/ calcineurine. Le NFAT pourrait alors initier la transcription de ses gènes cibles, dont l'IP3R-1.

Il apparaît donc que l'IP3R-1 est plus fortement exprimé dans les myotubes SolC1(-) que dans les myotubes SolD(+) à l'état basal, aussi bien au niveau du transcrit qu'au niveau protéique. Cette surexpression est diminuée par les siRNA spécifiquement dirigés contre les récepteurs à l'IP3 de type 1 et réduit également le signal calcique dans les deux types cellulaires lors de la dépolarisation membranaire. Ceci confirme donc l'implication de l'isoforme 1 des récepteurs à l'IP3 dans les libérations calciques globales lors des dépolarisations membranaires.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence une libération globale dépendante des IP3Rs suractivée dans les myotubes déficients en dystrophine, comparativement aux myotubes contrôles. La voie calcineurine/NFAT semble également être impliquée dans la régulation de la transcription des récepteurs à l'IP3 de type 1, qui sont plus abondants dans les myotubes SolC1(-) à l'état basal.

---

## II. Les libérations calciques spontanées ou induites par décaage de calcium

Après les libérations calciques globales induites par dépolarisation membranaire, nous sommes intéressés aux libérations calciques à l'état de repos, c'est-à-dire sans variation de potentiel de membrane induit. Deux types de libérations ont été étudiés : les libérations spontanées localisées et les libérations calciques induites par photolyse de calcium cagé. Ces deux techniques s'effectuent à l'aide de la microscopie confocale et de la sonde calcique Fluo-4.

### **1. Libérations calciques spontanées localisées au repos**

#### *1.1. Modèles SolC1(-) et SolD(+)*

Au repos, les myotubes déficients ou non en dystrophine présentent une activité calcique spontanée. Elle se traduit par des libérations calciques très localisées appelées « spark » (pour étincelle puisqu'elles apparaissent comme des étincelles de lumière de fluorescence). Afin de quantifier cette activité calcique, nous avons utilisé un paramètre décrivant la densité de sites de libération calcique (dans la pratique où apparaissent les étincelles) dans les myotubes (nombre de sites / $\mu\text{m}^2$ ). Pour cela, une acquisition rapide d'une séquence d'images est réalisée avec le microscope confocal en balayage rapide, à partir de myotubes chargés en Fluo-4. Chaque séquence comporte 30 à 50 images de fluorescence avec une résolution temporelle de 300 ms (temps entre chaque acquisition de fluorescence pour un même pixel composant l'image). L'enregistrement de la séquence d'images se fait sur le même champ du support de culture des myotubes. Les figures R-10 A-C montrent des exemples de 3 images différentes extraites de la même séquence d'acquisition. Sur ces images, chaque « spot » de fluorescence correspond à un évènement de libération calcique dans un myotube (flèches blanches). Dans la séquence d'image, il y a des images sans évènements de libération reflétant alors le niveau de calcium intracellulaire au repos (Figure R-10 A), ainsi que des images avec un ou plusieurs sites de libération localisés à divers endroits (Figure R-10 B : site  $\alpha$  ; Figure R-9 C : site  $\beta$ ). Nous avons pu observer que plusieurs évènements calciques peuvent avoir le même site de libération d'origine dans le myotube au cours de la séquence d'acquisition. L'analyse des images de la séquence nous permet de calculer la déviation standard de la fluorescence

enregistrée pour chaque pixel en fonction du temps (« compilation » de toutes les images d'une même séquence). Pendant l'enregistrement de la séquence d'images, lorsque plusieurs événements de libération ont lieu à la même localisation (même site de décharge calcique), la déviation standard pour chaque pixel de ce site est plus élevée comparée aux régions sans élévation de calcium (la valeur de la déviation standard correspond alors seulement au bruit de fond). Le résultat obtenu (Figure R-10 D) est une image sur laquelle des spots reflétant une déviation standard élevée sont visualisés, ce qui nous permet de facilement dénombrer les sites de libération ( $\alpha$ ,  $\beta$  et quatre autres sites plus petits). Le nombre de sites est ensuite rapporté à « l'aire » du myotube, nous donnant le paramètre de densité de sites (nombre de site par  $\mu\text{m}^2$  « d'aire cellulaire »).

Dans les conditions contrôle (Figure R-10), la densité de sites est multipliée par 2 dans les myotubes SolC1(-) comparativement aux myotubes Sold(+). L'incubation à court terme (30 minutes) avec 50  $\mu\text{M}$  de 2-APB engendre une forte diminution du nombre de sites de décharge par  $\mu\text{m}^2$  dans les deux types cellulaires (87% dans les SolC1(-) et 77% dans les Sold(+)), diminuant fortement ce paramètre à un niveau similaire dans les deux types cellulaires. La cyclosporine A, à court terme (30 minutes), réduit également de manière significative la densité de sites dans les myotubes déficients en dystrophine aux concentrations 10 et 100  $\mu\text{M}$  (de 44% et 52% respectivement). Cependant, la CsA ne semble pas affecter ce paramètre dans les myotubes exprimant la mini-dystrophine. Il est à noter que pour une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , la densité de sites dans les SolC1(-) est ramenée à un niveau comparable de celui retrouvé dans les Sold(+) dans les conditions contrôles.

De même que pour l'étude des libérations globales de calcium, nous avons étudié l'influence de l'expression de l'isoforme 1 des récepteurs à l'IP3 sur la densité de site de libération calcique au repos (Tableau T-7). L'extinction des IP3R-1 diminue la densité de sites de libération de manière plus importante dans les myotubes SolC1(-) (47% de diminution) que dans les Sold(+) (25% de réduction). De façon similaire à la CsA, les siRNA dirigés spécifiquement contre l'IP3R de type 1 réduisent la densité de site des myotubes SolC1(-) à un niveau équivalent à celui des myotubes Sold(+) en condition contrôle.

### **1.2. Cultures primaires de souris *mdx* et *B110***

Nous avons également commencé l'investigation des libérations calciques spontanées localisées au repos dans les cultures primaires provenant de souris *mdx* ou *B110*, de la même façon que dans les myotubes issus des lignées cellulaires (Figure R-11). Les résultats

préliminaires ont seulement été effectués dans les conditions contrôles afin de voir si la différence présente entre les myotubes SolC1(-) et SolD(+) était retrouvée entre les myotubes provenant de souris *mdx* ou B110. Il semblerait que la densité de sites soit plus importante dans les myotubes déficients en dystrophine comparativement aux myotubes exprimant la dystrophine entière, ce qui correspond aux résultats obtenus sur les SolD(+) et SolC1(-). L'analyse statistique ne révélant pas de différence significative de la densité de sites entre les deux types de myotubes, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires.

### ***1.3. Localisation et répartition des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique dans les myotubes de lignées***

L'étude de la répartition des différents canaux calciques du RS a pu être effectuée par la technique d'immunomarquage grâce à des anticorps primaires spécifiques de chacun des récepteurs (Figure R-12). Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à un fluorochrome et l'acquisition des images se fait par microscope confocal à balayage laser. Ces images révèlent une localisation cytoplasmique des RyRs (Figure R-12 A et D) ainsi que de l'IP3R-2 (Figure R-12 B et E) et IP3R-1 (Figure R-12 C et F) dans les deux types de myotubes. On remarque que là où les IPR-2 sont localement abondants correspondent des zones de faible expression des RyRs et ce dans les myotubes SolC1(-) et SolD(+) (flèches jaunes, Figure R-12 A, B, D et E). La localisation des IP3R-1 est majoritairement cytoplasmique dans les myotubes exprimant ou non la mini-dystrophine (Figure R-12 C et F). Cependant, nous observons également un marquage périnucléaire de ce canal calcique principalement dans les myotubes SolC1(-) (Figure R-12 C).

## **2. Décageage de calcium par photolyse de calcium cagé**

### ***2.1. Cultures primaires de souris *mdx* et B110***

La technique de décageage de calcium est rendue possible grâce à une molécule particulière, le NP-EGTA, qui une fois dans le cytoplasme de la cellule peut chélater le calcium libre cytoplasmique. La photolyse du complexe calcium-NP-EGTA par un flash UV va permettre la libération du calcium lié à la molécule. Cette libération de calcium augmente

expérimentalement et localement la concentration calcique intracellulaire, qui est détectée par la sonde calcique Fluo-4 (Figure R-13 A et B).

Lors du décaillage de calcium la membrane plasmique de la cellule n'est pas dépolarisée, l'augmentation de calcium intracellulaire visualisé est donc un phénomène dépendant du « calcium-induced calcium-release » (CICR). Les résultats montrent une augmentation du calcium par CICR plus importante dans les myotubes provenant de souris *mdx* que dans les myotubes provenant de souris B110 (Figure R-13). Nous observons effectivement une amplitude maximale et une aire sous la courbe largement supérieure dans les myotubes déficients en dystrophine (respectivement 164% et 194% pour chaque paramètre) comparativement aux myotubes exprimant la mini-dystrophine (Figure R-13 C et D). L'utilisation du 2-APB (100  $\mu$ M, 30 minutes) permet de réduire d'une façon similaire l'amplitude dans les deux types cellulaires (18% de diminution dans les myotubes *mdx* et 25% de diminution dans les myotubes B110). L'aire sous la courbe est diminuée seulement dans les myotubes déficients en dystrophine lors de l'incubation avec le 2-APB (13%) (Figure R-13 E). Il n'y a pas de différences observées pour la durée à mi-hauteur entre les deux types cellulaires et le 2-APB n'induit pas non plus de variations significatives (Figure R-13 C).

Ces résultats mettent en avant un phénomène d'augmentation du calcium intracellulaire par CICR plus important dans les myotubes déficients en dystrophine comparativement aux myotubes exprimant la dystrophine entière. La même quantité de calcium libérée expérimentalement lors du décaillage provoque une augmentation de calcium différente entre les deux types de cellules musculaires squelettiques en développement.

Ces résultats sont en accord avec ce qui a précédemment été observé lors des libérations calciques globales par dépolarisation membranaire : une plus forte libération calcique dans les myotubes déficients en dystrophine comparativement aux myotubes contrôle, ainsi qu'une diminution de cette libération dans les deux types cellulaires par l'utilisation du 2-APB.

## 2.2. Fibres musculaires

Une même étude a été effectuée dans les fibres musculaires de souris *mdx* et B110 fraîchement dissociées (Figure R-14 A et B). L'intensité du flash UV permettant la photolyse est plus faible que celle utilisée pour les cultures primaires afin de ne pas endommager les fibres musculaires matures. C'est pourquoi la zone de stimulation est agrandie (sous forme de rectangle) afin de libérer une quantité suffisante de calcium permettant l'enregistrement d'un signal. La ligne de stimulation est positionnée à proximité de la zone de stimulation.

Le test statistique Anova à double entrée ne révèle pas d'interaction significative entre la variable type cellulaire et la variable traitement (Figure R-14). En revanche, il y a une différence significative entre les deux types cellulaires pour les paramètres d'amplitude et d'aire sous la courbe ( $P < 0.001$ ) (Figure R-14 C et E). Dans les conditions contrôles, nous observons une amplitude de 71% supérieure dans les fibres *mdx* par rapport aux fibres B110, ainsi qu'une aire sous la courbe de 33% plus importante dans les fibres *mdx*. Le 2-APB utilisé à 50  $\mu\text{M}$  pendant 30 minutes n'induit pas de variations significatives des divers paramètres, cependant, la tendance serait à une diminution de l'amplitude et de l'aire sous la courbe dans les fibres *mdx*.

Dans ce système mature, il y a également un phénomène de CICR plus important dans les fibres déficientes en dystrophine comparativement aux fibres contrôle, cependant, ce système semble mieux réguler l'homéostasie calcique car la différence est moins importante que dans les myotubes provenant de cultures primaires, qui sont des cellules en développement et donc non matures.

### **3. Libérations calciques spontanées et ou induites par décaageage de calcium : discussion**

Les libérations calciques spontanées sont présentes dans les myotubes de lignées cellulaires exprimant ou non la mini-dystrophine ainsi que dans les myotubes provenant de cultures primaires de souris *mdx* ou contrôles.

Dans ces deux types de préparation (lignées ou cultures primaires), la densité de sparks est plus importante dans les cellules déficientes en dystrophine. Beaucoup d'études ont montré l'implication des récepteurs à la ryanodine dans les libérations calciques spontanées, notamment les RyRs de type 1 et 3 (Conklin et al., 2000; Ward et al., 2000). Les récepteurs à la ryanodine de type 3 n'étant pas sous le contrôle physique des DHPRs, peuvent initier la libération calcique qui pourra alors être amplifiée par les RyRs de type 1 (Felder et al., 2002; Ward and Lederer, 2005). Cependant, ici nous sommes dans des myotubes qui sont des cellules musculaires en développement et non des fibres musculaires matures, donc le DHPR ne peut pas encore exercer son contrôle sur les RyR1. Il a également été démontré que dans des cellules musculaires squelettiques en développement, les libérations calciques spontanées étaient localisées dans des régions où le complexe entre les tubules-T et le RS n'était pas encore formé (Shirokova et al., 1999; Zhou et al., 2006). Ceci appuie donc l'hypothèse d'une

implication des récepteurs à la ryanodine dans les libérations spontanées des cellules musculaires en développement. Cependant, l'utilisation du 2-APB et de la cyclosporine A diminue la densité de sparks dans les deux types cellulaires, mais avec une plus forte proportion dans les cellules déficientes en dystrophine. Les récepteurs à l'IP3 semblent donc être également impliqués dans cette libération calcique. De plus, l'extinction de l'IP3R-1 par siRNA spécifique diminue plus fortement les libérations calciques spontanées dans les myotubes SolC1(-) comparativement aux myotubes SolD(+). On peut donc raisonnablement faire l'hypothèse que les récepteurs à l'IP3, et plus particulièrement ceux de type 1, participent à l'activité spontanée, notamment dans les cellules déficientes en dystrophine. Dès lors on peut penser que la régulation de leur expression puisse conditionner la densité de sites de libération, mais aussi, à l'inverse, que leur présence près du noyau cellulaire puisse modifier l'expression d'autres protéines.

La libération expérimentale de calcium par la technique de calcium cagé montre une différence entre les cellules sans dystrophine ou exprimant la dystrophine plus importante dans les myotubes en développement que dans les fibres matures. Les expériences montrent aussi que la différence d'augmentation de calcium intracellulaire par phénomène de CICR entre les cellules exprimant ou non la dystrophine est plus importante dans les cellules en développement comparativement aux fibres musculaires matures.

A quoi attribuer ces différences observées dans les expériences de décaage calcique? Pour ce qui concerne la différence entre cellules déficientes ou non en dystrophine on peut avancer l'idée d'un rôle des IP3Rs, de leur sensibilité particulière au phénomène de CICR (Bootman et al., 1995) et du niveau d'expression différent (augmenté) de ces récepteurs dans les cellules dépourvues de dystrophine comme nous l'avons montré précédemment. On doit noter que ce résultat est important : dans un contexte pathologique, la présence des IP3Rs, en plus grand nombre, et plus sensible au CICR pourrait entraîner une amplification des augmentations calciques non contrôlées. On peut ainsi imaginer, par exemple, que des entrées de calcium par une ou l'autre des voies présentes en surface de la cellule ou de la fibre puissent résulter en une augmentation, sinon massive, du moins exacerbée du calcium myoplasmique par CICR, avec tous les effets délétères qui s'ensuivent. De ce point de vue on rappellera les résultats obtenus dans l'équipe par Deval et collaborateurs (Deval et al., 2002) dans des cellules humaines de patient DMD, en culture, qui montraient que l'échangeur Na/Ca n'était pas impliqué directement dans la surcharge calcique mais par l'intermédiaire d'un phénomène de CICR plus important par rapport à ce qui était trouvé dans les cellules issues de muscle sain.

La situation sur les fibres musculaires de souris apparaît différente, c'est-à-dire que la différence entre cellules contrôle et cellules de *mdx* est moins marquée. La différence est bien là mais de façon plus discrète. Cela peut s'expliquer par le fait que les fibres sont des systèmes très matures, la compartimentalisation est bien en place ainsi que les phénomènes de régulation de la concentration calcique cytoplasmique. Le calcium libéré dans les fibres musculaires adultes est principalement utilisé pour la contraction musculaire et doit être rapidement régulé pour permettre la relaxation musculaire. Des phénomènes de régulation de l'homéostasie calcique doivent donc se mettre en place lors du développement et de la maturation des cellules musculaires, afin de limiter la signalisation calcique pour ne pas induire de surcharge de calcium dans la cellule.

### III. La survie cellulaire

Les résultats obtenus jusqu'ici montrent clairement des différences dans la capacité des cellules à maintenir l'homéostasie calcique selon qu'elles possèdent ou non de la dystrophine. Quel que soit le mécanisme de transfert du calcium que l'on interroge et quel que soit la façon dont on l'interroge, les cellules déficientes en dystrophine présentent toujours des caractéristiques qui peuvent concourir à une dérégulation calcique avec des augmentations nettes des variations de concentration calciques que ce soit à un niveau global ou de façon plus localisée dans le temps ou l'espace.

Il reste que l'on peut légitimement se demander si ces transferts calciques perturbés ont des conséquences fonctionnelles mesurables. C'est pour cette raison que nous avons entrepris d'examiner la survie de ces cellules, et en particulier la capacité des agents permettant de limiter la dérégulation calcique à protéger les cellules de la mort prématurée en culture.

#### 1. Effets des différents traitements sur la survie cellulaire

Il a précédemment été montré au laboratoire que les myotubes déficients en dystrophine ont une mort cellulaire naturelle plus précoce que celle des myotubes exprimant la mini-dystrophine (Constantin et al., 2006). La technique utilisée alors était celle du marquage à l'iodure de propidium (IP).

Ce marqueur fluorescent pénètre seulement dans les cellules dont la membrane plasmique est endommagée et permet le marquage fluorescent des noyaux par ses propriétés intercalantes. Le comptage de cellules mortes se fait par observation des noyaux fluorescents marqués avec l'IP (Figure R-15 A, insert). La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage relatif du nombre de myotubes SolD(+) viables à 4 jours après la fusion (D4, 100% de cellules vivantes) (Figure R-15 A). En partant de la même quantité de cellules entre les deux types cellulaires (SolC1(-) et SolD(+)) à partir de l'induction de la fusion (D0), le pourcentage de cellules vivantes à D4 est plus important dans les SolD(+) que dans les SolC1(-) (Figure R-15 A). La viabilité cellulaire des myotubes SolD(+) décroît doucement de D4 à D7, contrairement à celle des myotubes SolC1(-) qui diminue brusquement à D7.

Afin d'effectuer des tests de survie cellulaire à plus grande échelle pour tester diverses molécules, nous avons adapté le test MTT à notre protocole de culture cellulaire prenant en considération la phase de prolifération des myotubes et la phase de différenciation (fusion) en

myotubes. Ces tests ont préalablement été effectués sur plusieurs cultures cellulaires de D4 à D7 pour les deux types cellulaires (Figure R-15 B). Comme pour l'expérimentation avec l'iodure de propidium, les résultats sont exprimés en pourcentage relatif du nombre de myotubes SolD(+) vivants à D4 (100% de survie cellulaire). En accord avec ce qui est observé pour le marquage à l'IP, la viabilité cellulaire des myotubes SolD(+) est supérieure à celle des myotubes SolC1(-). La diminution de la survie cellulaire est significative au cours du temps pour les deux types cellulaires ( $P < 0,001$ ). De plus, la diminution de la viabilité cellulaire diffère entre les myotubes SolC1(-) et SolD(+) ( $P < 0,001$ ). La mort cellulaire est plus importante dans les myotubes déficients en dystrophine que dans les myotubes exprimant la mini-dystrophine (respectivement 47% et 33% de diminution de la viabilité cellulaire).

Les résultats de survie cellulaire obtenus au cours du temps pour les deux types cellulaires avec la technique de marquage à l'iodure de propidium ou la technique de MTT étant comparables, cette dernière technique a donc été utilisée pour étudier et quantifier l'effet protecteur de divers agents contre la mort cellulaire dans les lignées cellulaires. Ces mesures ont été effectuées à 5 jours après la mise en différenciation (D5), l'incubation des cellules avec les divers agents pharmacologiques se faisant de D1 à D5. Les tests de viabilité cellulaires en présence des divers agents pharmacologiques s'effectuent à D5, ce qui correspond à une diminution de la viabilité cellulaire des myotubes SolC1(-) suffisant pour voir un potentiel effet protecteur des agents, sans avoir une mort cellulaire des myotubes SolD(+) trop avancée.

Les myotubes SolD(+) ne présentent pas de variation de viabilité cellulaire lorsqu'ils sont incubés avec du 2-APB, quelles que soient les concentrations utilisées (Figure R-15 C). Cependant, une augmentation de la survie cellulaire est observée pour les myotubes SolC1(-) en présence de 2-APB, les effets les plus significatifs étant observés aux concentrations de 12,5  $\mu\text{M}$  et 25  $\mu\text{M}$  (respectivement 22% et 36% d'augmentation de la viabilité cellulaire). Cette molécule a donc un effet protecteur de la mort cellulaire prématurée des myotubes déficients en dystrophine. Des résultats similaires sont retrouvés en présence de cyclosporine A. Cet agent n'influence pas la survie cellulaire des myotubes exprimant la mini-dystrophine. En revanche elle permet de protéger les myotubes SolC1(-) de la mort cellulaire : 35% d'augmentation de la viabilité cellulaire à une concentration de 300 nM et 45% avec 600 nM.

L'effet du VIVIT et de la cyperméthrine a été testé sur la viabilité cellulaire des deux types de myotubes (SolC1(-) et SolD(+)) (Figure R-16 A et B). L'effet du VIVIT est significativement différent entre les deux types cellulaires ( $P < 0,001$ ). Effectivement, le VIVIT n'engendre pas de variations de la viabilité cellulaire des myotubes SolD(+) aux

différentes concentrations utilisées. A contrario, elle augmente la survie cellulaire des myotubes SolC1(-), notamment pour les concentrations 1, 2 et 4  $\mu\text{M}$  (respectivement 24%, 35% et 26% d'augmentation de survie cellulaire). De la même manière que le 2-APB et la CsA, le VIVIT protège les myotubes déficients en dystrophine de la mort cellulaire prématurée. Des résultats préliminaires avec la cyperméthrine montrent également une différence d'effet de cette molécule entre les deux types cellulaires ( $P < 0.05$ ). Les plus fortes concentrations en cyperméthrine (169 et 337 nM) provoquent une légère diminution de la viabilité cellulaire des myotubes exprimant la mini-dystrophine (effet cytotoxique). Ces mêmes concentrations protègent les myotubes déficients en dystrophine de la mort cellulaire.

Afin de voir l'effet de l'extinction du récepteur à l'IP3 de type 1 sur la survie cellulaire, les tests MTT ont également été effectués avec le siRNA spécifique de l'IP3R-1 (Figure R-16 C). Les conditions contrôles ne sont pas les mêmes que pour les autres expérimentations, car elles nécessitent la transfection d'un siRNA contrôle (Ghost) n'ayant aucune cible particulière. Les expérimentations sont effectuées à D3 car les SiRNA ne sont plus efficaces après ce laps de temps (72 heures d'efficacité dans nos cellules). La survie cellulaire est tout de même exprimée en pourcentage relatif du nombre de myotubes SolD(+) vivants dans les conditions contrôles (SiRNA contrôle) à D3 (100% de cellules vivantes). A D3 dans les conditions contrôles, la survie cellulaire des myotubes SolC1(-) est significativement inférieure à celle des myotubes SolD(+) (de 17%). L'effet des SiRNA spécifiques des IP3R-1 est statistiquement différent ( $P < 0.001$ ) entre les myotubes SolC1(-) et SolD(+). En effet, l'extinction des IP3R-1 n'affecte pas la viabilité cellulaire des myotubes SolD(+) alors qu'elle augmente significativement celle des myotubes SolC1(-) (22% d'augmentation). Le fait d'éteindre partiellement l'isoforme 1 des récepteurs à l'IP3 protège les myotubes déficients en dystrophine de la mort cellulaire.

## **2. Survie cellulaire : discussion**

La technique de MTT a permis de montrer que les myotubes déficients en dystrophine présentent une mort cellulaire prématurée plus importante que dans les myotubes exprimant la mini-dystrophine, en accord avec ce qui a précédemment été démontré par le marquage à l'iodure de propidium (Marchand et al., 2001; Constantin et al., 2006). Les myotubes déficients en dystrophine ont également une signalisation calcique perturbée qui est restaurée avec l'expression de la mini-dystrophine (Marchand et al., 2004). Cette surcharge calcique de

repos peut être à l'origine de la mort prématurée des cellules déficientes en dystrophine. L'utilisation des différents agents pharmacologiques inhibiteurs des IP3Rs (2-APB et CsA) engendre une diminution des deux types de libérations calciques (globales ou spontanées) dans les myotubes SolC1(-). Ces mêmes molécules permettent également de protéger les myotubes déficients en dystrophine de la mort cellulaire. De plus, lorsque la voie calcineurine/NFAT est elle aussi inhibée (CsA, VIVIT et cypermethrine), la mort cellulaire naturelle des myotubes est diminuée, de façon concomitante à la diminution des libérations calciques globales. L'extinction partielle des IP3R-1 par siRNA permet aussi de protéger les myotubes déficients en dystrophine de la mort cellulaire, conjointement à la réduction des libérations calciques (globales ou au repos). L'inhibition partielle et à court terme des libérations calciques provenant du RS permettent d'augmenter la survie cellulaire des myotubes SolC1(-). De plus, il est intéressant de noter que la régulation de l'expression des récepteurs à l'IP3 et particulièrement de l'isoforme 1 permet de retrouver dans les myotubes SolC1(-) une libération calcique similaire à celle des myotubes Sold(+), et de les protéger de la mort cellulaire naturelle.

Le calcium est connu pour être un second messenger important dans la cellule musculaire, permettant entre autre la contraction musculaire, mais il peut aussi être nocif si sa concentration reste élevée trop longtemps. Plusieurs mécanismes peuvent alors déclencher la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Effectivement, la surcharge calcique mitochondriale peut provoquer la libération du cytochrome c contenu dans la membrane de la mitochondrie, initiant l'apoptose de la cellule (Green et al., 1998; McCormack et al., 1990). Vandebrouck et collaborateurs ont montré en 2006 (Vandebrouck et al., 2006) une recapture du calcium par les mitochondries plus importante dans les myotubes SolC1(-) que dans les myotubes Sold(+), ce qui laisse suggérer une surcharge calcique des mitochondries pouvant engendrer la mort cellulaire de ces mêmes cellules. De plus, cette surcharge calcique cytoplasmique permet l'activation de protéases calcium dépendantes, dont les calpaïnes, provoquant la mort cellulaire des cellules musculaires déficientes en dystrophine (Turner et al., 1988; Spencer et al., 1995; Alderton et al., 2000), par activation de canaux calciques du sarcolemme et/ou par dégradation de protéines de la cellule musculaire. Il a de même été démontré que le stress mitochondrial en lien avec la signalisation calcique et l'activation de la voie NFκB pouvait jouer un rôle dans la mort cellulaire des lignées myogéniques C2C12 (Biswas et al., 2003). Cette voie serait impliquée dans le processus de dégénérescence des fibres musculaires des souris *mdx* car son inhibition limite ce phénomène (Hunter et al., 2002; Cai et al., 2004;

Mourkioti et al., 2006) et augmente la force musculaire parallèlement à la diminution de la fatigue musculaire (Messina et al., 2006).

L'implication du calcium dans la mort cellulaire prématurée des cellules déficientes en dystrophine semble être évidente, les différents canaux calciques du sarcolemme et du réticulum sarcoplasmique pouvant être impliqués. Cependant, de nouvelles données expérimentales permettent de mettre en avant une possible intervention de l'IP3R-1 à l'initiation de la mort cellulaire des lymphocytes B immatures (Nakayama et al., 2004). La caspase 3 en clivant la protéine de l'IP3R-1 insérée dans la membrane du RS le scinde de son domaine régulateur, le maintenant dans une conformation active où il va continuellement libérer du calcium du RS vers le cytoplasme, accélérant le processus de mort cellulaire (Assefa et al., 2004). De plus, le stress calcique va provoquer la libération du cytochrome c par la mitochondrie, celui-ci pouvant alors se fixer aux IP3Rs, le maintenant en conformation ouverte, amplifiant la libération calcique de ces canaux (Boehning et al., 2003). Tous ces processus pourraient être présents dans les cellules musculaires squelettiques déficientes en dystrophine présentant une surcharge calcique, car *in vitro* lorsque l'expression de l'IP3R-1 est diminuée, les cellules sont protégées de la mort cellulaire.

## Conclusions générales et perspectives

L'absence de la dystrophine dans la dystrophie musculaire de Duchenne conduit à la nécrose des fibres musculaires. Le lien entre l'absence de la dystrophine et la mort cellulaire n'est toujours pas bien établi à l'heure actuelle. Une des hypothèses pouvant expliquer la mort prématurée des cellules déficientes en dystrophine est celle de la dérégulation calcique.

### Suractivation de la voie IP3 et lien avec la mort cellulaire

Les précédents travaux du laboratoire ont mis en évidence une suractivation des libérations calciques globales et spontanées dépendantes des IP3Rs dans les cellules déficientes en dystrophine (Balghi et al., 2006a; Balghi et al., 2006b). Le travail présenté ici a permis de confirmer la présence de cette suractivation de la voie de l'IP3 et de déterminer l'un des mécanismes impliqués dans cette suractivation de la voie de l'IP3. En effet, quel que soit le temps d'incubation de la cyclosporine A, cet agent diminue les deux types de libérations calciques (globales et spontanées) principalement dans les myotubes déficients en dystrophine. Ces résultats mettent en évidence un double effet de la cyclosporine A sur les libérations calciques : un effet à court terme et un effet à long terme (Figure CP-1). L'effet à court terme de la CsA (Figure CP-1 [1]) peut être dû à son action directe sur les IP3Rs. Une fois liée à son récepteur cytoplasmique (la cyclophiline), la CsA peut directement inhiber les IP3Rs (Misra et al., 1998), diminuant ainsi leur libérations calciques. L'effet à long terme (Figure CP-1 [2]) peut lui être expliqué par le fait que le complexe CsA/cyclophiline inhibe également la calcineurine qui pourrait être impliquée dans la transcription du récepteur à l'IP3 de type 1 (Genazzani et al., 1999). De plus, l'incubation à long terme des deux types cellulaires en présence de CsA met en évidence une diminution de la transcription et de l'expression protéique de l'IP3R-1 dans les cellules déficientes en dystrophine. Il en est de même lors de l'utilisation de la cyperméthrine (autre inhibiteur de la calcineurine) et du VIVIT (inhibiteur du facteur de transcription NFAT). Ces résultats montrent une implication de la voie calcineurine/NFAT dans la régulation de l'expression des récepteurs à l'IP3 et plus particulièrement de l'isoforme 1 de ces récepteurs. Ces récepteurs étant plus fortement exprimés dans les cellules déficientes en dystrophine à l'état basal, l'inhibition de la voie calcineurine/NFAT réduit le niveau d'expression de l'IP3R-1 dans ces cellules à un niveau proche de celui présent dans les cellules exprimant la mini-dystrophine. Parallèlement à la

diminution des libérations calciques (globales et spontanées), la modulation (inhibition) de la voie de l'IP3 réduit la mortalité prématurée des cellules déficientes en dystrophine.

Ce travail a donc permis de montrer une surexpression des IP3R-1 dans les cellules déficientes en dystrophine et l'implication de la voie calcineurine/NFAT dans la régulation de l'expression des IP3R-1. Ce travail a également permis de mettre en lumière l'impact de la régulation de l'expression des IP3R-1 par la voie calcineurine/NFAT sur les libérations calciques et la mort des cellules déficientes en dystrophine.

Il serait maintenant intéressant de savoir si la surexpression des IP3R-1 dans les cellules déficientes en dystrophine est consécutive à une suractivation de la calcineurine due à la surcharge calcique dans les cellules déficientes en dystrophine.

Il serait intéressant, quoiqu'il en soit, d'explorer les perspectives pharmaco-thérapeutiques de la modulation de la voie calcineurine/NFAT dans le mécanisme d'inhibition de la voie IP3. De même, puisque la cyclosporine A est utilisée en thérapie pour limiter la réponse inflammatoire dans la dystrophie musculaire de Duchenne, il serait donc intéressant de tester l'utilisation de cette molécule en prévention de la mort des cellules musculaires et de l'inflammation grâce à son action inhibitrice de la voie IP3.

#### Libération calcique dans les myotubes provenant de cultures primaires de souris *mdx* et *B110*

Ce travail nous a permis de mettre en évidence la présence d'une libération calcique globale dépendante des IP3Rs dans les myotubes provenant de cultures primaires de souris *mdx* et *B110*, ainsi qu'une suractivation de la voie de l'IP3 dans les myotubes déficients en dystrophine comparativement aux myotubes exprimant la mini-dystrophine.

Les phénomènes visualisés dans nos lignées cellulaires sont également présents dans les cultures primaires provenant de muscles squelettiques de souris *mdx*. Ces observations sont-elles généralisables à d'autres modèles comme le chien et sont-elles également présentes chez les patients DMD ? Les expériences sur ces tissus restent à développer.

#### Phénomène de CICR dans les myotubes en développement et les fibres musculaires squelettiques matures de ces souris

Les expériences de décaage de calcium mettent en avant la présence d'un phénomène de CICR dans les myotubes et dans les fibres matures provenant des souris *mdx* et *B110*. Ces expérimentations montrent un phénomène de CICR plus important dans les cellules

déficientes en dystrophine. Ce résultat est important puisqu'il avait déjà été mis en évidence, par d'autres techniques, sur des myotubes provenant de malades DMD (Deval et al., 2002), confirmant, s'il était besoin, que la dérégulation calcique observée dans les cellules déficientes en dystrophine réside au moins en partie dans les mécanismes de libération de calcium à partir du RS. En l'état actuel des travaux (mais la quantité des données reste insuffisante pour conclure) cette différence apparaît moins marquée au stade de fibre musculaire mature ce qui suggère une régulation plus robuste de l'homéostasie calcique dans les fibres matures par rapport aux cellules musculaires en développement. Néanmoins il faut se souvenir que les cellules musculaires déficientes en dystrophine présentent un fort taux de mortalité cellulaire lors du développement, ce qui laisse penser que les fibres musculaires rescapées sont les plus résistantes à la surcharge calcique et que ce sont celles que nous interrogeons lors de l'étude des fibres matures ce qui fausse en partie les expériences. Il faut également prendre en compte le fait qu'il a été précédemment démontré que les souris *mdx* compensent la perte de la dystrophine par une surexpression d'utrophine, protéine analogue à la dystrophine (De La et al., 1999). Nous savons également que le système de tampon calcique des fibres matures de souris *mdx* est très efficace, notamment par la présence cytoplasmique de la parvalbumine (Sano et al., 1990). Nous touchons là la limite de l'expérimentation sur l'animal qui appelle fortement à développer une étude similaire sur des cultures primaires et des tissus humains afin de s'affranchir des problèmes inhérents au modèle de la souris *mdx*.

### *Perspectives générales*

La mortalité des cellules musculaires déficientes en dystrophine est donc, au moins en partie, une conséquence de la dérégulation calcique due à la suractivation de la voie de l'IP3 et, au final, des libérations calciques à partir du RS. Cela n'exclue pas que d'autres voies calciques interviennent, notamment à partir de l'extérieur de la cellule. On citera par exemple l'entrée capacitative de calcium plus importante dans les cellules déficientes en dystrophine mise en évidence par Vandebrouck et collaborateurs (Vandebrouck et al., 2007), pouvant également conduire à la dérégulation calcique. Cela n'exclue pas non plus les possibles problèmes au niveau de la pompe calcique (Divet et al., 2005). Il reste que l'ensemble du travail rapporté ici apporte de nombreux arguments en faveur d'un rôle majeur des libérations calciques médiées par le récepteur à l'IP3 dont le fonctionnement apparaît gravement exacerbé dans les cellule déficientes en dystrophine. De plus ce n'est pas seulement une simple

altération des propriétés de ce récepteur qui semble en cause mais l'ensemble de la voie des IP<sub>3</sub>, y compris au niveau de l'expression génique.

Par ailleurs il est intéressant de noter que la voie calcineurine/NFAT, étudiée ici, semble également être impliquée dans la transcription de TRPC (Morales et al., 2007) pouvant ainsi induire une suractivation des entrées calciques dépendantes de ces canaux membranaires. Des travaux récents ont montré que les libérations calciques médiées par les IP<sub>3</sub>Rs lors de dépolarisations membranaires participaient à l'activation et à la translocation du facteur NFκB dans le noyau des cellules musculaires squelettiques en développement (Valdes et al., 2007) (Figure CP-2). Ce facteur de transcription peut contribuer à la perturbation des dommages des cellules déficientes en dystrophine et son inhibition a des effets bénéfiques sur les cellules musculaires des souris *mdx* (Messina et al., 2006). Les travaux de Valdés et collaborateurs (Valdes et al., 2008) montrent une interaction entre les voies NFAT et NFκB par les libérations calciques provenant des différents canaux calciques des cellules musculaires en développement dans les conditions physiologiques normales. La question se pose alors de savoir ce qu'il en est de l'activation de la voie NFκB dans les cellules musculaires déficientes en dystrophine (Figure CP-2).

D'un autre côté il a été montré dans les lymphocytes B immatures, que la caspase 3 pourrait cliver la partie régulatrice de l'IP<sub>3</sub>R-1, le rendant constitutivement actif et libérant continuellement du calcium dans le cytoplasme (Nakayama et al., 2004) (Figure CP-2). De plus, il a également été démontré que le cytochrome c libéré par la mitochondrie pouvait également activer la caspase 3, entraînant la mort cellulaire. Le cytochrome c peut lui aussi activer les IP<sub>3</sub>Rs, permettant ainsi une libération plus importante de calcium dans le cytoplasme (Figure CP-2). Il serait donc intéressant de mesurer l'activité de la caspase 3 dans les cellules déficientes en dystrophine et dans les cellules contrôles, ainsi que d'identifier la présence ou non de la forme clivée de l'IP<sub>3</sub>R-1.

D'une manière générale, ce travail a permis d'apporter des arguments forts en faveur de l'identification de l'une des causes de la dérégulation calcique des cellules déficientes en dystrophine, aboutissant à la mort cellulaire. Il a également permis de montrer l'implication de la libération calcique dépendante des IP<sub>3</sub>Rs dans le couplage excitation-transcription des cellules musculaires squelettiques en développement.

Une approche thérapeutique par des inhibiteurs de la voie IP<sub>3</sub>, y compris au niveau de l'expression génique pourrait s'avérer intéressante en permettant de diminuer la mortalité cellulaire des cellules musculaires déficientes en dystrophine. On sait de ce point de vue que

des patients sont traités à la cyclosporine (Sharma et al., 1994) : qu'en est-il alors de l'IP3, de ses récepteurs et de ses voies de régulation dans les fibres de ces patients? Il y a là certainement des perspectives d'études intéressantes.

On soulignera pour conclure que si la phrase qu'il est habituel d'écrire en introduction "le lien entre l'absence de la dystrophine et la surcharge calcique reste encore inconnu et complexe" reste vraie, nous pensons avoir contribué à la rendre un peu moins vraie en étayant l'hypothèse de la perturbation des systèmes de libération calcique en absence de dystrophine.

Enfin, même si l'expérimentation sur des lignées cellulaires et des cultures faites à partir de muscle de souris est précieuse, le présent travail le démontre, on doit aussi reconnaître que des travaux réalisés à partir de préparations musculaires humaines seraient, sans doute moins aisées mais très intéressantes.

---

## Bibliographie

-A-

- Abbott, K.L., B.B. Friday, D. Thaloor, T.J. Murphy, and G.K. Pavlath. 1998. Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 9:2905-2916.
- Adkins, C.E., S.A. Morris, H. De Smedt, I. Sienaert, K. Torok, and C.W. Taylor. 2000. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin inhibits Ca<sup>2+</sup> release mediated by type-1, -2 and -3 inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 345 Pt 2:357-363.
- Ahern, G.P., P.R. Junankar, and A.F. Dulhunty. 1994. Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. *FEBS Lett* 352:369-374.
- Alderton, J.M. and R.A. Steinhardt. 2000. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 275:9452-9460.
- Allen, D.L. and L.A. Leinwand. 2002. Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calcium-calmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIa myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem* 277:45323-45330.
- Alzuherri, H. and K.C. Chang. 2003. Calcineurin activates NF-kappaB in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal* 15:471-478.
- Andronache, Z., D. Ursu, S. Lehnert, M. Freichel, V. Flockerzi, and W. Melzer. 2007. The auxiliary subunit gamma 1 of the skeletal muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channel is an endogenous Ca<sup>2+</sup> antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17885-17890.
- Aramburu, J., M.B. Yaffe, C. Lopez-Rodriguez, L.C. Cantley, P.G. Hogan, and A. Rao. 1999. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285:2129-2133.
- Araya, R., J.L. Liberona, J.C. Cardenas, N. Riveros, M. Estrada, J.A. Powell, M.A. Carrasco, and E. Jaimovich. 2003. Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. *J Gen Physiol* 121:3-16.
- Arnaudeau, S., N. Macrez-Lepretre, and J. Mironneau. 1996. Activation of calcium sparks by angiotensin II in vascular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 222:809-815.
- Assefa, Z., G. Bultynck, K. Szlufcik, K.N. Nadif, E. Vermassen, J. Goris, L. Missiaen, G. Callewaert, J.B. Parys, and H. De Smedt. 2004. Caspase-3-induced truncation of type 1 inositol trisphosphate receptor accelerates apoptotic cell death and induces inositol trisphosphate-independent calcium release during apoptosis. *J Biol Chem* 279:43227-43236.
- Atar, D., P.H. Backx, M.M. Appel, W.D. Gao, and E. Marban. 1995. Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem* 270:2473-2477.
- Austin, L., M. de Niese, A. McGregor, H. Arthur, A. Gurusinge, and M.K. Gould. 1992. Potential oxyradical damage and energy status in individual muscle fibres from degenerating muscle diseases. *Neuromuscul Disord* 2:27-33.

## -B-

- Backman,E., E.Nylander, I.Johansson, K.G.Henriksson, and C.Tagesson. 1988. Selenium and vitamin E treatment of Duchenne muscular dystrophy: no effect on muscle function. *Acta Neurol Scand* 78:429-435.
- Bakker,A.J., S.I.Head, D.A.Williams, and D.G.Stephenson. 1993. Ca<sup>2+</sup> levels in myotubes grown from the skeletal muscle of dystrophic (mdx) and normal mice. *J Physiol* 460:1-13.
- Balghi,H., S.Seuille, B.Constantin, S.Patri, V.Thoreau, L.Mondin, E.Mok, A.Kitzis, G.Raymond, and C.Cognard. 2006a. Mini-dystrophin expression down-regulates overactivation of G protein-mediated IP<sub>3</sub> signaling pathway in dystrophin-deficient muscle cells. *J Gen Physiol* 127:171-182.
- Balghi,H., S.Seuille, L.Mondin, A.Canterreau, B.Constantin, G.Raymond, and C.Cognard. 2006b. Mini-dystrophin expression down-regulates IP<sub>3</sub>-mediated calcium release events in resting dystrophin-deficient muscle cells. *J Gen Physiol* 128:219-230.
- Balnave,C.D. and D.G.Allen. 1998. Evidence for Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *Am J Physiol* 274:C940-C946.
- Barlow,C.A., P.Rose, R.A.Pulver-Kaste, and K.M.Lounsbury. 2006. Excitation-transcription coupling in smooth muscle. *J Physiol* 570:59-64.
- Barr,P.J. and L.D.Tomei. 1994. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)* 12:487-493.
- Barton,E.R., L.Morris, A.Musaro, N.Rosenthal, and H.L.Sweeney. 2002. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 157:137-148.
- Barton-Davis,E.R., L.Cordier, D.I.Shoturma, S.E.Leland, and H.L.Sweeney. 1999. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 104:375-381.
- Beam,K.G. and C.M.Knudson. 1988. Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol* 91:781-798.
- Beauchamp,J.R., J.E.Morgan, C.N.Pagel, and T.A.Partridge. 1999. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 144:1113-1122.
- Becker,P.E. and F.Kiener. 1955. [A new x-chromosomal muscular dystrophy.]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* 193:427-448.
- Berchtold,M.W., H.Brinkmeier, and M.Muntener. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80:1215-1265.
- Berridge,M.J. and R.F.Irvine. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-321.
- Berridge,M.J., P.Lipp, and M.D.Bootman. 2000. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 287:1604-1605.

- Bertorini, T.E., S.K. Bhattacharya, G.M. Palmieri, C.M. Chesney, D. Pifer, and B. Baker. 1982. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 32:1088-1092.
- Bhat, M.B., J. Zhao, H. Takeshima, and J. Ma. 1997. Functional calcium release channel formed by the carboxyl-terminal portion of ryanodine receptor. *Biophys J* 73:1329-1336.
- Bijlenga, P., J.H. Liu, E. Espinos, C.A. Haenggeli, J. Fischer-Lougheed, C.R. Bader, and L. Bernheim. 2000. T-type alpha 1H Ca<sup>2+</sup> channels are involved in Ca<sup>2+</sup> signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7627-7632.
- Billaud, E.M. 2000. Clinical pharmacology of immunosuppressive drugs: year 2000--time for alternatives. *Therapie* 55:177-183.
- Biswas, G., H.K. Anandatheerthavarada, M. Zaidi, and N.G. Avadhani. 2003. Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkappaBbeta. *J Cell Biol* 161:507-519.
- Blake, D.J., J.M. Tinsley, and K.E. Davies. 1996. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol* 6:37-47.
- Blake, D.J., A. Weir, S.E. Newey, and K.E. Davies. 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82:291-329.
- Block, B.A., T. Imagawa, K.P. Campbell, and C. Franzini-Armstrong. 1988. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 107:2587-2600.
- Bodensteiner, J.B. and A.G. Engel. 1978. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 28:439-446.
- Boehning, D. and S.K. Joseph. 2000. Direct association of ligand-binding and pore domains in homo- and heterotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *EMBO J* 19:5450-5459.
- Boehning, D., D.O. Mak, J.K. Foskett, and S.K. Joseph. 2001. Molecular determinants of ion permeation and selectivity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 276:13509-13512.
- Boehning, D., R.L. Patterson, L. Sedaghat, N.O. Glebova, T. Kurosaki, and S.H. Snyder. 2003. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5:1051-1061.
- Bogdanovich, S., T.O. Krag, E.R. Barton, L.D. Morris, L.A. Whittemore, R.S. Ahima, and T.S. Khurana. 2002. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420:418-421.
- Boittin, F.X., N. Macrez, G. Halet, and J. Mironneau. 1999. Norepinephrine-induced Ca(2+) waves depend on InsP(3) and ryanodine receptor activation in vascular myocytes. *Am J Physiol* 277:C139-C151.
- Bolton, T.B. 1979. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59:606-718.
- Bootman, M.D. and M.J. Berridge. 1995. The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83:675-678.

- Borsotto, M., J. Barhanin, M. Fosset, and M. Lazdunski. 1985. The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Purification and subunit composition. *J Biol Chem* 260:14255-14263.
- Bosanac, I., J.R. Alattia, T.K. Mal, J. Chan, S. Talarico, F.K. Tong, K.I. Tong, F. Yoshikawa, T. Furuichi, M. Iwai, T. Michikawa, K. Mikoshiba, and M. Ikura. 2002. Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature* 420:696-700.
- Bosher, J.M. and M. Labouesse. 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2:E31-E36.
- Bradley, W.G. and J.J. Fulthorpe. 1978. Studies of sarcolemmal integrity in myopathic muscle. *Neurology* 28:670-677.
- Brillantes, A.B., K. Ondrias, A. Scott, E. Kobrinisky, E. Ondriasova, M.C. Moschella, T. Jayaraman, M. Landers, B.E. Ehrlich, and A.R. Marks. 1994. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77:513-523.
- Brochet, D.X., D. Yang, A. Di Maio, W.J. Lederer, C. Franzini-Armstrong, and H. Cheng. 2005. Ca<sup>2+</sup> blinks: rapid nanoscopic store calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3099-3104.
- Brum, G., A. Gonzalez, J. Rengifo, N. Shirokova, and E. Rios. 2000. Fast imaging in two dimensions resolves extensive sources of Ca<sup>2+</sup> sparks in frog skeletal muscle. *J Physiol* 528:419-433.
- Buck, E., I. Zimanyi, J.J. Abramson, and I.N. Pessah. 1992. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* 267:23560-23567.
- Buetler, T.M., M. Renard, E.A. Offord, H. Schneider, and U.T. Ruegg. 2002. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. *Am J Clin Nutr* 75:749-753.
- Bull, R. and J.J. Marengo. 1993. Sarcoplasmic reticulum release channels from frog skeletal muscle display two types of calcium dependence. *FEBS Lett* 331:223-227.
- Byers, T.J., L.M. Kunkel, and S.C. Watkins. 1991. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol* 115:411-421.

-C-

- Cai, D., J.D. Frantz, N.E. Tawa, Jr., P.A. Melendez, B.C. Oh, H.G. Lidov, P.O. Hasselgren, W.R. Frontera, J. Lee, D.J. Glass, and S.E. Shoelson. 2004. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119:285-298.
- Callaway, C., A. Seryshev, J.P. Wang, K.J. Slavik, D.H. Needleman, C. Cantu, III, Y. Wu, T. Jayaraman, A.R. Marks, and S.L. Hamilton. 1994. Localization of the high and low affinity [3H]ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Biol Chem* 269:15876-15884.
- Cameron, A.M., F.C. Nucifora, Jr., E.T. Fung, D.J. Livingston, R.A. Aldape, C.A. Ross, and S.H. Snyder. 1997. FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J Biol Chem* 272:27582-27588.

- Cameron,A.M., J.P.Steiner, A.J.Roskams, S.M.Ali, G.V.Ronnett, and S.H.Snyder. 1995. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca<sup>2+</sup> flux. *Cell* 83:463-472.
- Campbell,K.P., A.T.Leung, and T.Imagawa. 1988. Structural characterization of the nitrendipine receptor of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel: evidence for a 52,000 dalton subunit. *J Cardiovasc Pharmacol* 12 Suppl 4:S86-S90.
- Carr,C., G.D.Fischbach, and J.B.Cohen. 1989. A novel 87,000-Mr protein associated with acetylcholine receptors in Torpedo electric organ and vertebrate skeletal muscle. *J Cell Biol* 109:1753-1764.
- Carrasco,M.A. and S.Figueroa. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in frog skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 110:747-753.
- Carrasco,M.A., K.Magendzo, E.Jaimovich, and C.Hidalgo. 1988. Calcium modulation of phosphoinositide kinases in transverse tubule vesicles from frog skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 262:360-366.
- Carrasco,M.A., N.Riveros, J.Rios, M.Muller, F.Torres, J.Pineda, S.Lantadilla, and E.Jaimovich. 2003. Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1438-C1447.
- Carroll,S.L., M.G.Klein, and M.F.Schneider. 1997. Decay of calcium transients after electrical stimulation in rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres. *J Physiol* 501 ( Pt 3):573-588.
- Castonguay,A. and R.Robitaille. 2002. Xestospongine C is a potent inhibitor of SERCA at a vertebrate synapse. *Cell Calcium* 32:39-47.
- Chandler,W.K., R.F.Rakowski, and M.F.Schneider. 1976. Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *J Physiol* 254:285-316.
- Chandler,W.K. and M.F.Schneider. 1976. Time-course of potential spread along a skeletal muscle fiber under voltage clamp. *J Gen Physiol* 67:165-184.
- Cheng,H. and W.J.Lederer. 2008. Calcium sparks. *Physiol Rev* 88:1491-1545.
- Cheng,H., W.J.Lederer, and M.B.Cannell. 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262:740-744.
- Ching,L.L., A.J.Williams, and R.Sitsapesan. 2000. Evidence for Ca(2+) activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circ Res* 87:201-206.
- Cognard,C., B.Constantin, M.Rivet, N.Imbert, C.Besse, and G.Raymond. 1992a. Excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle cells: evolution during in vitro myogenesis. *Adv Exp Med Biol* 311:73-89.
- Cognard,C., M.Lazdunski, and G.Romey. 1986. Different types of Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:517-521.
- Cognard,C., M.Rivet-Bastide, B.Constantin, and G.Raymond. 1992b. Progressive predominance of 'skeletal' versus 'cardiac' types of excitation-contraction coupling during in vitro skeletal myogenesis. *Pflugers Arch* 422:207-209.

- Collet,C., B.Allard, Y.Tourneur, and V.Jacquemond. 1999. Intracellular calcium signals measured with indo-1 in isolated skeletal muscle fibres from control and mdx mice. *J Physiol* 520 Pt 2:417-429.
- Conklin,M.W., C.A.Ahern, P.Vallejo, V.Sorrentino, H.Takeshima, and R.Coronado. 2000. Comparison of Ca(2+) sparks produced independently by two ryanodine receptor isoforms (type 1 or type 3). *Biophys J* 78:1777-1785.
- Constantin,B., S.Seuille, and C.Cognard. 2006. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J Muscle Res Cell Motil* 27:375-386.
- Cooper,B.J. 1989. Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull* 45:703-718.
- Cosens,D.J. and A.Manning. 1969. Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature* 224:285-287.
- Crabtree,G.R. and N.A.Clipstone. 1994. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63:1045-1083.
- Crosbie,R.H., J.Heighway, D.P.Venzke, J.C.Lee, and K.P.Campbell. 1997. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 272:31221-31224.
- Csernoch,L. 2007. Sparks and embers of skeletal muscle: the exciting events of contractile activation. *Pflugers Arch* 454:869-878.
- Csernoch,L., J.Zhou, M.D.Stern, G.Brum, and E.Rios. 2004. The elementary events of Ca<sup>2+</sup> release elicited by membrane depolarization in mammalian muscle. *J Physiol* 557:43-58.
- Cullen,P.J., J.G.Comerford, and A.P.Dawson. 1988. Heparin inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release from rat liver microsomes. *FEBS Lett* 228:57-59.
- Culligan,K., N.Banville, P.Dowling, and K.Ohlendieck. 2002. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. *J Appl Physiol* 92:435-445.

-D-

- Danoff,S.K., S.Supattapone, and S.H.Snyder. 1988. Characterization of a membrane protein from brain mediating the inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding by calcium. *Biochem J* 254:701-705.
- De La,P.S., S.Morin, and J.Koenig. 1999. Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int Rev Cytol* 191:99-148.
- De Smedt,F., B.Verjans, P.Mailleux, and C.Erneux. 1994. Cloning and expression of human brain type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. High levels of mRNA in cerebellar Purkinje cells. *FEBS Lett* 347:69-72.

- De Smedt,H., L.Missiaen, J.B.Parys, R.H.Henning, I.Sienaert, S.Vanlingen, A.Gijsens, B.Himpens, and R.Casteels. 1997. Isoform diversity of the inositol trisphosphate receptor in cell types of mouse origin. *Biochem J* 322 ( Pt 2):575-583.
- De Smet,P., J.B.Parys, G.Callewaert, A.F.Weidema, E.Hill, H.De Smedt, C.Erneux, V.Sorrentino, and L.Missiaen. 1999. Xestospongine C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca(2+) pumps. *Cell Calcium* 26:9-13.
- De Waard,M., V.E.Scott, M.Pragnell, and K.P.Campbell. 1996. Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett* 380:272-276.
- Deconinck,A.E., J.A.Rafael, J.A.Skinner, S.C.Brown, A.C.Potter, L.Metzinger, D.J.Watt, J.G.Dickson, J.M.Tinsley, and K.E.Davies. 1997. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:717-727.
- Deconinck,N. and B.Dan. 2007. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol* 36:1-7.
- Deconinck,N., T.Ragot, G.Marechal, M.Perricaudet, and J.M.Gillis. 1996. Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3570-3574.
- Delaughter,M.C., G.E.Taffet, M.L.Fiorotto, M.L.Entman, and R.J.Schwartz. 1999. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. *FASEB J* 13:1923-1929.
- Demaurex,N., D.P.Lew, and K.H.Krause. 1992. Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J Biol Chem* 267:2318-2324.
- Deval,E., D.O.Levitsky, E.Marchand, A.Canterneau, G.Raymond, and C.Cognard. 2002. Na(+)/Ca(2+) exchange in human myotubes: intracellular calcium rises in response to external sodium depletion are enhanced in DMD. *Neuromuscul Disord* 12:665-673.
- DiMario,J.X., A.Uzman, and R.C.Strohman. 1991. Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle. *Dev Biol* 148:314-321.
- Disatnik,M.H., J.Dhawan, Y.Yu, M.F.Beal, M.M.Whirl, A.A.Franco, and T.A.Rando. 1998. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci* 161:77-84.
- Divet,A. and C.Huchet-Cadiou. 2002. Sarcoplasmic reticulum function in slow- and fast-twitch skeletal muscles from mdx mice. *Pflugers Arch* 444:634-643.
- Divet,A., A.M.Lompre, and C.Huchet-Cadiou. 2005. Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, on skeletal muscles from normal and mdx mice. *Acta Physiol Scand* 184:173-186.
- Donoso,P. and C.Hidalgo. 1989. Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 978:8-16.
- Donoso,P., H.Prieto, and C.Hidalgo. 1995. Luminal calcium regulates calcium release in triads isolated from frog and rabbit skeletal muscle. *Biophys J* 68:507-515.

- Doran,P., P.Dowling, J.Lohan, K.McDonnell, S.Poetsch, and K.Ohrendieck. 2004. Subproteomics analysis of Ca<sup>+</sup>-binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem* 271:3943-3952.
- Du,G.G., B.Sandhu, V.K.Khanna, X.H.Guo, and D.H.MacLennan. 2002. Topology of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16725-16730.
- Dunckley,M.G., M.Manoharan, P.Villiet, I.C.Eperon, and G.Dickson. 1998. Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet* 7:1083-1090.
- Dunn,S.E., J.L.Burns, and R.N.Michel. 1999. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem* 274:21908-21912.
- Dziadek,M.A. and L.S.Johnstone. 2007. Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium* 42:123-132.
- E-**
- Echevarria,W., M.F.Leite, M.T.Guerra, W.R.Zipfel, and M.H.Nathanson. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5:440-446.
- el Hayek,R., A.J.Lokuta, C.Arevalo, and H.H.Valdivia. 1995. Peptide probe of ryanodine receptor function. Imperatoxin A, a peptide from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, selectively activates skeletal-type ryanodine receptor isoforms. *J Biol Chem* 270:28696-28704.
- Ellis,S.B., M.E.Williams, N.R.Ways, R.Brenner, A.H.Sharp, A.T.Leung, K.P.Campbell, E.McKenna, W.J.Koch, A.Hui, and . 1988. Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241:1661-1664.
- Ellis-Davies,G.C. and J.H.Kaplan. 1994. Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca<sup>2+</sup> with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:187-191.
- Emery,A.E. 1993. Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease. *Neuromuscul Disord* 3:263-266.
- Enan,E. and F.Matsumura. 1992. Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochem Pharmacol* 43:1777-1784.
- Endo,M. 1977. [Role of calcium ion in myocardial contraction]. *Nippon Rinsho* 35:9-14.
- Engert,J.C., E.B.Berglund, and N.Rosenthal. 1996. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol* 135:431-440.
- England,S.B., L.V.Nicholson, M.A.Johnson, S.M.Forrest, D.R.Love, E.E.Zubrzycka-Gaarn, D.E.Bulman, J.B.Harris, and K.E.Davies. 1990. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343:180-182.
- Estrada,M., C.Cardenas, J.L.Liberona, M.A.Carrasco, G.A.Mignery, P.D.Allen, and E.Jaimovich. 2001. Calcium transients in 1B5 myotubes lacking ryanodine receptors are related to inositol trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 276:22868-22874.

## -F-

- Fabb, S.A., D.J. Wells, P. Serpente, and G. Dickson. 2002. Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet* 11:733-741.
- Fabiato, A. 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 245:C1-14.
- Farah, C.S. and F.C. Reinach. 1995. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J* 9:755-767.
- Felder, E. and C. Franzini-Armstrong. 2002. Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1695-1700.
- Felix, R., C.A. Gurnett, M. De Waard, and K.P. Campbell. 1997. Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 2 $\delta$  subunit. *J Neurosci* 17:6884-6891.
- Fenichel, G.M., M.H. Brooke, R.C. Griggs, J.R. Mendell, J.P. Miller, R.T. Moxley, III, J.H. Park, M.A. Provine, J. Florence, K.K. Kaiser, and . 1988. Clinical investigation in Duchenne muscular dystrophy: penicillamine and vitamin E. *Muscle Nerve* 11:1164-1168.
- Ferrari, G. and F. Mavilio. 2002. Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1:S7-10.
- Ferris, C.D., A.M. Cameron, D.S. Bredt, R.L. Haganir, and S.H. Snyder. 1991a. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589. *Biochem Biophys Res Commun* 175:192-198.
- Ferris, C.D., R.L. Haganir, D.S. Bredt, A.M. Cameron, and S.H. Snyder. 1991b. Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2232-2235.
- Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, and A. Rao. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179-185.
- Fill, M. and J.A. Copello. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82:893-922.
- Fisher, R., J.M. Tinsley, S.R. Phelps, S.E. Squire, E.R. Townsend, J.E. Martin, and K.E. Davies. 2001. Non-toxic ubiquitous over-expression of utrophin in the mdx mouse. *Neuromuscul Disord* 11:713-721.
- Florence, J.M., P.T. Fox, G.J. Planer, and M.H. Brooke. 1985. Activity, creatine kinase, and myoglobin in Duchenne muscular dystrophy: a clue to etiology? *Neurology* 35:758-761.
- Flucher, B.E., A. Conti, H. Takeshima, and V. Sorrentino. 1999. Type 3 and type 1 ryanodine receptors are localized in triads of the same mammalian skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 146:621-630.
- Fohr, U.G., B.R. Weber, M. Muntener, W. Staudenmann, G.J. Hughes, S. Frutiger, D. Banville, B.W. Schafer, and C.W. Heizmann. 1993. Human alpha and beta parvalbumins. Structure and tissue-specific expression. *Eur J Biochem* 215:719-727.

- Fong,P.Y., P.R.Turner, W.F.Denetclaw, and R.A.Steinhardt. 1990. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 250:673-676.
- Fosset,M., E.Jaimovich, E.Delpont, and M.Lazdunski. 1983. [3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J Biol Chem* 258:6086-6092.
- Franco,A., Jr. and J.B.Lansman. 1990. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 344:670-673.
- Franco-Obregon,A., Jr. and J.B.Lansman. 1994. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol* 481 ( Pt 2):299-309.
- Friedrich,O., M.Both, J.M.Gillis, J.S.Chamberlain, and R.H.Fink. 2004. Mini-dystrophin restores L-type calcium currents in skeletal muscle of transgenic mdx mice. *J Physiol* 555:251-265.
- Fritz,N., N.Macrez, J.Mironneau, L.H.Jeyakumar, S.Fleischer, and J.L.Morel. 2005. Ryanodine receptor subtype 2 encodes Ca<sup>2+</sup> oscillations activated by acetylcholine via the M2 muscarinic receptor/cADP-ribose signalling pathway in duodenum myocytes. *J Cell Sci* 118:2261-2270.
- Fruen,B.R., J.M.Bardy, T.M.Byrem, G.M.Strasburg, and C.F.Louis. 2000. Differential Ca(2+) sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C724-C733.
- Fuchtbauer,E.M., A.M.Rowlerson, K.Gotz, G.Friedrich, K.Mabuchi, J.Gergely, and H.Jockusch. 1991. Direct correlation of parvalbumin levels with myosin isoforms and succinate dehydrogenase activity on frozen sections of rodent muscle. *J Histochem Cytochem* 39:355-361.
- Fucile,S. 2004. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35:1-8.
- Furuichi,T., S.Yoshikawa, A.Miyawaki, K.Wada, N.Maeda, and K.Mikoshiha. 1989. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 342:32-38.
- Futatsugi,A., G.Kuwajima, and K.Mikoshiha. 1995. Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing in mouse skeletal muscle ryanodine receptor mRNA. *Biochem J* 305 ( Pt 2):373-378.

-G-

- Gafni,J., J.A.Munsch, T.H.Lam, M.C.Catlin, L.G.Costa, T.F.Molinski, and I.N.Pessah. 1997. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19:723-733.
- Gailly,P., B.Boland, B.Himpens, R.Casteels, and J.M.Gillis. 1993. Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice. *Cell Calcium* 14:473-483.
- Gaschen,F.P., E.P.Hoffman, J.R.Gorospe, E.W.Uhl, D.F.Senior, G.H.Cardinet, III, and L.K.Pearce. 1992. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci* 110:149-159.

- Genazzani, A.A., E. Carafoli, and D. Guerini. 1999. Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5797-5801.
- Ghosh, T.K., P.S. Eis, J.M. Mullaney, C.L. Ebert, and D.L. Gill. 1988. Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin. *J Biol Chem* 263:11075-11079.
- Gilibert, J.A. and A.B. Parekh. 2000. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *EMBO J* 19:6401-6407.
- Goll, A., D.R. Ferry, and H. Glossmann. 1983. Target size analysis of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> channels. Positive allosteric heterotropic regulation by d-cis-diltiazem is associated with apparent channel oligomer dissociation. *FEBS Lett* 157:63-69.
- Gonzalez, A., W.G. Kirsch, N. Shirokova, G. Pizarro, M.D. Stern, and E. Rios. 2000. The spark and its ember: separately gated local components of Ca(2+) release in skeletal muscle. *J Gen Physiol* 115:139-158.
- Gonzalez, D.L.F., J.P. Savineau, and R. Marthan. 1995. Control of pulmonary vascular smooth muscle tone by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump blockers: thapsigargin and cyclopiazonic acid. *Pflugers Arch* 429:617-624.
- Gordienko, D.V. and T.B. Bolton. 2002. Crosstalk between ryanodine receptors and IP(3) receptors as a factor shaping spontaneous Ca(2+)-release events in rabbit portal vein myocytes. *J Physiol* 542:743-762.
- Gordienko, D.V., T.B. Bolton, and M.B. Cannell. 1998. Variability in spontaneous subcellular calcium release in guinea-pig ileum smooth muscle cells. *J Physiol* 507 ( Pt 3):707-720.
- Goyenvalle, A., A. Vulin, F. Fougereuse, F. Leturcq, J.C. Kaplan, L. Garcia, and O. Danos. 2004. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306:1796-1799.
- Grady, R.M., H. Teng, M.C. Nichol, J.C. Cunningham, R.S. Wilkinson, and J.R. Sanes. 1997. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:729-738.
- Green, D.R. and J.C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Grimm, S. and P.A. Baeuerle. 1993. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 290 ( Pt 2):297-308.
- Grounds, M.D. and J.K. McGeachie. 1992. Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic mdx mice: an autoradiographic study. *Muscle Nerve* 15:580-586.
- Guerette, B., D. Skuk, F. Celestin, C. Huard, F. Tardif, I. Asselin, B. Roy, M. Goulet, R. Roy, M. Entman, and J.P. Tremblay. 1997. Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol* 159:2522-2531.
- Guharay, F. and F. Sachs. 1984. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol* 352:685-701.
- Guibert, C., T. Ducret, and J.P. Savineau. 2008. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 98:10-23.

Guo,R.W. and L.Huang. 2008. New insights into the activation mechanism of store-operated calcium channels: roles of STIM and Orai. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:591-601.

Gurnett,C.A., M.De Waard, and K.P.Campbell. 1996. Dual function of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16:431-440.

-H-

Hakamata,Y., J.Nakai, H.Takeshima, and K.Imoto. 1992. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 312:229-235.

Hamada,K., T.Miyata, K.Mayanagi, J.Hirota, and K.Mikoshiha. 2002. Two-state conformational changes in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulated by calcium. *J Biol Chem* 277:21115-21118.

Hamilton,S.L. and I.I.Serysheva. 2009. Ryanodine receptor structure: progress and challenges. *J Biol Chem* 284:4047-4051.

Hardiman,O., R.M.Sklar, and R.H.Brown, Jr. 1993. Methylprednisolone selectively affects dystrophin expression in human muscle cultures. *Neurology* 43:342-345.

Haslett,J.N., D.Sanoudou, A.T.Kho, R.R.Bennett, S.A.Greenberg, I.S.Kohane, A.H.Beggs, and L.M.Kunkel. 2002. Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15000-15005.

Held,B., D.Freise, M.Freichel, M.Hoth, and V.Flockerzi. 2002. Skeletal muscle L-type Ca(2+) current modulation in gamma1-deficient and wildtype murine myotubes by the gamma1 subunit and cAMP. *J Physiol* 539:459-468.

HENROTTE,J.G. 1952. A crystalline constituent from myogen of carp muscles. *Nature* 169:968-969.

Hoffman,E.P., R.H.Brown, Jr., and L.M.Kunkel. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928.

Hofmann,F., L.Lacinova, and N.Klugbauer. 1999. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139:33-87.

Hogan,P.G., L.Chen, J.Nardone, and A.Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17:2205-2232.

Holda,J.R. and L.A.Blatter. 1997. Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett* 403:191-196.

Hopf,F.W., P.R.Turner, W.F.Denetclaw, Jr., P.Reddy, and R.A.Steinhardt. 1996. A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am J Physiol* 271:C1325-C1339.

Hoth,M., C.M.Fanger, and R.S.Lewis. 1997. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137:633-648.

- Huang,G.N., W.Zeng, J.Y.Kim, J.P.Yuan, L.Han, S.Muallem, and P.F.Worley. 2006. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 8:1003-1010.
- Hubert, F. 2009. Etude de la dépendance au voltage des libérations calciques dans les cellules déficientes en dystrophine.
- Hui,C.S., K.R.Bidasee, and H.R.Besch, Jr. 2001. Effects of ryanodine on calcium sparks in cut twitch fibres of *Rana temporaria*. *J Physiol* 534:327-342.
- Hunter,M.I. and J.B.Mohamed. 1986. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta* 155:123-131.
- Hunter,R.B., E.Stevenson, A.Koncarevic, H.Mitchell-Felton, D.A.Essig, and S.C.Kandarian. 2002. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J* 16:529-538.
- Hutter,O.F., F.L.Burton, and D.L.Bovell. 1991. Mechanical properties of normal and mdx mouse sarcolemma: bearing on function of dystrophin. *J Muscle Res Cell Motil* 12:585-589.

-I-

- Iino,M. and M.Endo. 1992. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Nature* 360:76-78.
- Imbert,N., C.Cognard, G.Duport, C.Guillou, and G.Raymond. 1995. Abnormal calcium homeostasis in Duchenne muscular dystrophy myotubes contracting in vitro. *Cell Calcium* 18:177-186.
- Imbert,N., C.Vandebrouck, G.Duport, G.Raymond, A.A.Hassoni, B.Constantin, M.J.Cullen, and C.Cognard. 2001. Calcium currents and transients in co-cultured contracting normal and Duchenne muscular dystrophy human myotubes. *J Physiol* 534:343-355.
- Inesi,G. and Y.Sagara. 1994. Specific inhibitors of intracellular Ca<sup>2+</sup> transport ATPases. *J Membr Biol* 141:1-6.
- Irvine,R.F. 1990. 'Quantal' Ca<sup>2+</sup> release and the control of Ca<sup>2+</sup> entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* 263:5-9.
- Isaeva,E.V. and N.Shirokova. 2003. Metabolic regulation of Ca<sup>2+</sup> release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres. *J Physiol* 547:453-462.

-J-

- Jackson,M.J., D.A.Jones, and R.H.Edwards. 1985. Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta* 147:215-221.

- Jaggari, J.H., A.S. Stevenson, and M.T. Nelson. 1998. Voltage dependence of Ca<sup>2+</sup> sparks in intact cerebral arteries. *Am J Physiol* 274:C1755-C1761.
- Jaimovich, E. and M.A. Carrasco. 2002. IP<sub>3</sub> dependent Ca<sup>2+</sup> signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. *Biol Res* 35:195-202.
- Jaimovich, E., R. Reyes, J.L. Liberona, and J.A. Powell. 2000. IP<sub>3</sub> receptors, IP<sub>3</sub> transients, and nucleus-associated Ca<sup>2+</sup> signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C998-C1010.
- Jaimovich, E. and E. Rojas. 1994. Intracellular Ca<sup>2+</sup> transients induced by high external K<sup>+</sup> and tetracaine in cultured rat myotubes. *Cell Calcium* 15:356-368.
- Jay, S.D., S.B. Ellis, A.F. McCue, M.E. Williams, T.S. Vedvick, M.M. Harpold, and K.P. Campbell. 1990. Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248:490-492.
- Jayaraman, T., A.M. Brillantes, A.P. Timerman, S. Fleischer, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and A.R. Marks. 1992. FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 267:9474-9477.
- Jenden, D.J. and A.S. Fairhurst. 1969. The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol Rev* 21:1-25.
- Jiang, Q.X., E.C. Throver, D.W. Chester, B.E. Ehrlich, and F.J. Sigworth. 2002. Three-dimensional structure of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at 2.4 Å resolution. *EMBO J* 21:3575-3581.
- Johnson, B.D., T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2005. Convergent regulation of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> channels by dystrophin, the actin cytoskeleton, and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4191-4196.
- Jung, D., B. Yang, J. Meyer, J.S. Chamberlain, and K.P. Campbell. 1995. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* 270:27305-27310.

---

-K-

- Kaftan, E., A.R. Marks, and B.E. Ehrlich. 1996. Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup>-release channels from cardiac muscle. *Circ Res* 78:990-997.
- Kargacin, M.E. and G.J. Kargacin. 1996. The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. *Biochim Biophys Acta* 1290:4-8.
- Kasri, N.N., K. Torok, A. Galione, C. Garnham, G. Callewaert, L. Missiaen, J.B. Parys, and H. De Smedt. 2006. Endogenously bound calmodulin is essential for the function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 281:8332-8338.
- Kerr, L.D., J. Inoue, N. Davis, E. Link, P.A. Baeuerle, H.R. Bose, Jr., and I.M. Verma. 1991. The re-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF-kappa B: relationship with I kappa B beta and regulation by phosphorylation. *Genes Dev* 5:1464-1476.

- Khammari,A., Y.Pereon, S.Baudet, and J.Noireaud. 1998. In situ study of the sarcoplasmic reticulum function in control and mdx mouse diaphragm muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 76:1161-1165.
- Khan,A.A., J.P.Steiner, and S.H.Snyder. 1992. Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptor of lymphocytes: selective enrichment in sialic acid and unique binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2849-2853.
- Kirsch,W.G., D.Uttenweiler, and R.H.Fink. 2001. Spark- and ember-like elementary Ca<sup>2+</sup> release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 537:379-389.
- Klee,C.B., T.H.Crouch, and M.H.Krinks. 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6270-6273.
- Klee,C.B. and M.H.Krinks. 1978. Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* 17:120-126.
- Klein,M.G., H.Cheng, L.F.Santana, Y.H.Jiang, W.J.Lederer, and M.F.Schneider. 1996. Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature* 379:455-458.
- Koenig,M., E.P.Hoffman, C.J.Bertelson, A.P.Monaco, C.Feener, and L.M.Kunkel. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517.
- Koenig,M., A.P.Monaco, and L.M.Kunkel. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-228.
- Kuemmerle,J.F. and G.M.Makhlouf. 1995. Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca(2+)-induced Ca<sup>2+</sup> release in intestinal longitudinal muscle. *J Biol Chem* 270:25488-25494.

-L-

- Lacampagne,A., W.J.Lederer, M.F.Schneider, and M.G.Klein. 1996. Repriming and activation alter the frequency of stereotyped discrete Ca<sup>2+</sup> release events in frog skeletal muscle. *J Physiol* 497 ( Pt 3):581-588.
- Lacinova,L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1:1-78.
- Lai,F.A., K.Anderson, E.Rousseau, Q.Y.Liu, and G.Meissner. 1988. Evidence for a Ca<sup>2+</sup> channel within the ryanodine receptor complex from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 151:441-449.
- Lamb,G.D. and M.A.Cellini. 1999. High intracellular [Ca<sup>2+</sup>] alters sarcoplasmic reticulum function in skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 519 Pt 3:815-827.
- Landi,N., P.Nassi, G.Liguri, S.Bobbi, C.Sbrilli, and G.Marconi. 1986. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and acylphosphatase activities in muscle biopsies from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta* 158:245-251.

- Launikonis, B.S., J.Zhou, L.Royer, T.R.Shannon, G.Brum, and E.Rios. 2006. Depletion "skraps" and dynamic buffering inside the cellular calcium store. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2982-2987.
- Laver, D.R., T.M.Baynes, and A.F.Dulhunty. 1997. Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: evidence for two independent mechanisms. *J Membr Biol* 156:213-229.
- Ledbetter, M.W., J.K.Preiner, C.F.Louis, and J.R.Mickelson. 1994. Tissue distribution of ryanodine receptor isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 269:31544-31551.
- Leijendekker, W.J., A.C.Passaquin, L.Metzinger, and U.T.Ruegg. 1996. Regulation of cytosolic calcium in skeletal muscle cells of the mdx mouse under conditions of stress. *Br J Pharmacol* 118:611-616.
- Leite, M.F., E.C.Thrower, W.Echevarria, P.Koulen, K.Hirata, A.M.Bennett, B.E.Ehrlich, and M.H.Nathanson. 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2975-2980.
- Lenk, U., R.Hanke, U.Kraft, K.Grade, I.Grunewald, and A.Speer. 1993. Non-isotopic analysis of single strand conformation polymorphism (SSCP) in the exon 13 region of the human dystrophin gene. *J Med Genet* 30:951-954.
- Leong, P. and D.H.MacLennan. 1998. A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 273:7791-7794.
- Leung, A.T., T.Imagawa, B.Block, C.Franzini-Armstrong, and K.P.Campbell. 1988. Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. *J Biol Chem* 263:994-1001.
- Lev, A.A., C.C.Feener, L.M.Kunkel, and R.H.Brown, Jr. 1987. Expression of the Duchenne's muscular dystrophy gene in cultured muscle cells. *J Biol Chem* 262:15817-15820.
- Li, Q. and I.M.Verma. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734.
- Liberona, J.L., J.A.Powell, S.Shenoj, L.Petherbridge, R.Caviedes, and E.Jaimovich. 1998. Differences in both inositol 1,4,5-trisphosphate mass and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors between normal and dystrophic skeletal muscle cell lines. *Muscle Nerve* 21:902-909.
- Lim, L.E. and K.P.Campbell. 1998. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 11:443-452.
- Lin, P., Y.Yao, R.Hofmeister, R.Y.Tsien, and M.G.Farquhar. 1999. Overexpression of CALNUP (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca<sup>2+</sup> storage in the Golgi. *J Cell Biol* 145:279-289.
- Liu, J., J.D.Farmer, Jr., W.S.Lane, J.Friedman, I.Weissman, and S.L.Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815.
- Liu, J.H., P.Bijlenga, T.Occhiodoro, J.Fischer-Lougheed, C.R.Bader, and L.Bernheim. 1999. Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents in human fusion-competent myoblasts. *Br J Pharmacol* 126:245-250.

- Lopez,J.J., G.M.Salido, J.A.Pariante, and J.A.Rosado. 2006. Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *J Biol Chem* 281:28254-28264.
- Love,D.R., D.F.Hill, G.Dickson, N.K.Spurr, B.C.Byth, R.F.Marsden, F.S.Walsh, Y.H.Edwards, and K.E.Davies. 1989. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339:55-58.
- Lowry,O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr, and R.J.Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lucas-Heron,B. 1996. Absence of a calmitine-specific protease inhibitor in skeletal muscle mitochondria of patients with Duchenne's muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 225:701-704.
- Lynch,G.S., R.T.Hinkle, and J.A.Faulkner. 2001. Force and power output of diaphragm muscle strips from mdx and control mice after clenbuterol treatment. *Neuromuscul Disord* 11:192-196.
- Lytton,J. 2007. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochem J* 406:365-382.

-M-

- MacLennan,D.H. 2000. Ca<sup>2+</sup> signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* 267:5291-5297.
- MacLennan,D.H., C.J.Brandl, B.Korczak, and N.M.Green. 1985. Amino-acid sequence of a Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316:696-700.
- Maeda,N., T.Kawasaki, S.Nakade, N.Yokota, T.Taguchi, M.Kasai, and K.Mikoshihba. 1991. Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *J Biol Chem* 266:1109-1116.
- Mak,D.O., S.McBride, and J.K.Foskett. 1999. ATP regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel gating by allosteric tuning of Ca(2+) activation. *J Biol Chem* 274:22231-22237.
- Marchand,E., B.Constantin, H.Balghi, M.C.Claudepierre, A.Cantereau, C.Magaud, A.Mouzou, G.Raymond, S.Braun, and C.Cognard. 2004. Improvement of calcium handling and changes in calcium-release properties after mini- or full-length dystrophin forced expression in cultured skeletal myotubes. *Exp Cell Res* 297:363-379.
- Marchand,E., B.Constantin, C.Vandebrouck, G.Raymond, and C.Cognard. 2001. Calcium homeostasis and cell death in Sol8 dystrophin-deficient cell line in culture. *Cell Calcium* 29:85-96.
- Marks,A.R., P.Tempst, K.S.Hwang, M.B.Taubman, M.Inui, C.Chadwick, S.Fleischer, and B.Nadal-Ginard. 1989. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8683-8687.

- Maruyama, T., T. Kanaji, S. Nakade, T. Kanno, and K. Mikoshiba. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem* 122:498-505.
- Marx, S.O., K. Ondrias, and A.R. Marks. 1998. Coupled gating between individual skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors). *Science* 281:818-821.
- Matter, N., M.F. Ritz, S. Freyermuth, P. Rogue, and A.N. Malviya. 1993. Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J Biol Chem* 268:732-736.
- Mayrleitner, M., A.P. Timerman, G. Wiederrecht, and S. Fleischer. 1994. The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein: effect of FKBP-12 on single channel activity of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Cell Calcium* 15:99-108.
- McCall, E., L. Li, H. Satoh, T.R. Shannon, L.A. Blatter, and D.M. Bers. 1996. Effects of FK-506 on contraction and Ca<sup>2+</sup> transients in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79:1110-1121.
- McCormack, J.G. and R.M. Denton. 1990. The role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and matrix Ca<sup>2+</sup> in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1018:287-291.
- Melzer, W., A. Herrmann-Frank, and H.C. Luttgau. 1995. The role of Ca<sup>2+</sup> ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta* 1241:59-116.
- Merlini, L., A. Cicognani, E. Malaspina, M. Gennari, S. Gnudi, B. Talim, and E. Franzoni. 2003. Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 27:222-227.
- Messina, S., A. Bitto, M. Aguenouz, L. Minutoli, M.C. Monici, D. Altavilla, F. Squadrito, and G. Vita. 2006. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp Neurol* 198:234-241.
- Mignery, G.A., P.A. Johnston, and T.C. Sudhof. 1992. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) binding to the cerebellar InsP<sub>3</sub> receptor. *J Biol Chem* 267:7450-7455.
- Mignery, G.A., C.L. Newton, B.T. Archer, III, and T.C. Sudhof. 1990. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 265:12679-12685.
- Mignery, G.A., T.C. Sudhof, K. Takei, and P. De Camilli. 1989. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342:192-195.
- Misra, U.K., G. Gawdi, and S.V. Pizzo. 1998. Cyclosporin A inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate binding to its receptors and release of calcium from intracellular stores in peritoneal macrophages. *J Immunol* 161:6122-6127.
- Missiaen, L., G. Callewaert, H. De Smedt, and J.B. Parys. 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca<sup>2+</sup> pump and the non-specific Ca<sup>2+</sup> leak from the non-mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 29:111-116.
- Missiaen, L., C.W. Taylor, and M.J. Berridge. 1991. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature* 352:241-244.
- Miyakawa, T., A. Maeda, T. Yamazawa, K. Hirose, T. Kurosaki, and M. Iino. 1999. Encoding of Ca<sup>2+</sup> signals by differential expression of IP<sub>3</sub> receptor subtypes. *EMBO J* 18:1303-1308.

- Miyakawa,T., A.Mizushima, K.Hirose, T.Yamazawa, I.Bezprozvanny, T.Kurosaki, and M.Iino. 2001. Ca(2+)-sensor region of IP(3) receptor controls intracellular Ca(2+) signaling. *EMBO J* 20:1674-1680.
- Moens,P., P.H.Baatsen, and G.Marechal. 1993. Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil* 14:446-451.
- Mokri,B. and A.G.Engel. 1975. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 25:1111-1120.
- Monaco,A.P. and L.M.Kunkel. 1988. Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Adv Hum Genet* 17:61-98.
- Monaco,A.P., R.L.Neve, C.Colletti-Feener, C.J.Bertelson, D.M.Kurnit, and L.M.Kunkel. 1986. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650.
- Mongini,T., D.Ghigo, C.Doriguzzi, F.Bussolino, G.Pescarmona, B.Pollo, D.Schiffer, and A.Bosia. 1988. Free cytoplasmic Ca<sup>++</sup> at rest and after cholinergic stimulus is increased in cultured muscle cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Neurology* 38:476-480.
- Monteith,G.R., Y.Wanigasekara, and B.D.Roufogalis. 1998. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *J Pharmacol Toxicol Methods* 40:183-190.
- Morales,J., A.Fierro, D.Benavente, C.Zehnder, M.Ferrario, L.Contreras, C.Herzog, and E.Buckel. 2007. Conversion from a calcineurin inhibitor-based immunosuppressive regimen to everolimus in renal transplant recipients: effect on renal function and proteinuria. *Transplant Proc* 39:591-593.
- Morel,J.L., F.Dabertrand, N.Fritz, M.Henaff, J.Mironneau, and N.Macrez. 2009. The decrease of expression of ryanodine receptor subtype 2 is reversed by gentamycin sulfate in vascular myocytes from mdx mouse. *J Cell Mol Med*.
- Moschella,M.C., J.Watras, T.Jayaraman, and A.R.Marks. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in skeletal muscle: differential expression in myofibres. *J Muscle Res Cell Motil* 16:390-400.
- Mourkioti,F., P.Kratsios, T.Luedde, Y.H.Song, P.DelaFontaine, R.Adami, V.Parente, R.Bottinelli, M.Pasparakis, and N.Rosenthal. 2006. Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest* 116:2945-2954.
- Mourkioti,F. and N.Rosenthal. 2008. NF-kappaB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *J Mol Med* 86:747-759.
- Mulle,C., P.Benoit, C.Pinset, M.Roa, and J.P.Changeux. 1988. Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5728-5732.

- Nakade,S., N.Maeda, and K.Mikoshiba. 1991. Involvement of the C-terminus of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in Ca<sup>2+</sup> release analysed using region-specific monoclonal antibodies. *Biochem J* 277 ( Pt 1):125-131.
- Nakagawa,T., H.Okano, T.Furuichi, J.Aruga, and K.Mikoshiba. 1991. The subtypes of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in a tissue-specific and developmentally specific manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6244-6248.
- Nakai,J., T.Imagawa, Y.Hakamat, M.Shigekawa, H.Takeshima, and S.Numata. 1990. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* 271:169-177.
- Nakai,J., N.Sekiguchi, T.A.Rando, P.D.Allen, and K.G.Beam. 1998. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 273:13403-13406.
- Nakayama,S., T.Yamashita, M.Konishi, H.Kazama, and S.Kokubun. 2004. P2Y-mediated Ca<sup>2+</sup> response is spatiotemporally graded and synchronized in sensory neurons: a two-photon photolysis study. *FASEB J* 18:1562-1564.
- Newey,S.E., M.A.Benson, C.P.Ponting, K.E.Davies, and D.J.Blake. 2000. Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol* 10:1295-1298.
- Niebroj-Dobosz,I., S.Kornguth, H.S.Schutta, and F.L.Siegel. 1989. Elevated calmodulin levels and reduced calmodulin-stimulated calcium-ATPase in Duchenne progressive muscular dystrophy. *Neurology* 39:1610-1614.
- Niggli,E., D.W.Piston, M.S.Kirby, H.Cheng, D.R.Sandison, W.W.Webb, and W.J.Lederer. 1994. A confocal laser scanning microscope designed for indicators with ultraviolet excitation wavelengths. *Am J Physiol* 266:C303-C310.
- Nishikura,K. 2001. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 107:415-418.
- Noguchi,H., M.Matsushita, T.Okitsu, A.Moriwaki, K.Tomizawa, S.Kang, S.T.Li, N.Kobayashi, S.Matsumoto, K.Tanaka, N.Tanaka, and H.Matsui. 2004. A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 10:305-309.
- North,A.J., B.Galazkiewicz, T.J.Byers, J.R.Glenney, Jr., and J.V.Small. 1993. Complementary distributions of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle. *J Cell Biol* 120:1159-1167.
- Novotny,I., F.Saleh, and R.Novotna. 1983. K<sup>+</sup> depolarization and phospholipid metabolism in frog sartorius muscle. *Gen Physiol Biophys* 2:329-337.
- Nudel,U., K.Robzyk, and D.Yaffe. 1988. Expression of the putative Duchenne muscular dystrophy gene in differentiated myogenic cell cultures and in the brain. *Nature* 331:635-638.
- O-
- Ong,H.L., X.Liu, K.Tsaneva-Atanasova, B.B.Singh, B.C.Bandyopadhyay, W.D.Swaim, J.T.Russell, R.S.Hegde, A.Sherman, and I.S.Ambudkar. 2007. Relocalization of STIM1 for activation of

store-operated Ca(2+) entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum Ca(2+) store. *J Biol Chem* 282:12176-12185.

Otsu,K., J.Fujii, M.Periasamy, M.Difilippantonio, M.Uppender, D.C.Ward, and D.H.MacLennan. 1993. Chromosome mapping of five human cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum protein genes. *Genomics* 17:507-509.

Otsu,K., H.F.Willard, V.K.Khanna, F.Zorzato, N.M.Green, and D.H.MacLennan. 1990. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265:13472-13483.

-P-

Passaquin,A.C., M.Renard, L.Kay, C.Challet, A.Mokhtarian, T.Wallimann, and U.T.Ruegg. 2002. Creatine supplementation reduces skeletal muscle degeneration and enhances mitochondrial function in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 12:174-182.

Pastoret,C. and A.Seuille. 1995. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve* 18:1147-1154.

Peppiatt,C.M., T.J.Collins, L.Mackenzie, S.J.Conway, A.B.Holmes, M.D.Bootman, M.J.Berridge, J.T.Seo, and H.L.Roderick. 2003. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium* 34:97-108.

Pestronk,A., I.M.Parhad, D.B.Drachman, and D.L.Price. 1982. Membrane myopathy: morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 5:209-214.

Peters,M.F., M.E.Adams, and S.C.Froehner. 1997. Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* 138:81-93.

Petrof,B.J., J.B.Shrager, H.H.Stedman, A.M.Kelly, and H.L.Sweeney. 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3710-3714.

Pouvreau,S., L.Royer, J.Yi, G.Brum, G.Meissner, E.Rios, and J.Zhou. 2007. Ca(2+) sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5235-5240.

Powell,J.A., M.A.Carrasco, D.S.Adams, B.Drouet, J.Rios, M.Muller, M.Estrada, and E.Jaimovich. 2001. IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* 114:3673-3683.

Powell,J.A., J.Molgo, D.S.Adams, C.Colasante, A.Williams, M.Bohlen, and E.Jaimovich. 2003. IP3 receptors and associated Ca<sup>2+</sup> signals localize to satellite cells and to components of the neuromuscular junction in skeletal muscle. *J Neurosci* 23:8185-8192.

Pragnell,M., M.De Waard, Y.Mori, T.Tanabe, T.P.Snutch, and K.P.Campbell. 1994. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 368:67-70.

- Prakriya,M., S.Feske, Y.Gwack, S.Srikanth, A.Rao, and P.G.Hogan. 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443:230-233.
- Pressmar,J., H.Brinkmeier, M.J.Seewald, T.Naumann, and R.Rudel. 1994. Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations are not elevated in resting cultured muscle from Duchenne (DMD) patients and in MDX mouse muscle fibres. *Pflugers Arch* 426:499-505.
- Prior,T.W. 1995. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin Lab Med* 15:927-941.
- Proenza,C., J.O'Brien, J.Nakai, S.Mukherjee, P.D.Allen, and K.G.Beam. 2002. Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the alpha(1S) (Ca(V)1.1) II-III loop. *J Biol Chem* 277:6530-6535.
- Protasi,F. 2002. Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci* 7:d650-d658.
- Pruchnic,R., B.Cao, Z.Q.Peterson, X.Xiao, J.Li, R.J.Samulski, M.Epperly, and J.Huard. 2000. The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers. *Hum Gene Ther* 11:521-536.
- Pulido,S.M., A.C.Passaquin, W.J.Leijendekker, C.Challet, T.Wallimann, and U.T.Ruegg. 1998. Creatine supplementation improves intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and survival in mdx skeletal muscle cells. *FEBS Lett* 439:357-362.
- Putney,J.W., Jr. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1-12.

---

-Q-

- Qi,Y., E.M.Ogunbunmi, E.A.Freund, A.P.Timerman, and S.Fleischer. 1998. FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *J Biol Chem* 273:34813-34819.

-R-

- Ragusa,R.J., C.K.Chow, and J.D.Porter. 1997. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7:379-386.
- Randriamampita,C. and R.Y.Tsien. 1993. Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* 364:809-814.
- Rao,A., C.Luo, and P.G.Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747.
- Reed,J.C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124:1-6.
- Reeves,J.P. and J.L.Sutko. 1983. Competitive interactions of sodium and calcium with the sodium-calcium exchange system of cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 258:3178-3182.

- Rentschler,S., H.Linn, K.Deininger, M.T.Bedford, X.Espanel, and M.Sudol. 1999. The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* 380:431-442.
- Rios,E. and G.Brum. 1987. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325:717-720.
- Rizzuto,R., P.Bernardi, and T.Pozzan. 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529 Pt 1:37-47.
- Rizzuto,R., A.W.Simpson, M.Brini, and T.Pozzan. 1992. Rapid changes of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358:325-327.
- Robert,V., P.Gurlini, V.Tosello, T.Nagai, A.Miyawaki, F.Di Lisa, and T.Pozzan. 2001. Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac cells. *EMBO J* 20:4998-5007.
- Roberts,R.G., R.J.Gardner, and M.Bobrow. 1994. Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat* 4:1-11.
- Rodriguez,M.C. and M.A.Tarnopolsky. 2003. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 34:1217-1220.
- Roos,J., P.J.DiGregorio, A.V.Yeromin, K.Ohlsen, M.Lioudyno, S.Zhang, O.Safrina, J.A.Kozak, S.L.Wagner, M.D.Cahalan, G.Velicelebi, and K.A.Stauderman. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 169:435-445.
- Ross,C.A., S.K.Danoff, M.J.Schell, S.H.Snyder, and A.Ullrich. 1992. Three additional inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: molecular cloning and differential localization in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4265-4269.
- Rousseau,E., J.S.Smith, and G.Meissner. 1987. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca<sup>2+</sup> release channel. *Am J Physiol* 253:C364-C368.
- Rowland,L.P. 1976. Pathogenesis of muscular dystrophies. *Arch Neurol* 33:315-321.
- Rusnak,F. and P.Mertz. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521.

---

-S-

- Salanova,M., G.Priori, V.Barone, E.Intravaia, B.Flucher, F.Ciruela, R.A.McIlhinney, J.B.Parys, K.Mikoshiha, and V.Sorrentino. 2002. Homer proteins and InsP(3) receptors co-localise in the longitudinal sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibres. *Cell Calcium* 32:193-200.
- Sano,M., T.Yokota, T.Endo, and H.Tsukagoshi. 1990. A developmental change in the content of parvalbumin in normal and dystrophic mouse (mdx) muscle. *J Neurol Sci* 97:261-272.
- Sattelle,D.B., D.Cordova, and T.R.Cheek. 2008. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invert Neurosci* 8:107-119.
- Schneider,M.F. and W.K.Chandler. 1973. Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242:244-246.

- Schreiber,S.L. and G.R.Crabtree. 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13:136-142.
- Schulz,R.A. and K.E.Yutzey. 2004. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol* 266:1-16.
- Sebille,S., A.Canterreau, C.Vandebrouck, H.Balghi, B.Constantin, G.Raymond, and C.Cognard. 2005. Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series. *Comput Methods Programs Biomed* 77:57-70.
- Sen,R. and D.Baltimore. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46:705-716.
- Shah,P.K. and R.Sowdhamini. 2001. Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein Eng* 14:867-874.
- Sharma,R.K., R.Elhence, V.Kher, A.Gupta, A.Kumar, M.Bhandari, and S.Agrawal. 1994. Role of cyclosporine rescue therapy in steroid resistant rejections. *Transplant Proc* 26:2556-2557.
- Shaw,J.P., P.J.Utz, D.B.Durand, J.J.Toole, E.A.Emmel, and G.R.Crabtree. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241:202-205.
- Shimizu,S., M.Narita, and Y.Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-487.
- Shirokova,N., J.Garcia, and E.Rios. 1998. Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 512 ( Pt 2):377-384.
- Shirokova,N., A.Gonzalez, W.G.Kirsch, E.Rios, G.Pizarro, M.D.Stern, and H.Cheng. 1999. Calcium sparks: release packets of uncertain origin and fundamental role. *J Gen Physiol* 113:377-384.
- Shirokova,N. and E.Rios. 1997. Small event Ca<sup>2+</sup> release: a probable precursor of Ca<sup>2+</sup> sparks in frog skeletal muscle. *J Physiol* 502 ( Pt 1):3-11.
- Sicinski,P., Y.Geng, A.S.Ryder-Cook, E.A.Barnard, M.G.Darlison, and P.J.Barnard. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244:1578-1580.
- Siebenlist,U., G.Franzoso, and K.Brown. 1994. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10:405-455.
- Singh,A., D.Ursic, and J.Davies. 1979. Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 277:146-148.
- Sipma,H., P.De Smet, I.Sienaert, S.Vanlingen, L.Missiaen, J.B.Parys, and H.De Smedt. 1999. Modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate binding to the recombinant ligand-binding site of the type-1 inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *J Biol Chem* 274:12157-12162.
- Smith,J.S., T.Imagawa, J.Ma, M.Fill, K.P.Campbell, and R.Coronado. 1988. Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 92:1-26.

- Smith, J.S., E.Rousseau, and G.Meissner. 1989. Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ Res* 64:352-359.
- Smyth, J.T., W.I.Dehaven, B.F.Jones, J.C.Mercer, M.Trebak, G.Vazquez, and J.W.Putney, Jr. 2006. Emerging perspectives in store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta* 1763:1147-1160.
- Soboloff, J., M.A.Spaso, T.Hewavitharana, L.P.He, W.Xu, L.S.Johnstone, M.A.Dziadek, and D.L.Gill. 2006. STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Curr Biol* 16:1465-1470.
- Sonnleitner, A., S.Fleischer, and H.Schindler. 1997. Gating of the skeletal calcium release channel by ATP is inhibited by protein phosphatase 1 but not by Mg<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* 21:283-290.
- Sotgia, F., J.K.Lee, K.Das, M.Bedford, T.C.Petrucci, P.Macioce, M.Sargiacomo, F.D.Bricarelli, C.Minetti, M.Sudol, and M.P.Lisanti. 2000. Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 275:38048-38058.
- Soulsby, M.D. and R.J.Wojcikiewicz. 2002. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function, ubiquitination and downregulation, but acts with variable characteristics in different cell types. *Cell Calcium* 32:175-181.
- Spencer, M.J., D.E.Croall, and J.G.Tidball. 1995. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem* 270:10909-10914.
- Spencer, M.J., E.Montecino-Rodriguez, K.Dorshkind, and J.G.Tidball. 2001. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol* 98:235-243.
- Stedman, H.H., H.L.Sweeney, J.B.Shrager, H.C.Maguire, R.A.Panettieri, B.Petrof, M.Narusawa, J.M.Lefterovich, J.T.Sladky, and A.M.Kelly. 1991. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352:536-539.
- Stiber, J.A., N.Tabatabaei, A.F.Hawkins, T.Hawke, P.F.Worley, R.S.Williams, and P.Rosenberg. 2005. Homer modulates NFAT-dependent signaling during muscle differentiation. *Dev Biol* 287:213-224.
- Straub, V., J.A.Rafael, J.S.Chamberlain, and K.P.Campbell. 1997. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 139:375-385.
- Strehler, E.E. and D.A.Zacharias. 2001. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 81:21-50.
- Supattapone, S., P.F.Worley, J.M.Baraban, and S.H.Snyder. 1988. Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 263:1530-1534.
- Suzuki, A., M.Yoshida, K.Hayashi, Y.Mizuno, Y.Hagiwara, and E.Ozawa. 1994. Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur J Biochem* 220:283-292.
- Suzuki, A., M.Yoshida, and E.Ozawa. 1995. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol* 128:373-381.

## -T-

- Takagi,A., S.Kojima, M.Ida, and M.Araki. 1992. Increased leakage of calcium ion from the sarcoplasmic reticulum of the mdx mouse. *J Neurol Sci* 110:160-164.
- Takahashi,M., H.Tsukui, and H.Hatanaka. 1985. Neuronal differentiation of Ca<sup>2+</sup> channel by nerve growth factor. *Brain Res* 341:381-384.
- Takekura,H., B.E.Flucher, and C.Franzini-Armstrong. 2001. Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol* 239:204-214.
- Takeshima,H., S.Nishimura, T.Matsumoto, H.Ishida, K.Kangawa, N.Minamino, H.Matsuo, M.Ueda, M.Hanaoka, T.Hirose, and . 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339:439-445.
- Tanabe,T., K.G.Beam, B.A.Adams, T.Niidome, and S.Numa. 1990. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346:567-569.
- Tanabe,T., K.G.Beam, J.A.Powell, and S.Numa. 1988. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336:134-139.
- Tanabe,T., H.Takeshima, A.Mikami, V.Flockerzi, H.Takahashi, K.Kangawa, M.Kojima, H.Matsuo, T.Hirose, and S.Numa. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Tanabe,Y., K.Esaki, and T.Nomura. 1986. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol* 69:91-95.
- Tarroni,P., D.Rossi, A.Conti, and V.Sorrentino. 1997. Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 272:19808-19813.
- Thomas,M., B.Langley, C.Berry, M.Sharma, S.Kirk, J.Bass, and R.Kambadur. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275:40235-40243.
- Timerman,A.P., E.Ogunbumni, E.Freund, G.Wiederrecht, A.R.Marks, and S.Fleischer. 1993. The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268:22992-22999.
- Tinsley,J., N.Deconinck, R.Fisher, D.Kahn, S.Phelps, J.M.Gillis, and K.Davies. 1998. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4:1441-1444.
- Tinsley,J.M., A.C.Potter, S.R.Phelps, R.Fisher, J.I.Trickett, and K.E.Davies. 1996. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384:349-353.
- Tortora, G. J and Grabowski, S. R. Principes d'anatomie te de physiologie. Deboeck Université . 2001. Ref Type: Generic

- Tripathy,A., L.Xu, G.Mann, and G.Meissner. 1995. Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* 69:106-119.
- Tsugorka,A., E.Rios, and L.A.Blatter. 1995. Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269:1723-1726.
- Turner,P.R., P.Y.Fong, W.F.Denetclaw, and R.A.Steinhardt. 1991. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol* 115:1701-1712.
- Turner,P.R., R.Schultz, B.Ganguly, and R.A.Steinhardt. 1993. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membr Biol* 133:243-251.
- Turner,P.R., T.Westwood, C.M.Regen, and R.A.Steinhardt. 1988. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 335:735-738.
- Tutdibi,O., H.Brinkmeier, R.Rudel, and K.J.Fohr. 1999. Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol* 515 ( Pt 3):859-868.

-U-

- Ursu,D., R.P.Schuhmeier, M.Freichel, V.Flockerzi, and W.Melzer. 2004. Altered inactivation of Ca<sup>2+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> release in mouse muscle fibers deficient in the DHP receptor gamma1 subunit. *J Gen Physiol* 124:605-618.
- Ursu,D., S.Seuille, B.Dietze, D.Freise, V.Flockerzi, and W.Melzer. 2001. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. *J Physiol* 533:367-377.

160

-V-

- Valdes,J.A., E.Gaggero, J.Hidalgo, N.Leal, E.Jaimovich, and M.A.Carrasco. 2008. NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C715-C725.
- Valdes,J.A., J.Hidalgo, J.L.Galaz, N.Puentes, M.Silva, E.Jaimovich, and M.A.Carrasco. 2007. NF-kappaB activation by depolarization of skeletal muscle cells depends on ryanodine and IP3 receptor-mediated calcium signals. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C1960-C1970.
- Valdivia,H.H., M.S.Kirby, W.J.Lederer, and R.Coronado. 1992. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12185-12189.
- Valentine,B.A., B.J.Cooper, J.F.Cummings, and A.de Lahunta. 1990. Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. *J Neurol Sci* 97:1-23.

- Valentine, B.A., N.J. Winand, D. Pradhan, N.S. Moise, A. de Lahunta, J.N. Kornegay, and B.J. Cooper. 1992. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am J Med Genet* 42:352-356.
- van Deutekom, J.C., A.A. Janson, I.B. Ginjaar, W.S. Frankhuizen, A. Aartsma-Rus, M. Bremmer-Bout, J.T. den Dunnen, K. Koop, A.J. van der Kooi, N.M. Goemans, S.J. de Kimpe, P.F. Ekhart, E.H. Venneker, G.J. Platenburg, J.J. Verschuuren, and G.J. van Ommen. 2007. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357:2677-2686.
- Vandebrouck, A., T. Ducret, O. Basset, S. Seville, G. Raymond, U. Rugg, P. Gailly, C. Cognard, and B. Constantin. 2006. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J* 20:136-138.
- Vandebrouck, A., J. Sabourin, J. Rivet, H. Balghi, S. Seville, A. Kitzis, G. Raymond, C. Cognard, N. Bourmeyster, and B. Constantin. 2007. Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *FASEB J* 21:608-617.
- Vandebrouck, C., G. Duport, C. Cognard, and G. Raymond. 2001. Cationic channels in normal and dystrophic human myotubes. *Neuromuscul Disord* 11:72-79.
- Vandebrouck, C., D. Martin, M. Colson-Van Schoor, H. Debaix, and P. Gailly. 2002. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 158:1089-1096.
- Venkatachalam, K., F. Zheng, and D.L. Gill. 2003. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 278:29031-29040.
- Vergara, J., R.Y. Tsien, and M. Delay. 1985. Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6352-6356.
- Voisin, V. and P.S. De La. 2004. Therapeutic strategies for Duchenne and Becker dystrophies. *Int Rev Cytol* 240:1-30.
- Volpe, P., F. Di Virgilio, T. Pozzan, and G. Salviati. 1986. Role of inositol 1,4,5-trisphosphate in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *FEBS Lett* 197:1-4.
- Volpe, P., G. Salviati, F. Di Virgilio, and T. Pozzan. 1985. Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* 316:347-349.

-W-

- Wagenknecht, T. and M. Radermacher. 1997. Ryanodine receptors: structure and macromolecular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 7:258-265.
- Wagner, K.R. 2008. Approaching a new age in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Neurotherapeutics* 5:583-591.
- Wagner, K.R., J.B. Cohen, and R.L. Haganir. 1993. The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin. *Neuron* 10:511-522.

- Wagner, K.R., A.C. McPherron, N. Winik, and S.J. Lee. 2002. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol* 52:832-836.
- Wamhoff, B.R., D.K. Bowles, and G.K. Owens. 2006. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ Res* 98:868-878.
- Wang, B., J. Li, and X. Xiao. 2000. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13714-13719.
- Wang, J.H. and R. Desai. 1976. A brain protein and its effect on the Ca<sup>2+</sup>- and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 72:926-932.
- Wang, S., W.R. Trumble, H. Liao, C.R. Wesson, A.K. Dunker, and C.H. Kang. 1998. Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol* 5:476-483.
- Wang, S.Q., L.S. Song, E.G. Lakatta, and H. Cheng. 2001. Ca<sup>2+</sup> signalling between single L-type Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature* 410:592-596.
- Wang, X., N. Weisleder, C. Collet, J. Zhou, Y. Chu, Y. Hirata, X. Zhao, Z. Pan, M. Brotto, H. Cheng, and J. Ma. 2005. Uncontrolled calcium sparks act as a dystrophic signal for mammalian skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 7:525-530.
- Ward, C.W., W. Feng, J. Tu, I.N. Pessah, P.K. Worley, and M.F. Schneider. 2004. Homer protein increases activation of Ca<sup>2+</sup> sparks in permeabilized skeletal muscle. *J Biol Chem* 279:5781-5787.
- Ward, C.W. and W.J. Lederer. 2005. Ghost sparks. *Nat Cell Biol* 7:457-459.
- Ward, C.W., M.F. Schneider, D. Castillo, F. Protasi, Y. Wang, S.R. Chen, and P.D. Allen. 2000. Expression of ryanodine receptor RyR3 produces Ca<sup>2+</sup> sparks in dyspedic myotubes. *J Physiol* 525 Pt 1:91-103.
- Weinblatt, M.E. 1999. The role of current strategies in the future treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38 Suppl 2:19-23.
- Wilcox, R.A., W.U. Primrose, S.R. Nahorski, and R.A. Challiss. 1998. New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol Sci* 19:467-475.
- Winand, N.J., M. Edwards, D. Pradhan, C.A. Berian, and B.J. Cooper. 1994. Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4:433-445.
- Wissenbach, U., S.E. Philipp, S.A. Gross, A. Cavalie, and V. Flockerzi. 2007. Primary structure, chromosomal localization and expression in immune cells of the murine ORAI and STIM genes. *Cell Calcium* 42:439-446.
- Worley, P.F., J.M. Baraban, J.S. Colvin, and S.H. Snyder. 1987a. Inositol trisphosphate receptor localization in brain: variable stoichiometry with protein kinase C. *Nature* 325:159-161.
- Worley, P.F., J.M. Baraban, S. Supattapone, V.S. Wilson, and S.H. Snyder. 1987b. Characterization of inositol trisphosphate receptor binding in brain. Regulation by pH and calcium. *J Biol Chem* 262:12132-12136.

Wright,N.T., B.L.Prosser, K.M.Varney, D.B.Zimmer, M.F.Schneider, and D.J.Weber. 2008. S100A1 and calmodulin compete for the same binding site on ryanodine receptor. *J Biol Chem* 283:26676-26683.

## -γ-

Yamada,M., A.Miyawaki, K.Saito, T.Nakajima, M.Yamamoto-Hino, Y.Ryo, T.Furuichi, and K.Mikoshiha. 1995. The calmodulin-binding domain in the mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J* 308 ( Pt 1):83-88.

Yang,B., D.Jung, D.Motto, J.Meyer, G.Koretzky, and K.P.Campbell. 1995a. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 270:11711-11714.

Yang,B., D.Jung, J.A.Rafael, J.S.Chamberlain, and K.P.Campbell. 1995b. Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem* 270:4975-4978.

Yano,M., T.Yamamoto, Y.Ikeda, and M.Matsuzaki. 2006. Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3:43-52.

Yeromin,A.V., J.Roos, K.A.Stauderman, and M.D.Cahalan. 2004. A store-operated calcium channel in *Drosophila* S2 cells. *J Gen Physiol* 123:167-182.

Yeromin,A.V., S.L.Zhang, W.Jiang, Y.Yu, O.Safrina, and M.D.Cahalan. 2006. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443:226-229.

Yilmaz,O., A.Karaduman, and H.Topaloglu. 2004. Prednisolone therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis. *Eur J Neurol* 11:541-544.

Yoshida,M., H.Hama, M.Ishikawa-Sakurai, M.Imamura, Y.Mizuno, K.Araishi, E.Wakabayashi-Takai, S.Noguchi, T.Sasaoka, and E.Ozawa. 2000. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet* 9:1033-1040.

Yoshida,T., Y.Pan, H.Hanada, Y.Iwata, and M.Shigekawa. 1998. Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem* 273:1583-1590.

Yoshikawa,F., M.Morita, T.Monkawa, T.Michikawa, T.Furuichi, and K.Mikoshiha. 1996. Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 271:18277-18284.

Yoshikawa,F., T.Uchiyama, H.Iwasaki, C.Tomomori-Satoh, T.Tanaka, T.Furuichi, and K.Mikoshiha. 1999. High efficient expression of the functional ligand binding site of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 257:792-797.

---

-Z-

- Zaidi, S.I. and H.T. Narahara. 1989. Degradation of skeletal muscle plasma membrane proteins by calpain. *J Membr Biol* 110:209-216.
- Zalk, R., S.E. Lehnart, and A.R. Marks. 2007. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem* 76:367-385.
- Zamudio, F.Z., R. Conde, C. Arevalo, B. Becerril, B.M. Martin, H.H. Valdivia, and L.D. Possani. 1997a. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J Biol Chem* 272:11886-11894.
- Zamudio, F.Z., G.B. Gurrola, C. Arevalo, R. Sreekumar, J.W. Walker, H.H. Valdivia, and L.D. Possani. 1997b. Primary structure and synthesis of Imperatoxin A (IpTx(a)), a peptide activator of Ca<sup>2+</sup> release channels/ryanodine receptors. *FEBS Lett* 405:385-389.
- Zhang, S.L., Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan. 2005. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 437:902-905.
- Zhang, Z., D. Lewis, C. Strock, G. Inesi, M. Nakasako, H. Nomura, and C. Toyoshima. 2000. Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca(2+) binding and catalytic activation in the Ca(2+) transport (SERCA) ATPase. *Biochemistry* 39:8758-8767.
- Zhou, J., G. Brum, A. Gonzalez, B.S. Launikonis, M.D. Stern, and E. Rios. 2003. Ca<sup>2+</sup> sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J Gen Physiol* 122:95-114.
- Zhou, J., J. Yi, L. Royer, B.S. Launikonis, A. Gonzalez, J. Garcia, and E. Rios. 2006. A probable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca<sup>2+</sup> sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C539-C553.
- Zimanyi, I., E. Buck, J.J. Abramson, M.M. Mack, and I.N. Pessah. 1992. Ryanodine induces persistent inactivation of the Ca<sup>2+</sup> release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* 42:1049-1057.
- Zorzato, F., J. Fujii, K. Otsu, M. Phillips, N.M. Green, F.A. Lai, G. Meissner, and D.H. MacLennan. 1990. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265:2244-2256.

## Annexes

### Annexe 1 : Composition des milieux utilisés dans la culture des lignées cellulaires

	Milieu de décongélation	Milieu de congélation	Milieu de prolifération	Milieu de fusion
<b>DMEM (Lonza)</b>	38%	68%	44%	96%
<b>HamF12 (Lonza)</b>	38%	-	44%	-
<b>Sérum de veau fœtal (Biowest)</b>	20%	20%	10%	-
<b>Sérum de cheval (Gibco)</b>	-	-	-	2%
<b>L-glutamine (Cambrex)</b>	1%	1%	1%	1%
<b>Pénicilline (60 µg/ml) Streptomycine (50 µg/ml) (Cambrex)</b>	1%	1%	1%	1%
<b>Insuline (Sigma)</b>	-	-	-	10 µg/ml
<b>Ultroser G (Biosepra)</b>	2%	-	-	-
<b>DMSO (Sigma)</b>	-	10%	-	-

L'ultroser G est un analogue synthétique du sérum de veau fœtal (SVF), 1% d'ultroser G correspond à 10% de SVF.

## **Annexe 2 : Composition des milieux utilisés dans la culture primaire des cellules musculaires squelettiques de souris**

	Milieu de dissociation	Milieu de prolifération	Milieu de fusion
<b>DMEM (Lonza)</b>	-	33%	93%
<b>HamF12 (Lonza)</b>	98%	33%	-
<b>Sérum de veau foetal (Biowest)</b>	-	20%	-
<b>Sérum de cheval (Gibco)</b>	-	10%	5%
<b>L-glutamine (Cambrex)</b>	-	1%	1%
<b>Pénicilline (60 µg/ml) Streptomycine (50 µg/ml) (Cambrex)</b>	1%	1%	1%
<b>Hépès (Sigma)</b>	2 mM	-	-
<b>Ultroser G (Biosepra)</b>	-	2%	-
<b>Protéase IX (Sigma)</b>	2 mg/ml	-	-
<b>Collagénase I (Sigma)</b>	1,5 mg/ml	-	-

L'ultroser G est un analogue synthétique du sérum de veau foetal (SVF), 1% d'ultroser G correspond à 10% de SVF.

### **Annexe 3 : Composition des milieux utilisés dans la culture des fibres musculaires squelettiques de souris**

#### Milieu de préparation des fibres : Krebs

<b>Krebs (pH 7,3)</b>	
<b>NaCl</b>	124 mM
<b>KCl</b>	5,9 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1,2 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,5 mM
<b>HEPES Na</b>	11,5 mM
<b>Glucose</b>	11,5 mM

#### Milieu de culture des fibres

<b>Milieu de culture</b>	
<b>DMEM (Lonza)</b>	48,5%
<b>HamF12 (Lonza)</b>	48,5%
<b>Sérum de veau fœtal (Biowest)</b>	2%
<b>Pénicilline (60 µg/ml) Streptomycine (50 µg/ml) (Cambrex)</b>	1%

**Annexe 4 : Composition des milieux utilisés lors des enregistrements calciques**

	<b>E01</b>	<b>E01 47 mM KCl</b>
<b>NaCl</b>	130 mM	88,4 mM
<b>KCl</b>	5,4 mM	47 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2,5 mM	2,5 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0,8 mM	0,8 mM
<b>HEPES</b>	10 mM	10 mM
<b>Glucose</b>	5,6 mM	5,6 mM

pH ajusté à 7,4 pour les 2 solutions

**Annexe 5 : Composition des milieux utilisés pour la technique de western-blot**Milieux de préparation des échantillons protéiques

<b>TBS</b> (lyse cellulaire)	
<b>Tris base</b>	20 mM
<b>NaCl</b>	154 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2 mM
<b>EGTA</b>	2 mM

pH=7,5

<b>RIPA</b>	
<b>Tris HCl</b>	50 mM
<b>NaCl</b>	150 mM
<b>EDTA</b>	5 mM
<b>NP 40</b>	0,05% (v/v)
<b>DOC</b>	1% (p/v)
<b>Triton X-100</b>	1% (v/v)
<b>SDS 10%</b>	0,1% (v/v)

pH=7,4

<b>Tampon de charge 2X</b> (Laemmli)	
<b>Tris HCl</b>	50 mM
<b>SDS 10%</b>	23% (v/v)
<b>Glycérol</b>	14% (v/v)
<b>Bleu de bromophénol</b>	0,1% (p/v)
<b>β mercaptoéthanol</b>	5% (v/v)

pH=6,8

---

Milieux pour l'électrophorèse et électrotransfert

Running buffer 10X	
<b>Glycine</b>	1,92 M
<b>Tris base</b>	0,25 M

8,2&lt;pH&lt;8,5

Tampon de migration	
<b>Running buffer 10X</b>	10% (v/v)
<b>SDS 10%</b>	1% (v/v)

Tampon de transfert	
<b>Running buffer 10X</b>	10% (v/v)
<b>Méthanol</b>	10% (v/v)
<b>SDS 10%</b>	0,1% (v/v)

TBS (rinçages membranes)	
<b>Tris base</b>	20 mM
<b>NaCl</b>	150 mM

pH=7,6

**Annexe 6 : Composition des milieux utilisés pour l'immunomarquage**

<b>TBS</b>	
<b>Tris base</b>	20 mM
<b>NaCl</b>	150 mM

pH=7,6

<b>PFA 3%</b>	
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	30 mM
<b>NaCl</b>	270 mM
<b>PAF</b>	3% (p/v)

pH=7,5

## **Annexe 7 : Articles publiés**

**Article 1** : « Negative modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression prevents dystrophin-deficient muscle cells death. »

L. Mondin, H. Balghi, B. Constantin, C. Cognard and S. Sebille.

Ce travail a été publié en août 2009 et fait partie intégrante de mon projet de thèse, reprenant la majeure partie des résultats sur la cyclosporine A dans les lignées cellulaires.

**Article 2** : « Mini-dystrophin expression down-regulates overactivation of G protein-mediated IP3 signaling pathway in dystrophin-deficient muscle cells. »

H. Balghi, S. Sebille, B. Constantin, S. Patri, V. Thoreau, L. Mondin, E. Mok, A. Kitzis, G. Raymond and C. Cognard

Dans ce travail, j'ai effectué les expérimentations d'immunomarquage.

172

---

**Article 3** : « Mini-dystrophin expression down-regulates IP3-mediated calcium release events in resting dystrophin-deficient muscle cells. »

H. Balghi, S. Sebille, L. Mondin, A. Cantereau, B. Constantin, G. Raymond and C. Cognard

Dans ce travail, j'ai effectué les immunomarquages et j'ai également participé à la rédaction du manuscrit.

---

## **Annexe 8 : Résumés de la thèse**

### **Homéostasie calcique et survie des cellules musculaires squelettiques déficientes en dystrophine : effets de la modulation de l'activité et de l'expression des Récepteurs à l'Inositol Trisphosphate.**

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie musculaire sévère caractérisée par l'absence d'une protéine : la dystrophine, protéine sous-membranaire permettant de faire le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. La déficience en dystrophine entraîne une dégénérescence musculaire progressive conduisant à la mort du patient. Le lien entre l'absence de dystrophine et la mort des cellules musculaires reste encore mal établi. De nombreuses études ont mis en évidence une dérégulation calcique des cellules musculaires squelettiques déficientes en dystrophine, ainsi qu'une implication des stocks intracellulaires de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique. De plus, le calcium libéré par les récepteurs à l'IP3 (IP3Rs) semblent être impliqué dans cette dérégulation calcique.

Dans cette étude, nous avons confirmé la présence d'une libération calcique globale, après stimulation, supérieure dans les cellules sans dystrophine comparativement aux cellules exprimant la mini-dystrophine. De même, au repos, les libérations calciques localisées spontanées sont plus abondantes dans les cellules déficientes en dystrophine. Ces résultats ont également été observés dans les myotubes provenant de culture primaire de souris *mdx* (modèle animal de la DMD), comparativement aux souris B110 (souris contrôles). Afin d'étudier la régulation de la libération de calcium, des expérimentations de libération calcique artificielle par la méthode de photolyse de calcium encagé ont été menées à différents stades de maturation des cellules musculaires provenant des souris *mdx* et contrôles.

Nous avons également étudié la régulation à court et à long terme du calcium provenant des IP3Rs à l'aide de la cyclosporine A. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une possible implication de la voie calcineurine/NFAT. De plus, la régulation pharmacologique de cette voie a révélé une modulation des libérations calciques globales et spontanées, ainsi qu'une diminution de l'expression de l'IP3R1. A ces deux effets, s'ajoute une protection contre la mort cellulaire naturelle des cellules déficientes en dystrophine par la modulation de la voie IP3.

Ces résultats suggèrent l'implication des IP3Rs dans la dérégulation calcique des cellules déficientes en dystrophine entraînant la mort prématurée de ces cellules. Il serait maintenant intéressant de comprendre comment la dystrophine intervient dans la modulation de cette voie de libération du calcium.

**Mots clés :** muscle squelettique, dystrophine, souris *mdx*, calcium, récepteur IP3, calcineurine, cyclosporine A, NFAT, survie cellulaire.

**Calcium homeostasis and cell viability in dystrophin-deficient skeletal muscle cells: inositol trisphosphate receptors activity and expression modulatory effects.**

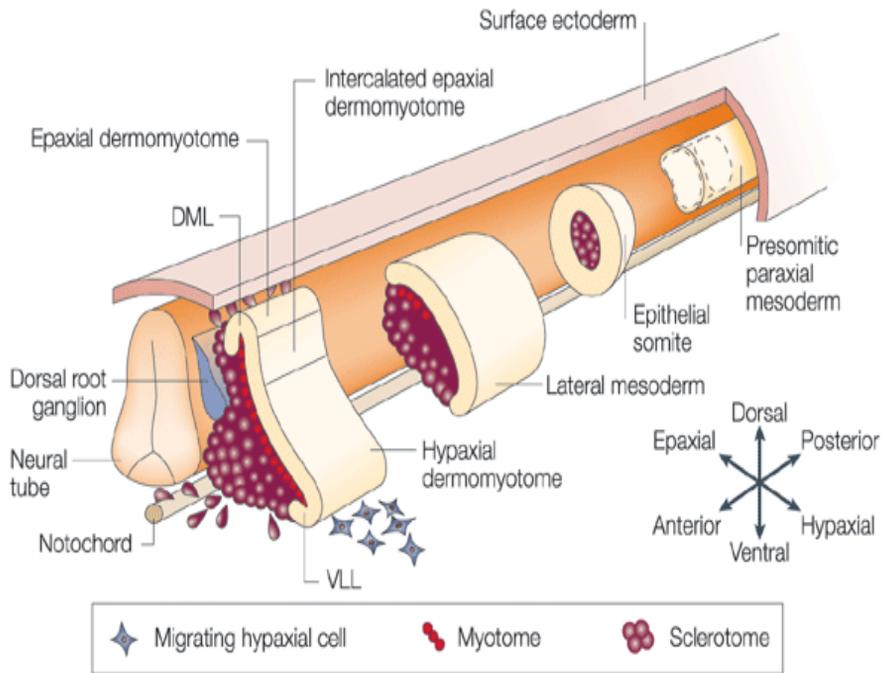
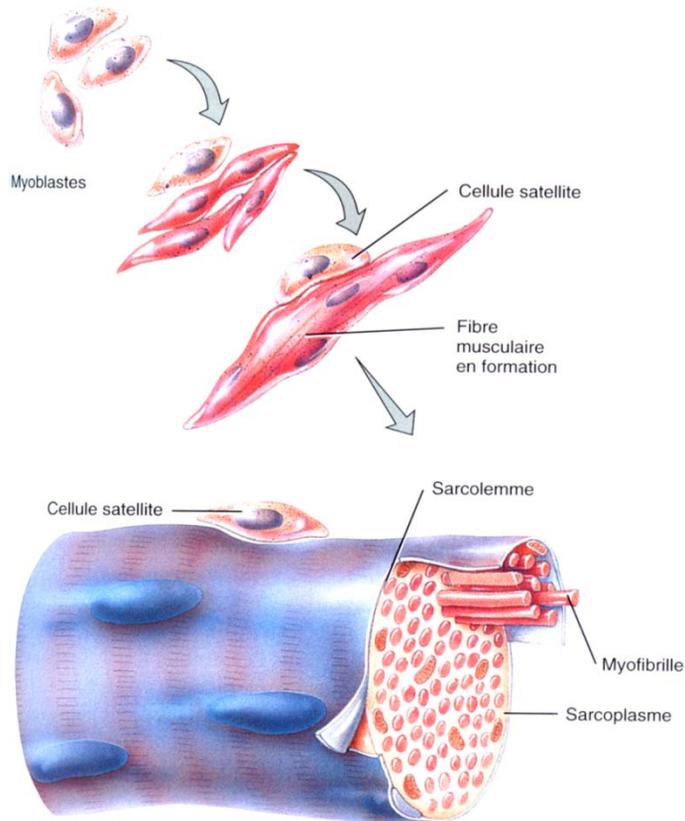
**Abstract:**

In Duchenne muscular dystrophy, the lack of dystrophin leads to muscle degeneration and progressive weakness. The link between the lack of dystrophin and the cell death is not well established. However, calcium mishandling was observed in dystrophin-deficient muscle cells, involving sarcoplasmic reticulum (SR) calcium stores depending on IP3Rs.

Global calcium releases after depolarization and spontaneous calcium events at rest were greater in dystrophin-deficient cells than in mini-dystrophin transfected cells. These results were confirmed in primary cultures of myotubes from *mdx* mouse (animal model of the DMD) comparatively to B110 mouse (control mouse). Moreover, the short term and long term IP3 pathway regulation was investigated. This study showed a possible involvement of the calcineurin/NFAT pathway in the IP3R-1 expression. Furthermore, pharmacological regulation of this pathway revealed calcium releases modulation, decrease of IP3R-1 expression and protecting effect against dystrophin-deficient natural cell death.

These data suggest the involvement of the IP3Rs calcium mishandling leading to the death of dystrophin-deficient muscle cells. Now, it will be interesting to examine in a deeper way the role of the dystrophin in the modulation of this calcium release pathway.

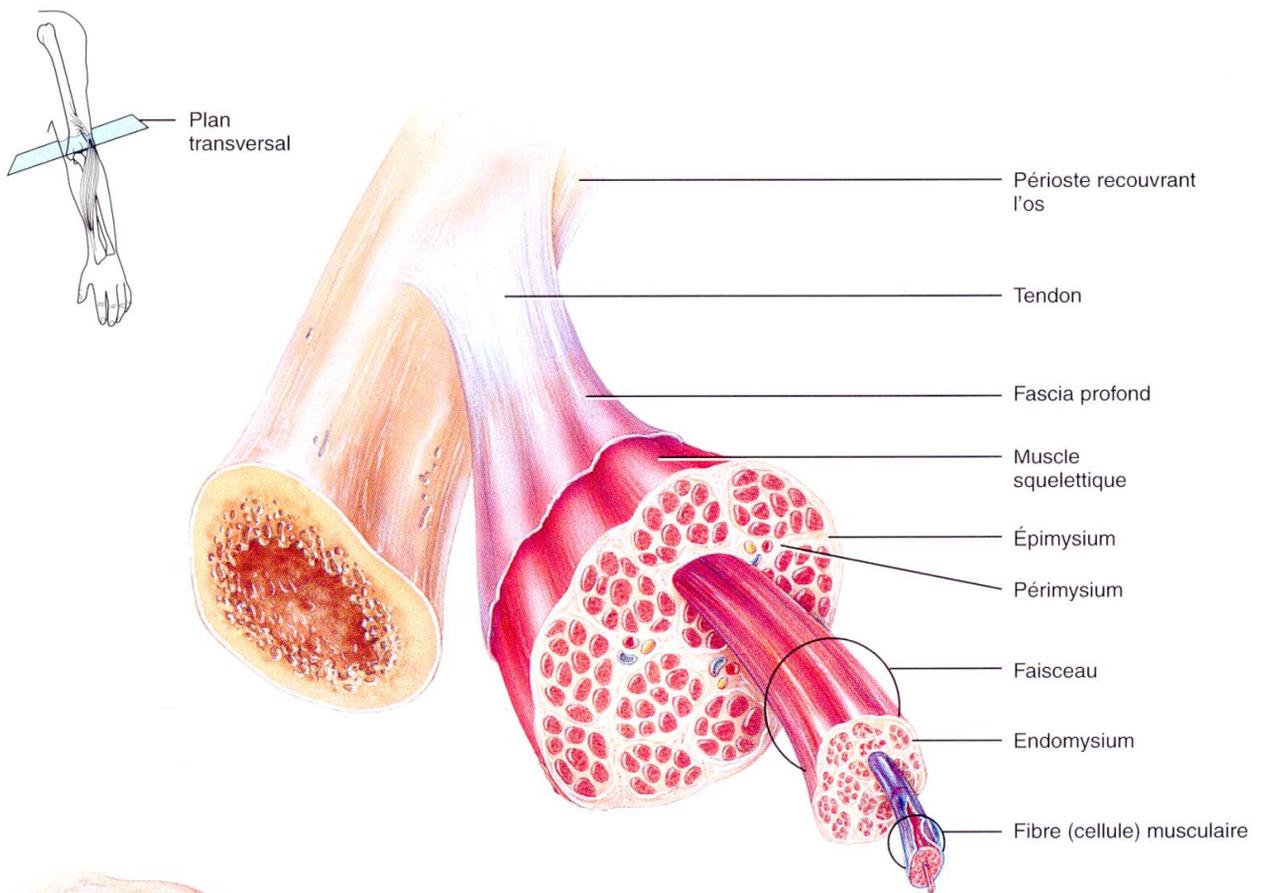
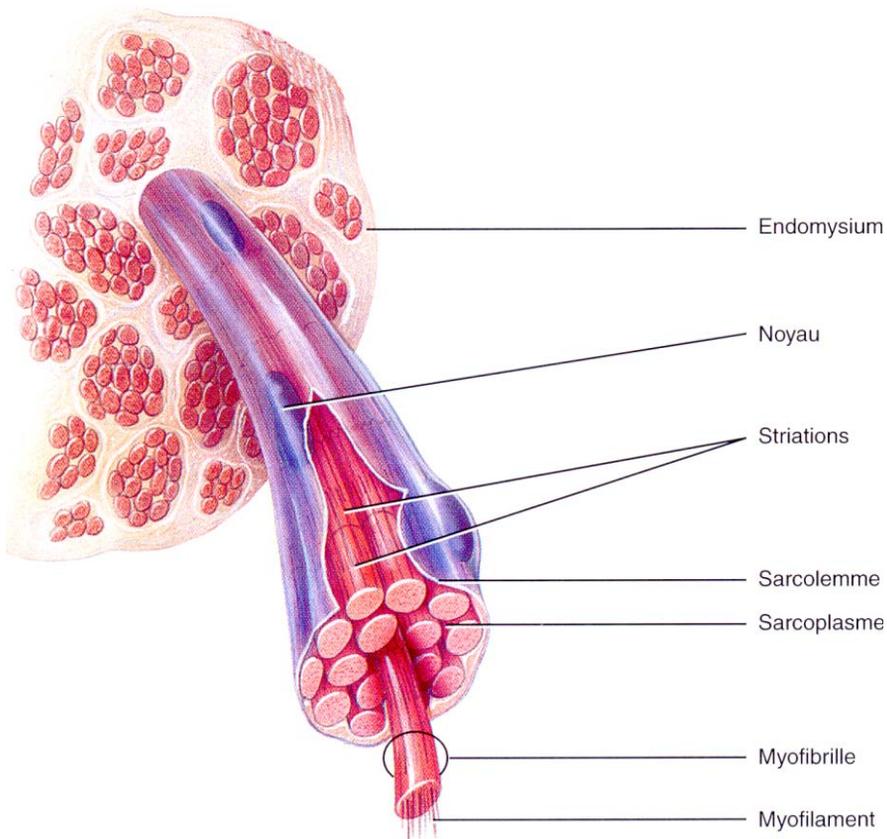
**Keywords :** skeletal muscle, dystrophine, *mdx* mouse, calcium, IP3 receptor, calcineurine, cyclosporine A, NFAT, cell viability.

**A****B**

### **Figure H-2 : Les différentes étapes de la myogenèse**

**(A).** Les cellules musculaires progénitrices proviennent de la partie dorsale des somites, le dermomyotome, qui se divise en derme et en muscle ventral et dorsal. Les muscles des membres proviennent des myotomes qui se différencient en cellules migratrices (migrating hypaxial cells). Ces cellules se déplacent vers les régions cibles afin de générer la myogenèse. *Source : Parker et al., 2003.*

**(B).** Les cellules progénitrices localisées au niveau des régions cibles vont fusionner entre elles pour donner naissance à des myotubes primaires à noyaux centraux. Après la naissance, la phase de maturation a lieu, permettant la mise en place de fibres musculaires matures à noyaux périphériques. *Source : Tortora et Grabowski, 2001.*

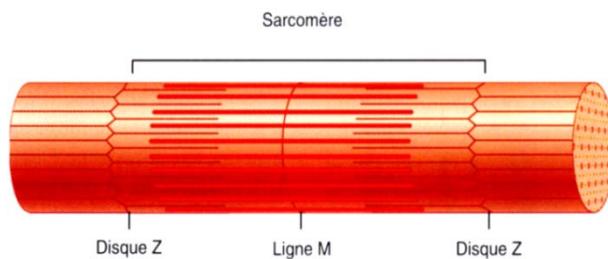
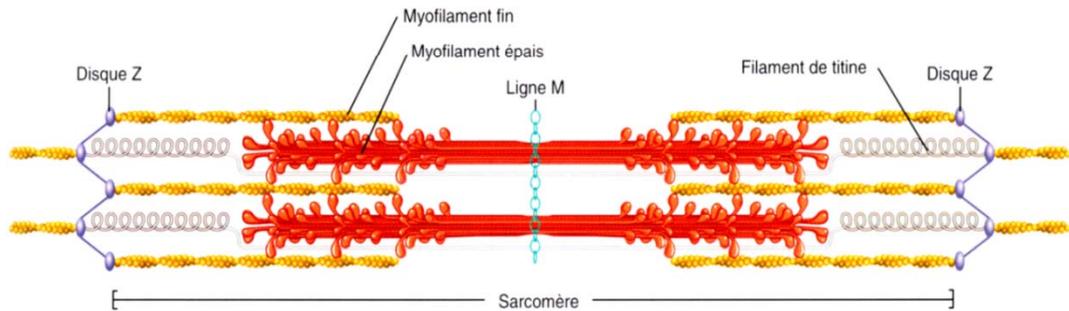
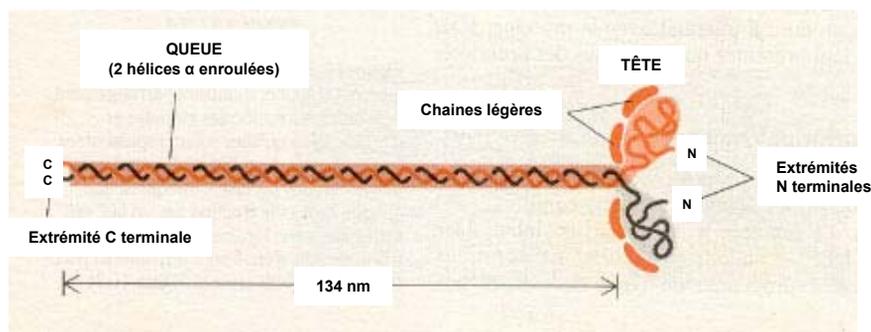
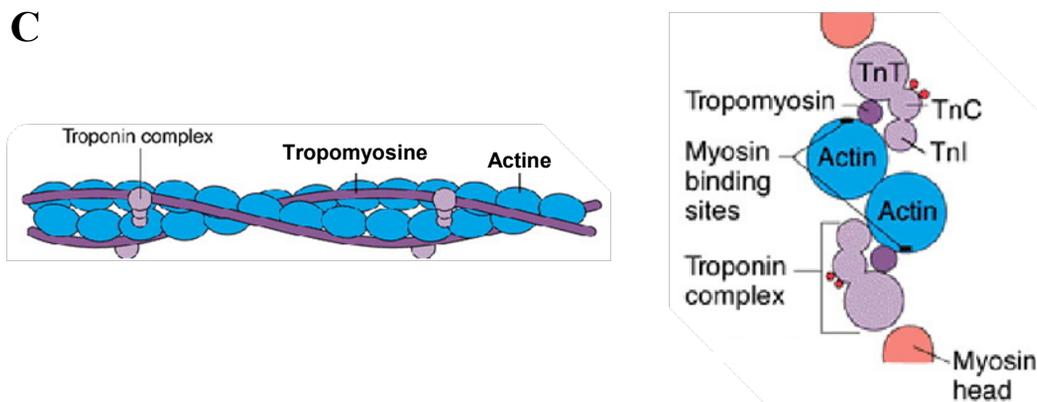
**A****B**

**Figure H-3 : Organisation générale du muscle squelettique**

(A). Le muscle est relié au squelette par des tendons. Il est formé de plusieurs faisceaux musculaires entourés d'un système de tissus conjonctifs. Chaque faisceau est lui-même composé de plusieurs fibres musculaires.

(B). Détails d'un faisceau musculaire. Les fibres musculaires contiennent les myofibrilles (sous-unités des fibres musculaires), composées des myofilaments, éléments contractiles de la fibre musculaire.

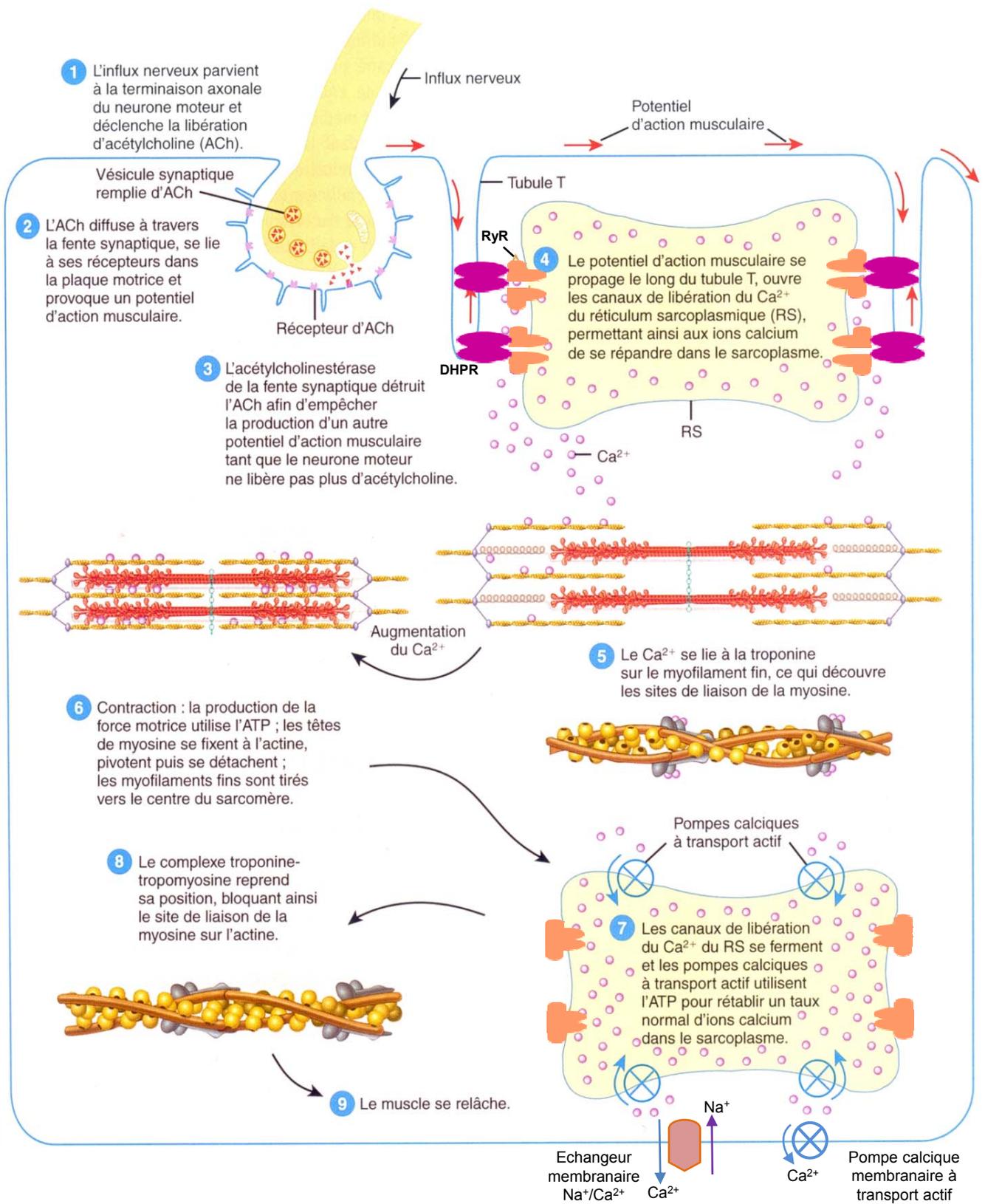
Source : Tortora et Grabowski, 2001.

**A****(a) Myofibrille****(b) Myofilaments****B****C****Figure H-6 : Les protéines contractiles**

(A). Arrangement des myofilaments au sein du sarcomère. Le sarcomère est délimité par les disques Z, point d'ancrage des filaments fins d'actine. L'ancrage des filaments épais de myosine se fait au niveau de la ligne M de la bande A.  
 Source : Tortora et Grabowski, 2001.

(B). Structure des filaments épais de myosine. Les chaînes lourdes de myosine s'enlacent en hélice  $\alpha$  pour former la queue de myosine. Les chaînes légères de myosine se lient aux extrémités N-terminales des chaînes lourdes pour former les têtes globulaires.  
 Source : site internet [www.iav.ac.ma](http://www.iav.ac.ma)

(C). Structure des filaments fins d'actine et de leur complexe troponine/tropomyosine.  
 Source : site internet [www.unm.edu](http://www.unm.edu)



**Figure H-7 : Schéma général du couplage excitation-contraction et de la relaxation musculaire.**

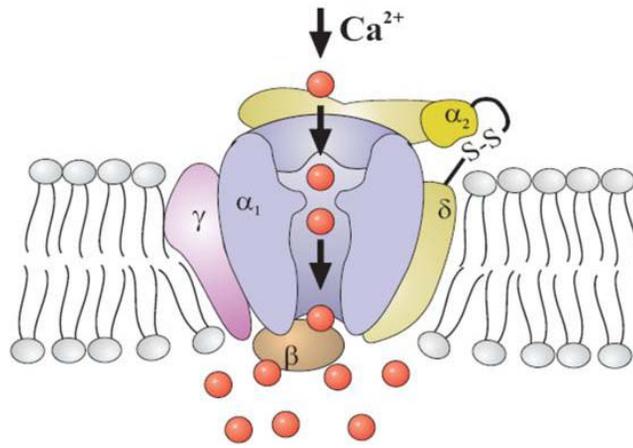
Source : modifié d'après Tortora et Grabowski, 2001.

Type de canal		Ca <sub>v</sub>	Sous-unité α <sub>1</sub>	Pharmacologie	Localisation primaire	Sous-unité β	Sous-unité α <sub>2</sub> δ	
Canaux HVA	L-type (DHPR)	1.1	α <sub>1S</sub>	Dihydropyridines Phenylalkylamines Benzothiazepines	muscle squelettique	β1	α <sub>2</sub> δ <sub>1</sub> : muscle squelettique, cœur et cerveau  α <sub>2</sub> δ <sub>2</sub> : cœur, muscle squelettique, pancréas, cerveau et poumons  α <sub>2</sub> δ <sub>3</sub> : cerveau  α <sub>2</sub> δ <sub>4</sub> : cœur et muscle squelettique	
		1.2	α <sub>1C</sub>		cœur, cellules endocrines, neurones	β 1, 2, 3 et 4		
		1.3	α <sub>1D</sub>		cellules endocrines, neurones	β 2 et 3		
		1.4	α <sub>1F</sub>		rétine	?		
	Neuronaux	P/Q	2.1	α <sub>1A</sub>	ω-agatoxin IVA	terminaison nerveuses dendrite		β 1, 2, 3 et 4
		N	2.2	α <sub>1B</sub>	ω-conotoxin GVIA	terminaison nerveuse, dendrite		β 1, 2, 3 et 4
		R	2.3	α <sub>1E</sub>	SNX-482	corps cellulaire, terminaison nerveuse, dendrite		β 1, 2, 3 et 4
Canaux LVA	T-type	3.1	α <sub>1G</sub>	Nickel Mibefradil Ammiloride Kurtoxin	neurones, cœur, divers tissus périphériques			
		3.2	α <sub>1H</sub>					
		3.3	α <sub>1I</sub>					

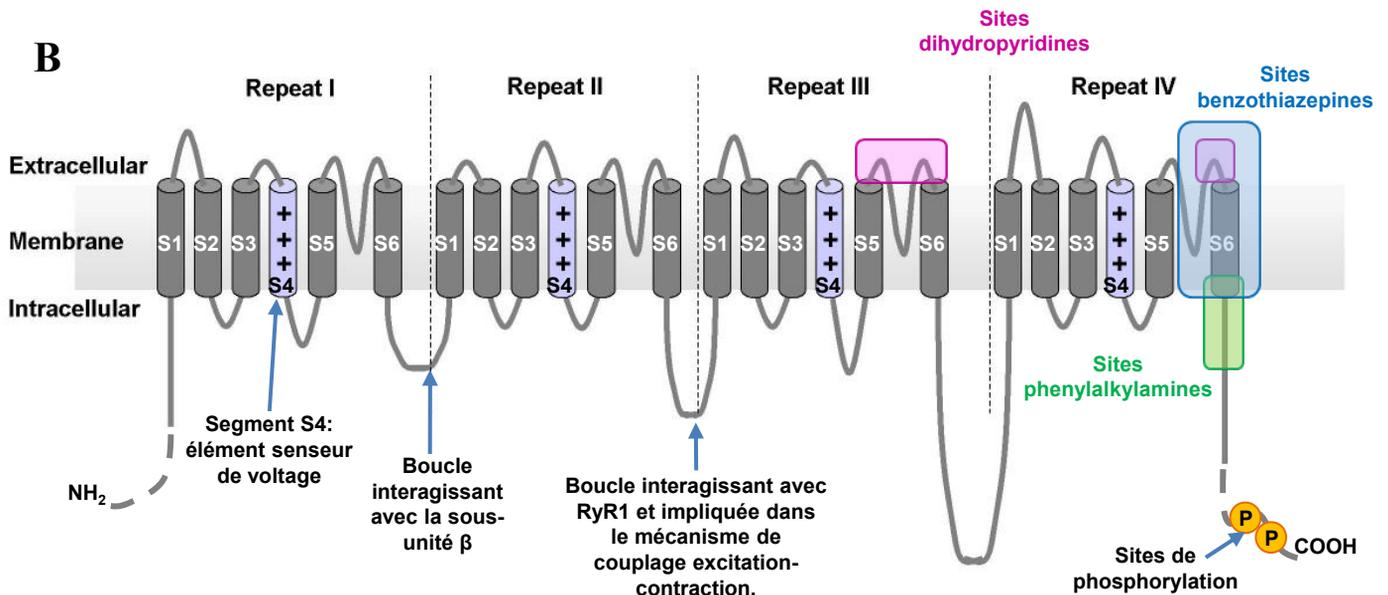
**Tableau T-1: Sous-unités, pharmacologie et distribution des canaux calciques sensibles au voltage**

Source : d'après Lacinova, 2005 ; Swayne et Bourinet, 2008.

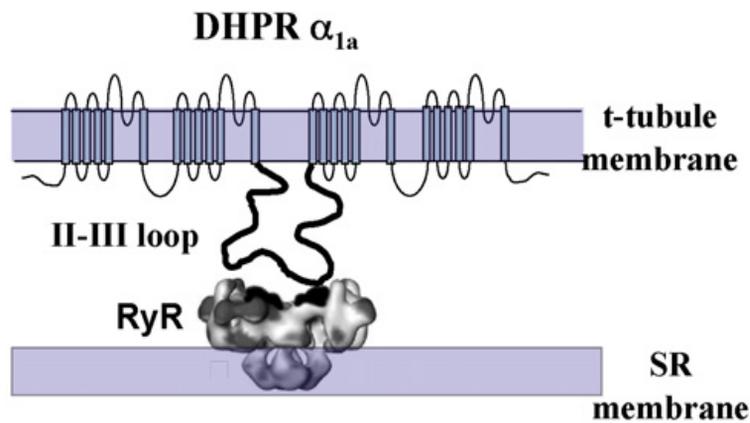
**A**



**B**



**C**

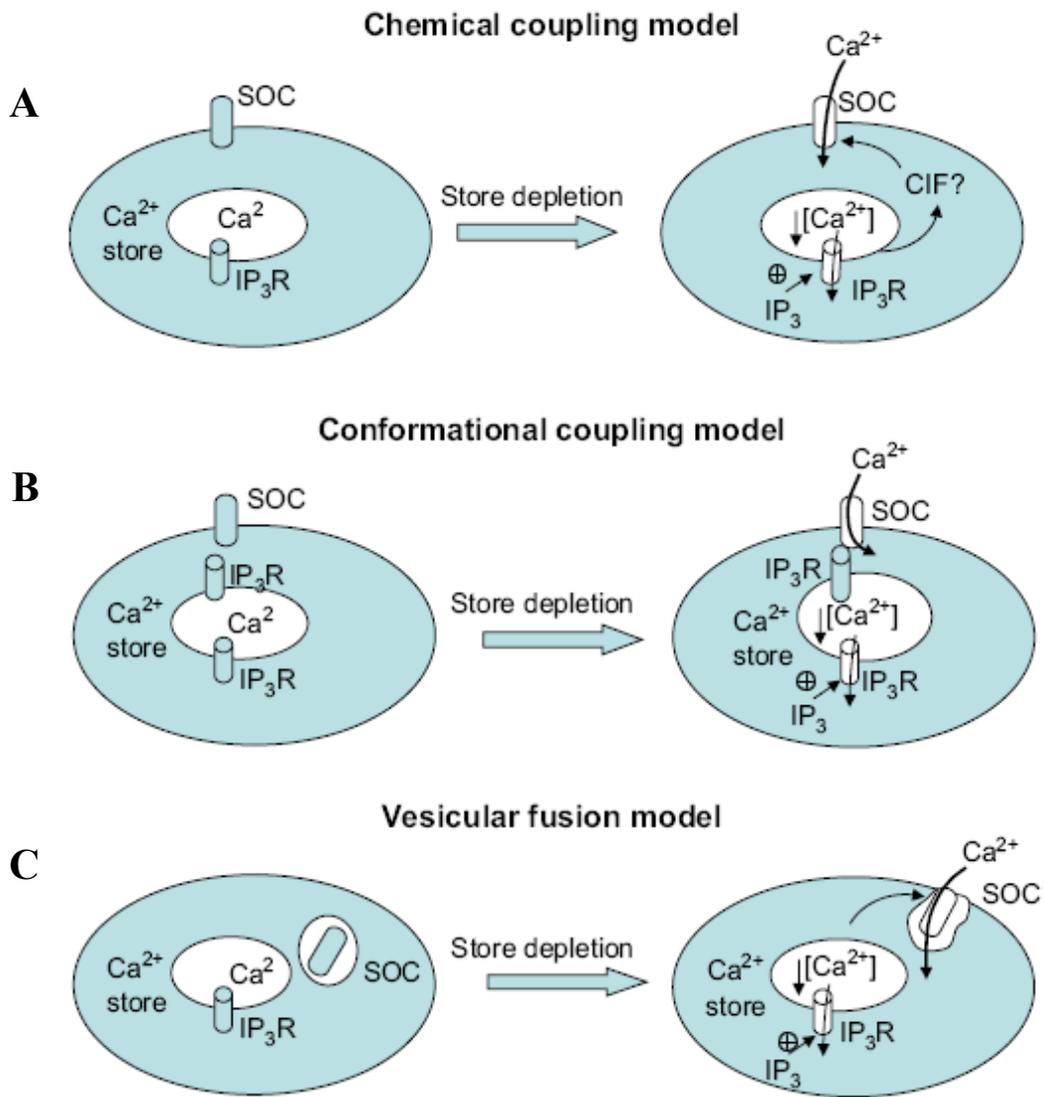


**Figure H-9 : Structure des récepteurs aux dihydropyridines (DHPRs)**

(A). Arrangement des sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ . La sous-unité  $\beta$  est la seule à être cytosolique et les sous-unités  $\alpha_2$  et  $\delta$  sont liées par un pont disulfure (S-S) permettant la stabilisation du complexe à la membrane. *Source : Lacinova, 2005.*

(B). Structure de la sous-unité  $\alpha_1$  des DHPRs. Elle est formée de 4 domaines transmembranaires (I à IV) eux-mêmes composés de 6 segments transmembranaires (S1 à S6). *Source : modifié d'après le site [www.rbej.com](http://www.rbej.com).*

(C). Interaction entre la sous-unité  $\alpha_1$  du DHPR et le RyR localisé à la membrane du RS. Cette interaction se fait par lien physique dans le muscle squelettique par la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha_1$  du DHPR. *Source: Cui et al., 2008.*



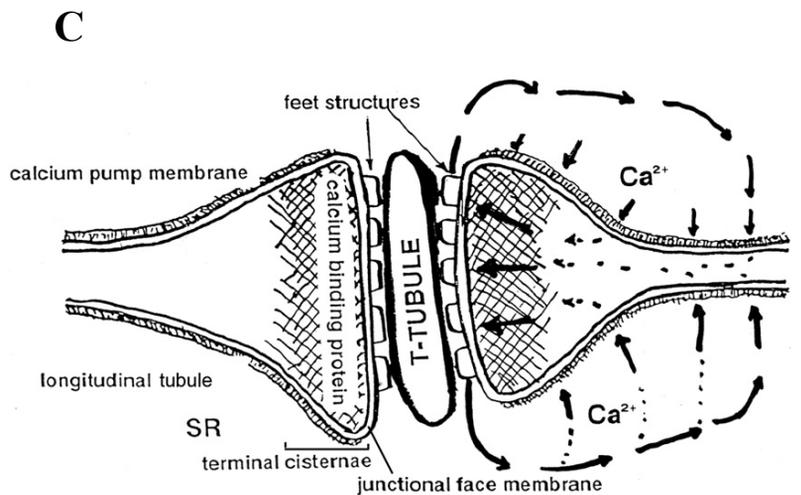
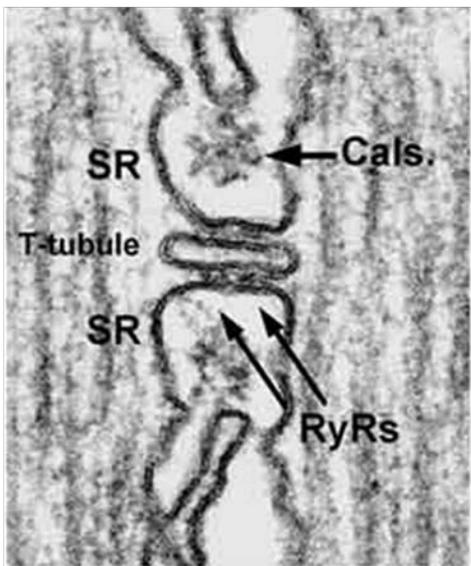
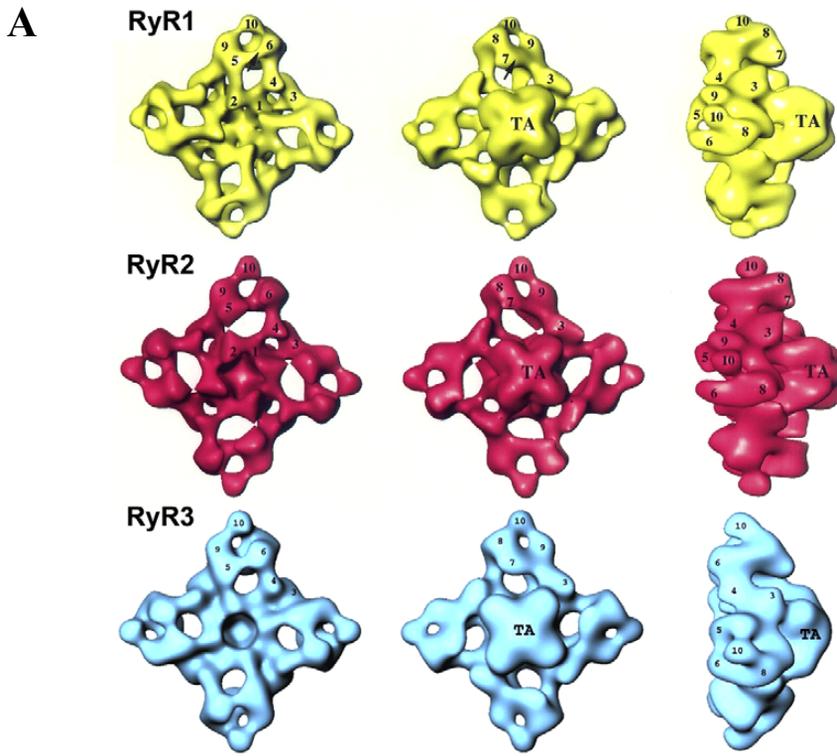
**Figure H-11 : Mécanismes d'activation des SOCs.**

Source : Guibert et al., 2008.

(A). Couplage chimique par messenger diffusible.

(B). Couplage conformationnel par lien direct.

(C). Fusion vésiculaire.

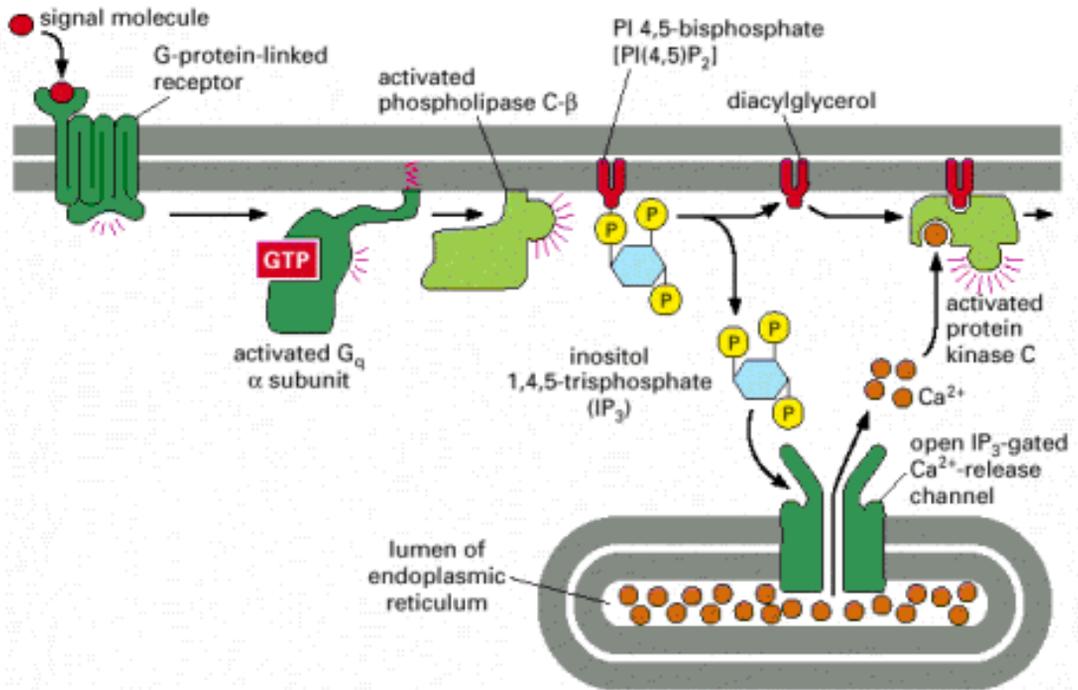


**Figure H-13 : Structures et localisation des RyRs**

(A). Représentation en dimensions des 3 isoformes des RyRs chez les mammifères. *Source: Fleischer, 2008.*

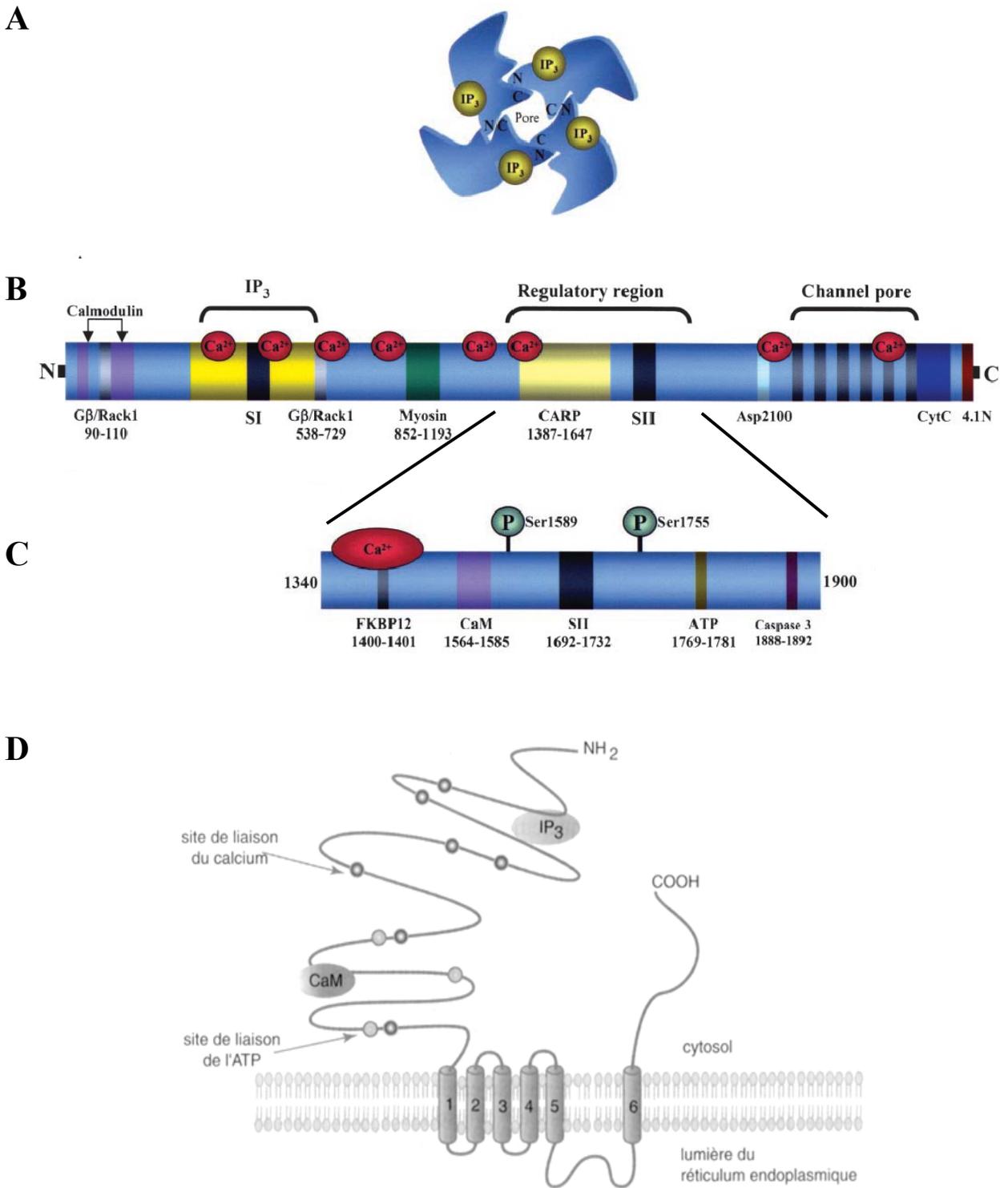
(B). Localisation des RyRs au niveau des citernes terminales du RS (SR) dans les cellules musculaires squelettiques. On visualise également la calséquestrine (Cals.), protéine du RS liant le calcium. *Source: Protasi, 2002.*

(C). Schématisation de la localisation RyRs au niveau de la triade des cellules musculaires squelettiques. *Source: Fleischer, 2008.*



**Figure H-17** : Schéma de la voie à l'IP<sub>3</sub> activant son récepteur (IP<sub>3</sub>R) localisé au niveau de la membrane du RS.

Source: Alberts et al., 2002



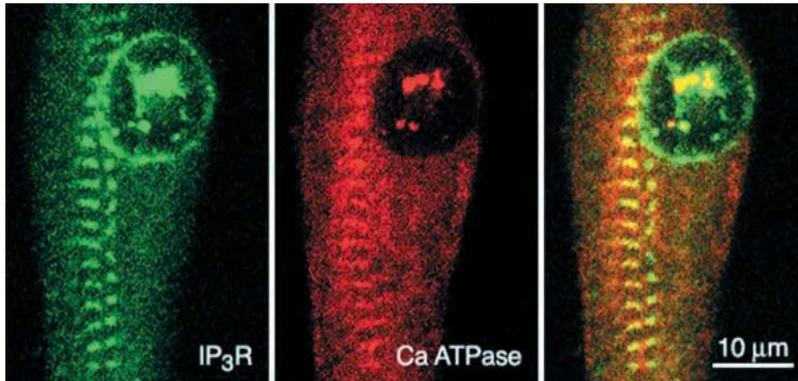
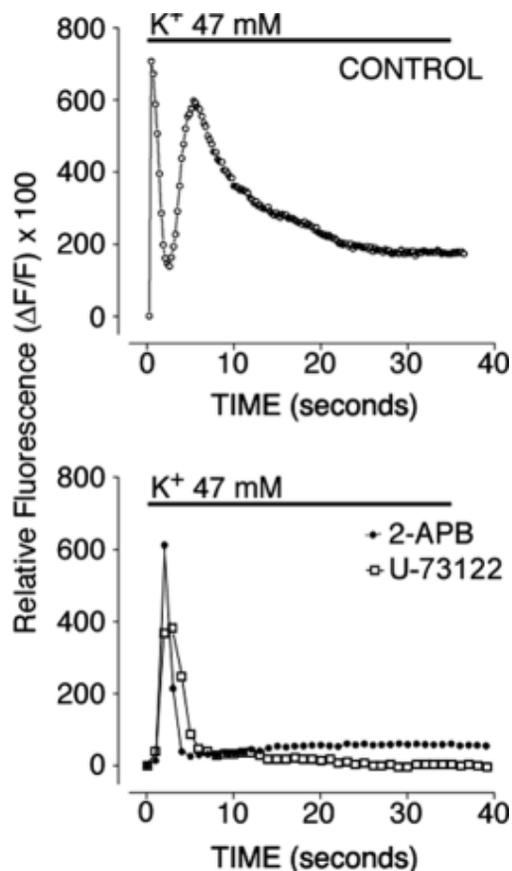
**Figure H-18 : Structure des IP3Rs.**

(A). Représentation en 3 dimensions des IP3Rs en homotétramères. *Source: Patterson et al., 2004.*

(B). Structure primaire des IP3Rs. La région du pore du canal est localisée au C-terminal, celle de liaison aux IP3 se trouve à l'extrémité N-terminale, proche des sites de fixation de la calmoduline. La région régulatrice se situe au niveau central. *Source: : Patterson et al., 2004.*

(C). Détails de la région régulatrice des IP3Rs, contenant les sites de fixation du FKBP12, de la calmoduline, de l'ATP et de la caspase 3. *Source : Patterson et al., 2004.*

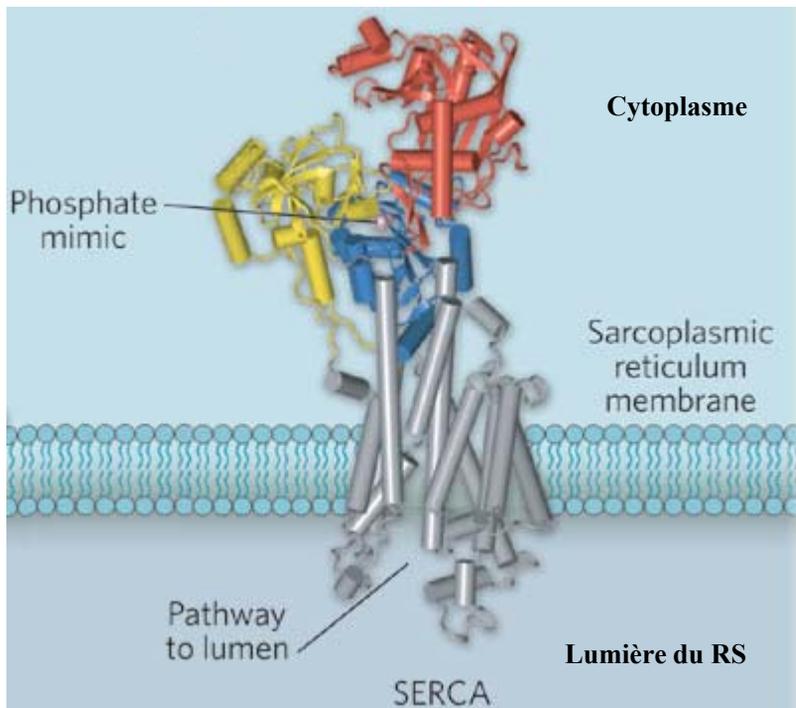
(D). Représentation schématique de la structure en 2 dimensions des IP3Rs, avec la région du pore du canal formée de 6 segments transmembranaires. *Source: www.pharma.uhp-nancy.fr/formation/ cours/msdm/Proteines%20G.pdf*

**A****B**

**Figure H-19 : Localisation des IP3Rs dans les cellules musculaires squelettiques en développement et implication de ces canaux dans les libérations calciques globales.**

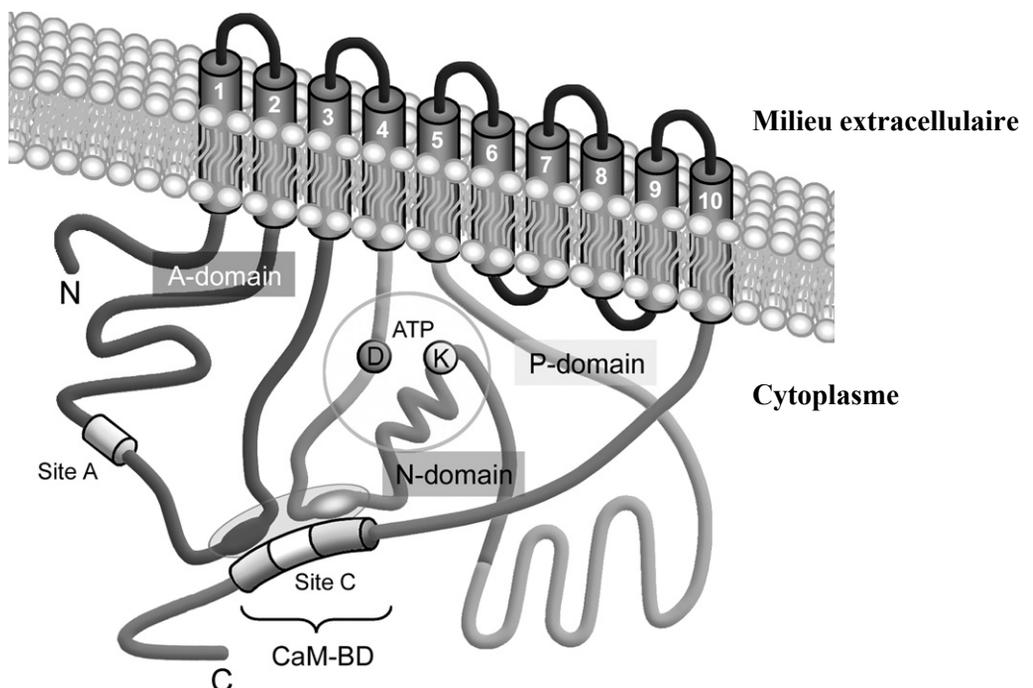
(A). Localisation des IP3Rs dans les cellules musculaires squelettiques en développement, au niveau des striations et du noyau. *Source: Powell et al., 2001.*

(B). Implication des IP3Rs dans la libération calcique globale des cellules musculaires squelettiques, après dépolarisation membranaire par une solution potassique, mise en évidence par la sonde calcique fluo-3. La 1<sup>ère</sup> phase rapide de libération calcique est due aux RyRs et la 2<sup>ème</sup> phase plus lente de libération calcique est due aux IP3Rs car cette libération est inhibée par des bloqueurs de la voie à l'IP3 (2-APB et U-73122). *Source: Powell et al., 2001.*



**Figure H-20** : Structure de la pompe calcique ATPase de la membrane du RS (SERCA).

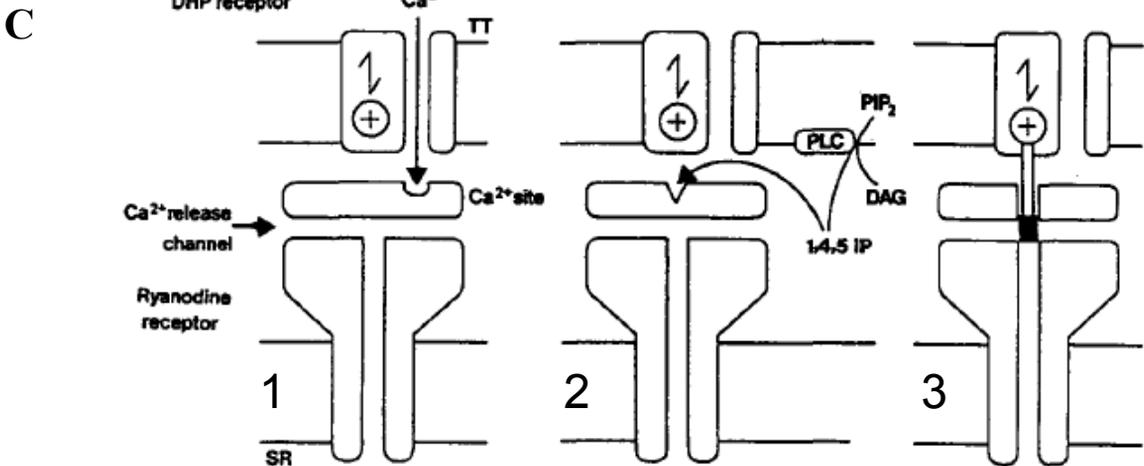
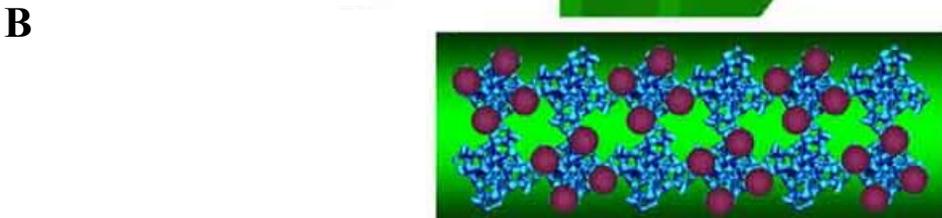
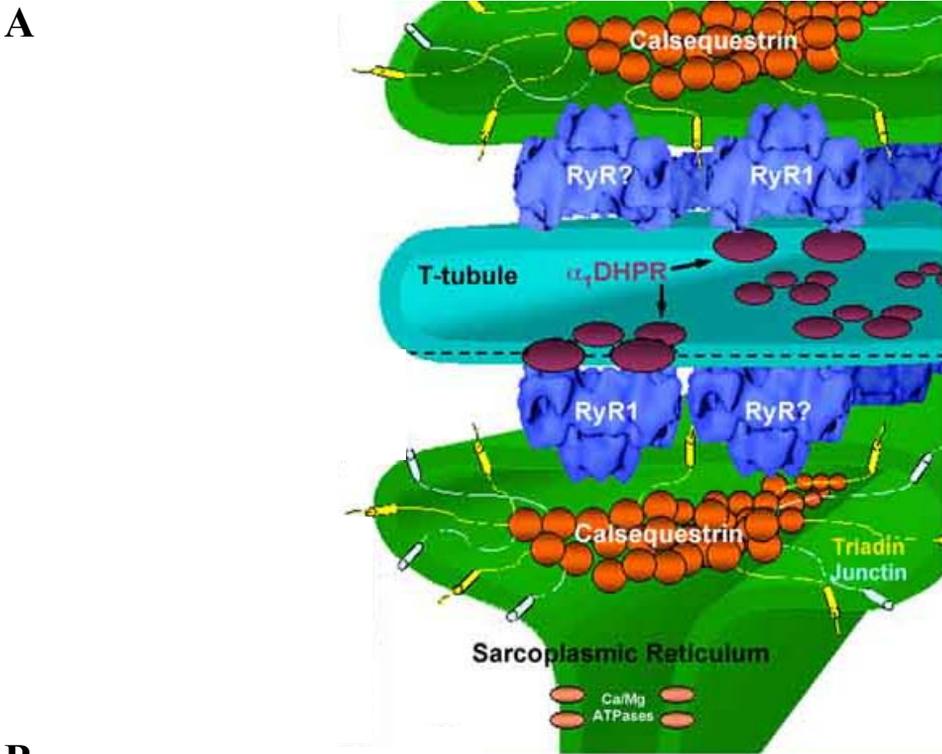
Les 10 segments transmembranaires (gris) participent à la formation du pore calcique. Les domaines rouges sont ceux impliqués dans la liaison de l'ATP ainsi que l'activité ATPase de la pompe. Les domaines bleus comportent les sites de phosphorylation de la protéine et les jaunes sont ceux qui permettent la connexion avec la région transmembranaire du domaine. *Source: Gadsby, 2007.*



**Figure H-21** : Structure en 2 dimensions de la pompe calcique ATPase du sarcolemme (PCMA).

Comme la SERCA, cette pompe calcique ATPase comporte elle aussi 10 segments transmembranaires, et des boucles cytoplasmiques possédant l'activité catalytique ATPasique ainsi que des domaines de régulation (notamment par la calmoduline, CaM).

*Source : Di Leva et al., 2008.*



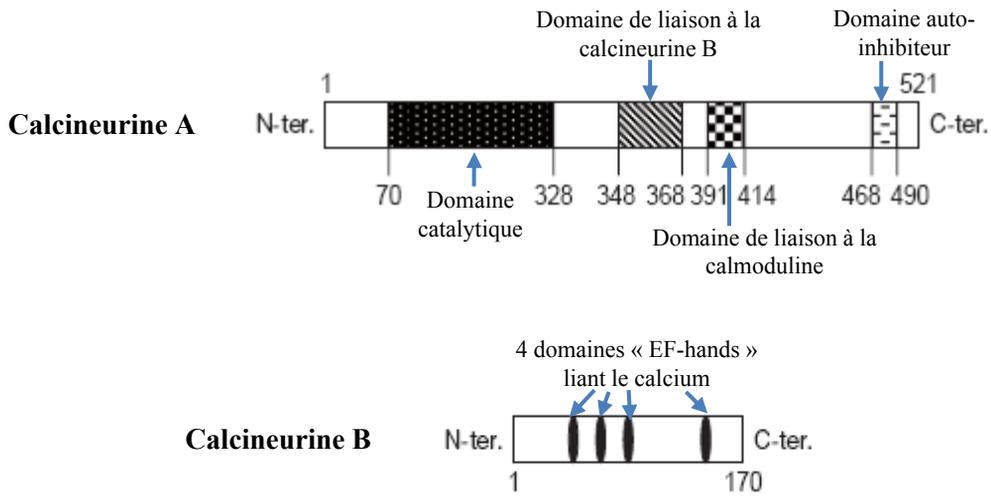
**Figure H-22 : Couplage excitation-contraction du muscle squelettique.**

(A). Représentation en 3 dimensions du couplage excitation-contraction au niveau de la triade. Les DHPRs sont regroupés en tétrades couplées aux RyRs de type I. La calséquestrine permet de concentrer le calcium à proximité des canaux calciques du RS jonctionnel. *Source: d'après Protasi, 2002.*

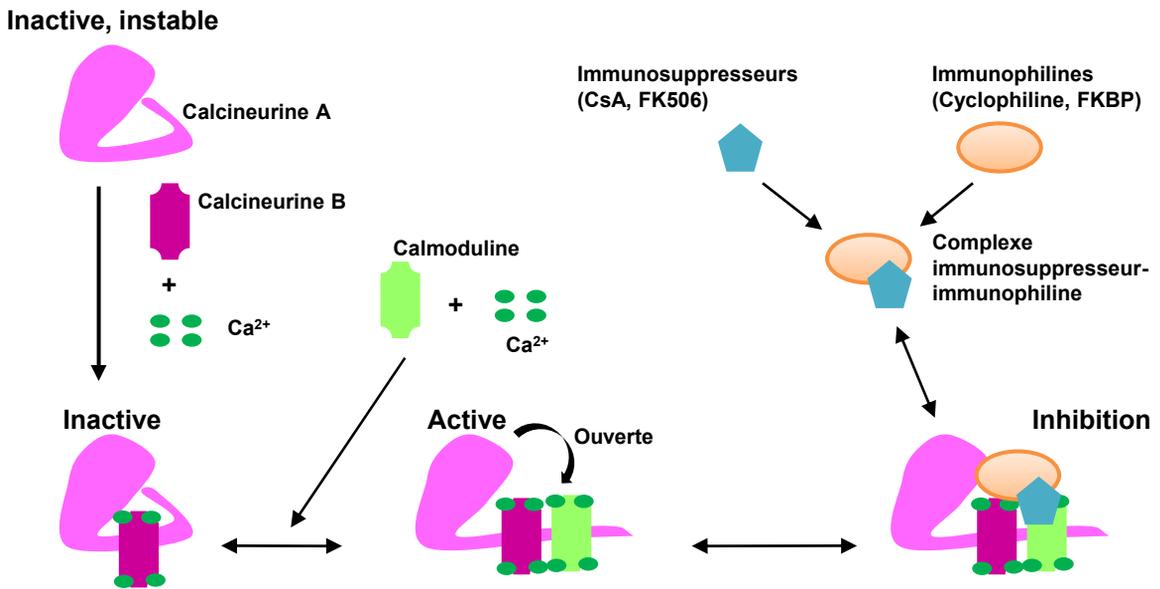
(B). Schématisation des tétrades de DHPRs couplées aux RyRs de type I dans le muscle squelettique. *Source: d'après Protasi, 2002.*

(C). Les trois hypothèses du couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique. 1: couplage par CICR. 2: couplage médié par un 2<sup>nd</sup> messager (l'IP<sub>3</sub>). 3: couplage médié par un lien mécanique direct. *Source : Melzer et al., 1995.*

A



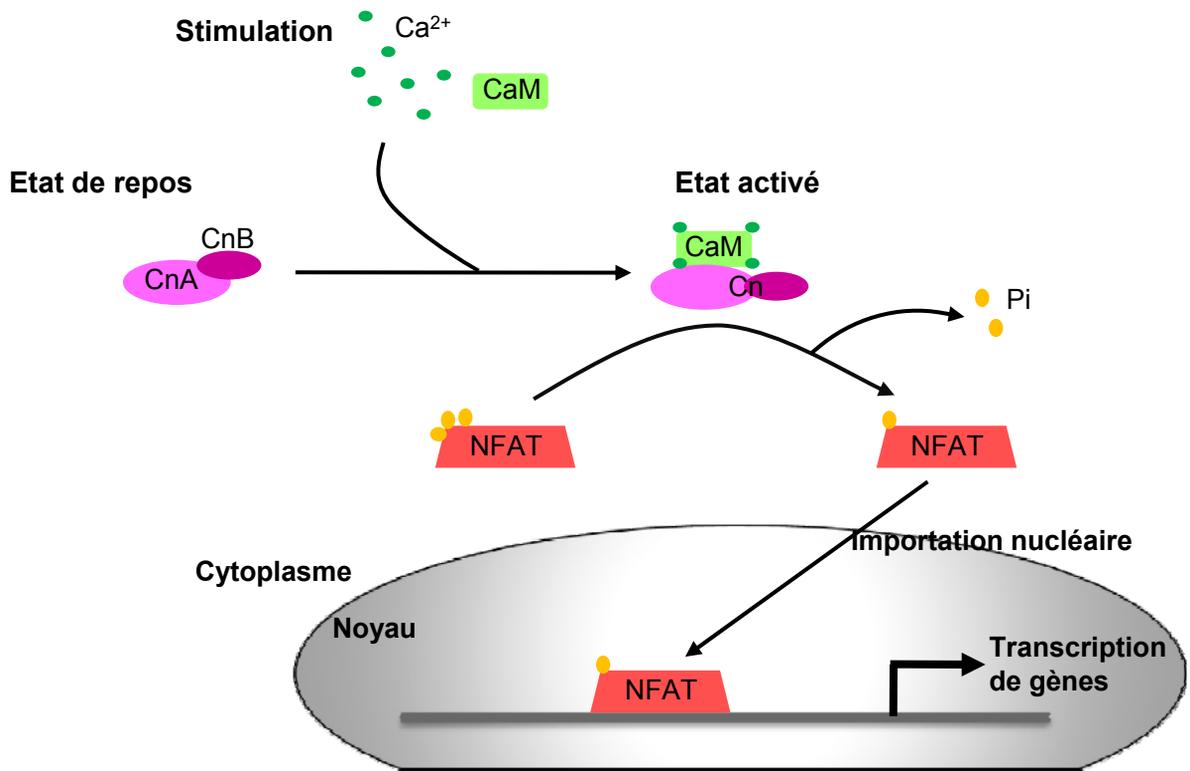
B



**Figure H-23 : Structure mode de fonctionnement de la calcineurine.**

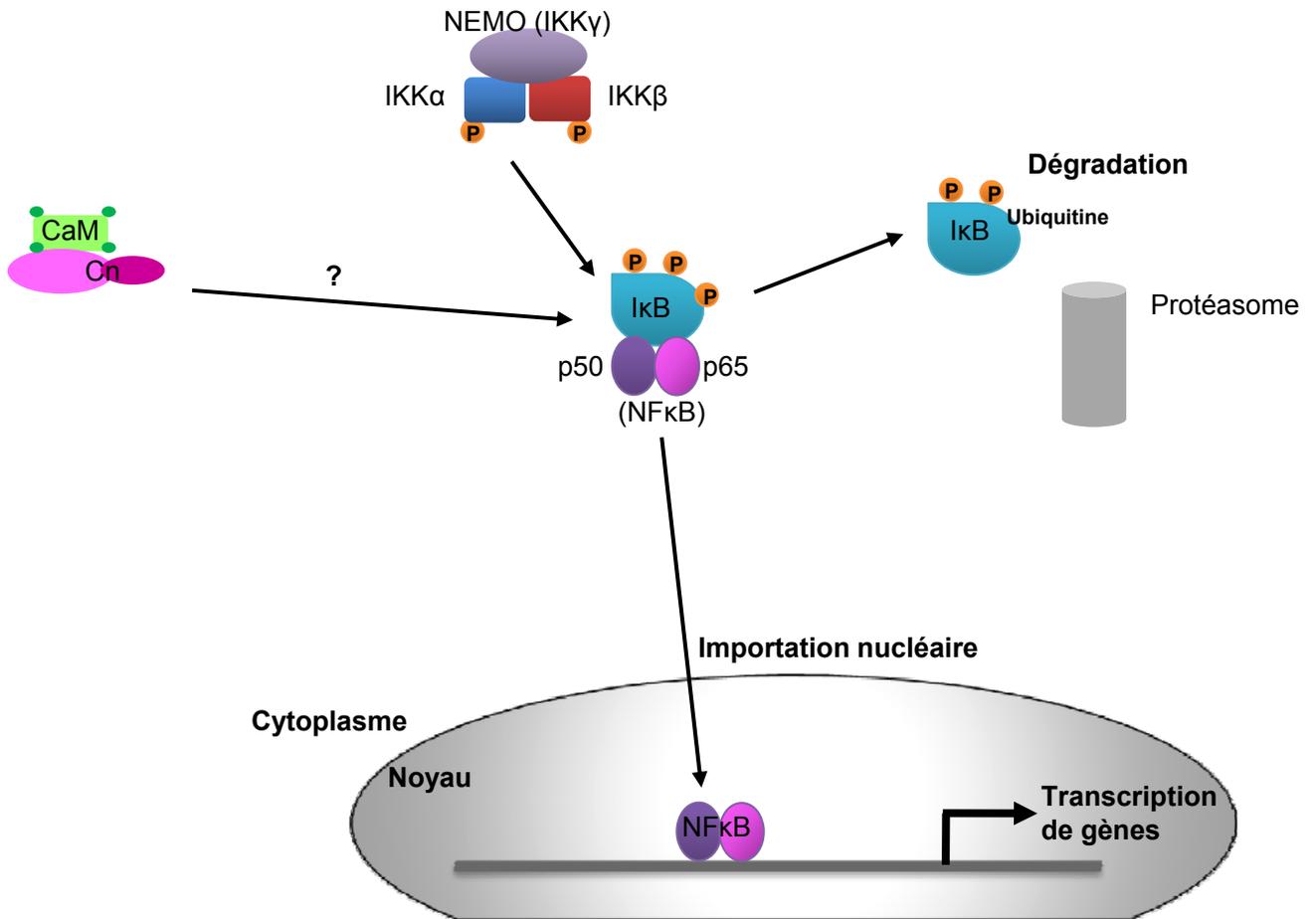
(A). Structure de la calcineurine A et B. *Source: d'après Wu et al., 2007.*

(B). Mode d'action de la calcineurine. La calcineurine A seule est inactive mais instable. La calcineurine B fixe le calcium et se lie à la calcineurine A, la stabilisant dans sa forme inactive. La fixation de la calmoduline sur le dimère de calcineurine exhibe le site catalytique de la calcineurine, qui devient alors active. Les immunosuppresseurs tels que la cyclosporine A (CsA) ou le FK506 se lient à leurs récepteurs cytoplasmiques (les immunophilines) et ces complexes ainsi formés inhibent l'activité phosphatase de la calcineurine.



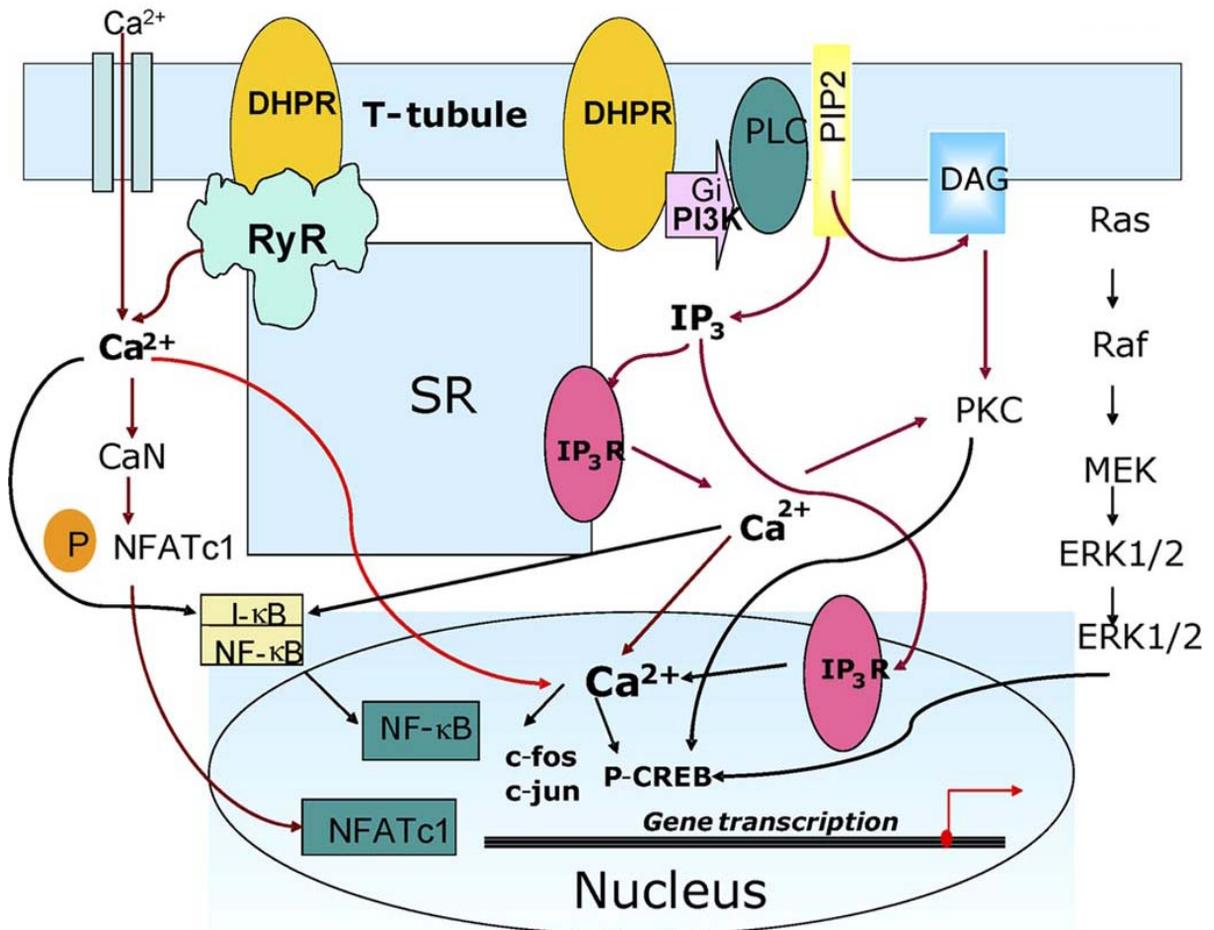
**Figure H-24 : Mode d'activation du NFAT.**

A l'état de repos, la calcineurine A et la calcineurine B (CnA et CnB) sont inactivées. Lors d'une stimulation, le calcium libéré va se fixer à la calmoduline (CaM) qui va se lier à la calcineurine et l'activer. La calcineurine active peut alors déphosphoryler le NFAT, lui permettant de migrer dans le noyau de la cellule et d'activer la transcription de gènes cibles.



**Figure H-25 : Une des voies d'activation du NFκB.**

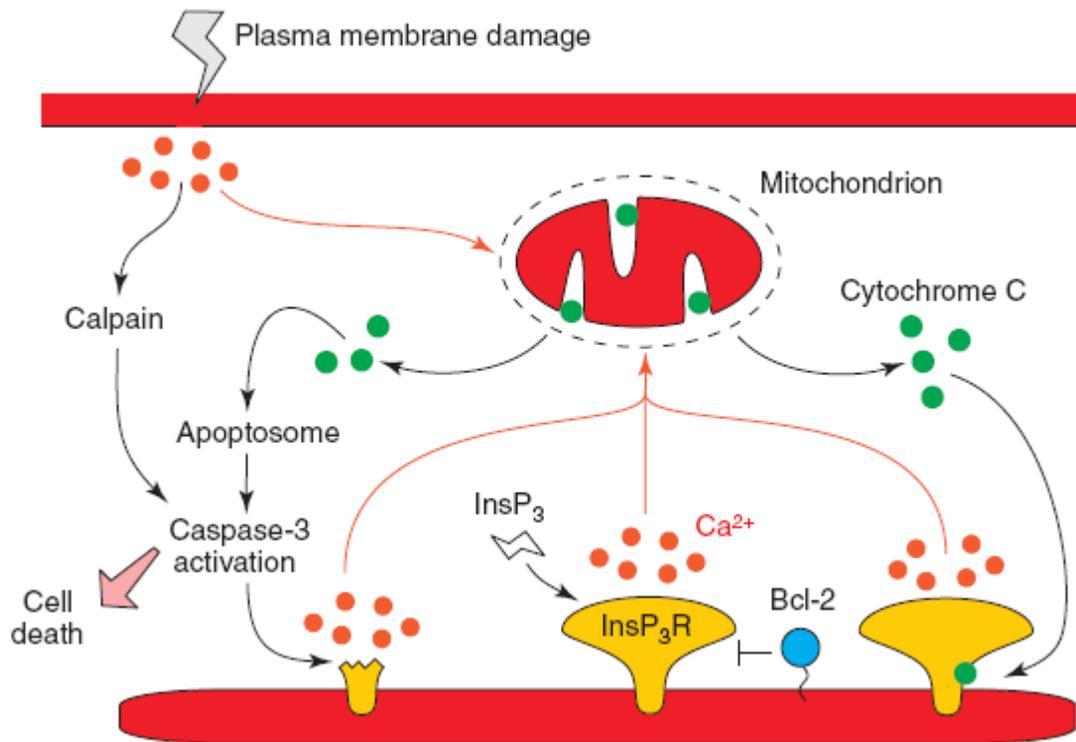
L'activation du NFκB se fait par la levée de l'inhibition de la protéine IκB via le complexe IKK. IκB est alors dirigée vers la dégradation, alors que NFκB activé peut migrer dans le noyau et activer la transcription de gènes. L'activation de NFκB peut également se faire par le complexe calcineurine/calmoduline.



**Figure H-26 : Schéma récapitulatif de l'activation par le calcium des voies NFAT et NFκB dans les cellules musculaires en développement.**

Source: d'après Valdés et al., 2008.

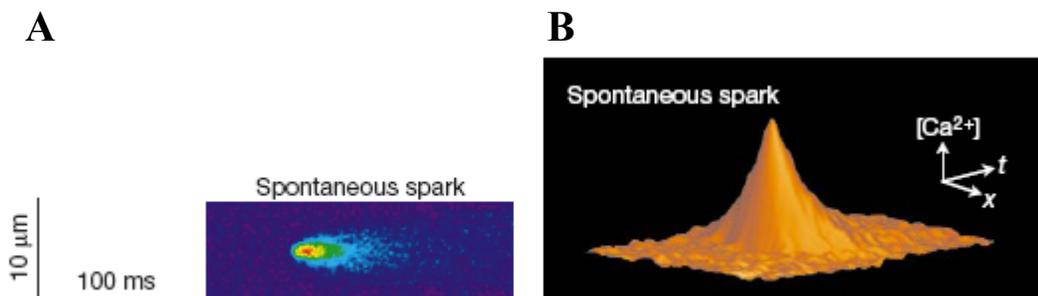
Lors de la dépolarisation membranaire, il y a activation des DHPRs et des RyRs, provoquant une libération massive de calcium dans le cytoplasme. Ce calcium peut également provenir de canaux situés au niveau du sarcolemme mais aussi des IP3Rs du RS. L'activation et la translocation du NFAT dans le noyau est engendrer par le calcium provenant du milieu extracellulaire et des RyRs. En revanche, le calcium nécessaire à l'activation et la translocation de NFκB provient des RyRs et des IP3Rs. Le calcium libéré par les IP3Rs peut activer d'autres voies de signalisation comme la voie ERK. .



**Figure H-27 : Implication des IP3R-1 dans la mort cellulaire.**

La libération massive de calcium par les IP3Rs peut provoquer une surcharge calcique et donc la libération du cytochrome c dans le cytoplasme par les mitochondries. Ceci contribue à l'activation de la caspase-3, clivant les IP3Rs, maintenant le canal dans une conformation d'ouverture permanente. De plus, le cytochrome c peut aussi se fixer aux IP3Rs, engendrant l'activation de ceux-ci et donc la libération de calcium. Ces phénomènes contribuent à l'accélération du processus de mort cellulaire.

Source: Hanson et al., 2004.

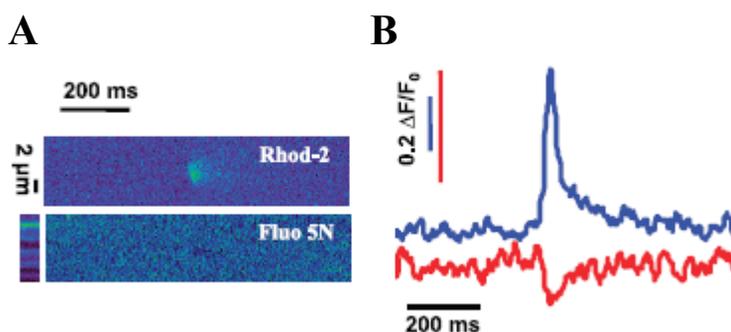


**Figure H-28** : Exemple de « sparks » dans les myocytes ventriculaires de rat.

(A). Visualisation en 2 dimensions (x,t: x pour la distance et t pour le temps) d'un spark spontané dans un myocyte de rat à l'état de repos.

(B). Représentation en 3 dimensions de l'évènement visualisé en (A).

Source : Wang et al., 2001.



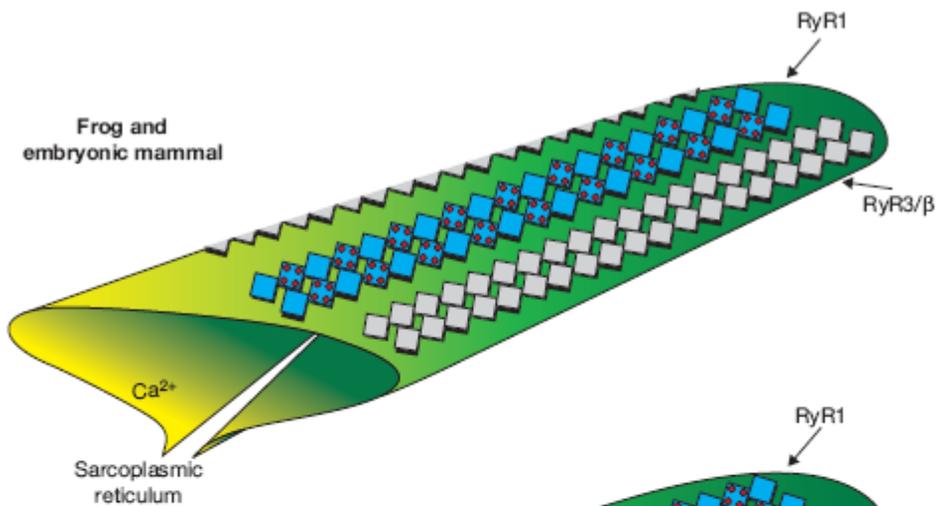
**Figure H-29** : Exemple de « sparks » et de « blinks » (ou skraps).

(A). Visualisation en 2 dimensions x,t d'un spark (haut) et d'un blink correspondant (déplétion de calcium dans le RS) (bas).

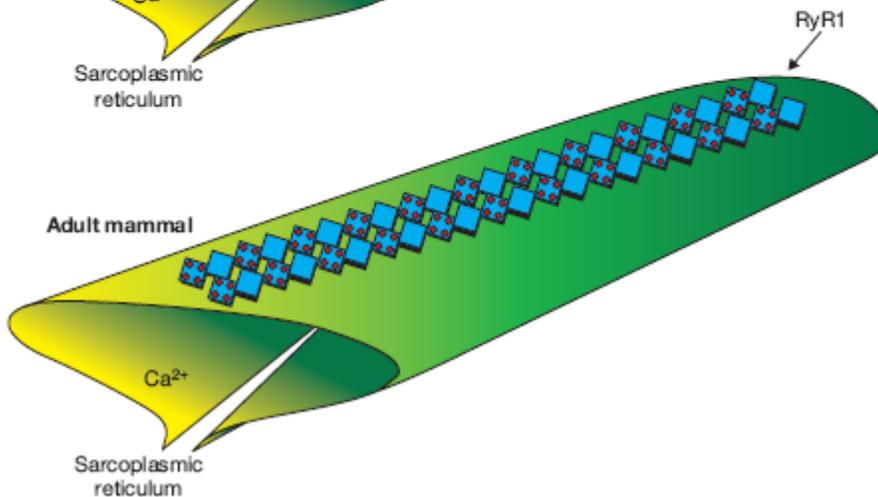
(B). Représentation en 2 dimensions (temps, intensité de fluorescences) des évènements visualisés en (A). La courbe bleue représente la libération de calcium dans le cytoplasme et la courbe rouge représente la déplétion du RS en calcium.

Source : Cheng et Lederer, 2008.

**A**



**B**

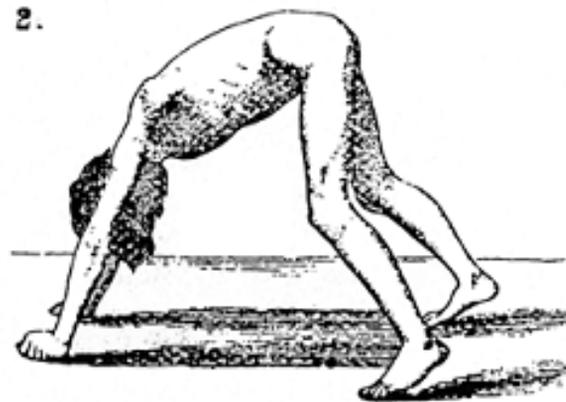
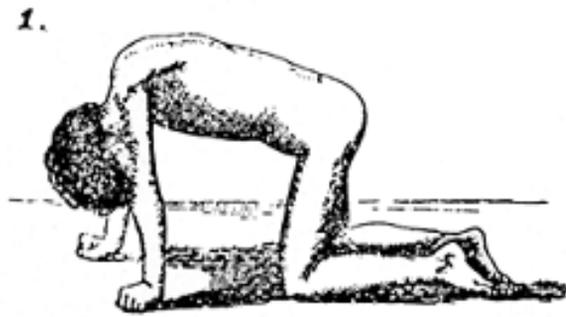


**Figure H-30** : Localisation des différentes isoformes de RyRs dans les cellules musculaires d'amphibien et de mammifère.

Source : Ward et Lederer, 2005.

(A). Dans les cellules musculaires des amphibiens, les RyR1 sont couplés aux DHPRs (points rouges) et les RyR3 sont localisés en périphérie (localisation parajonctionnelle), non couplés aux DHPRs, qui seraient à l'origine des sparks spontanés.

(B). Dans les cellules musculaires de mammifères adultes, il n'y a pas de RyR3 localisés en périphérie, ce qui expliquerait l'absence de sparks spontanés.

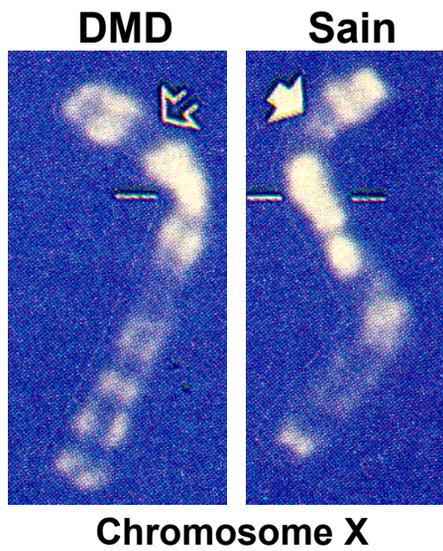


— Mode of rising from the ground  
in pseudo-hypertrophic paralysis.

**Figure H-32 :** Méthode dite de « Gower », utilisée par l'enfant atteint de DMD pour se relever.

Source: d'après le site [archimede.bibl.ulaval.ca](http://archimede.bibl.ulaval.ca)

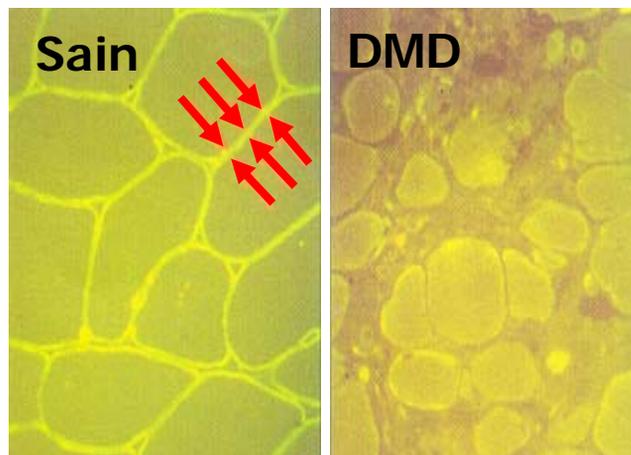
**A**



**B**



**C**

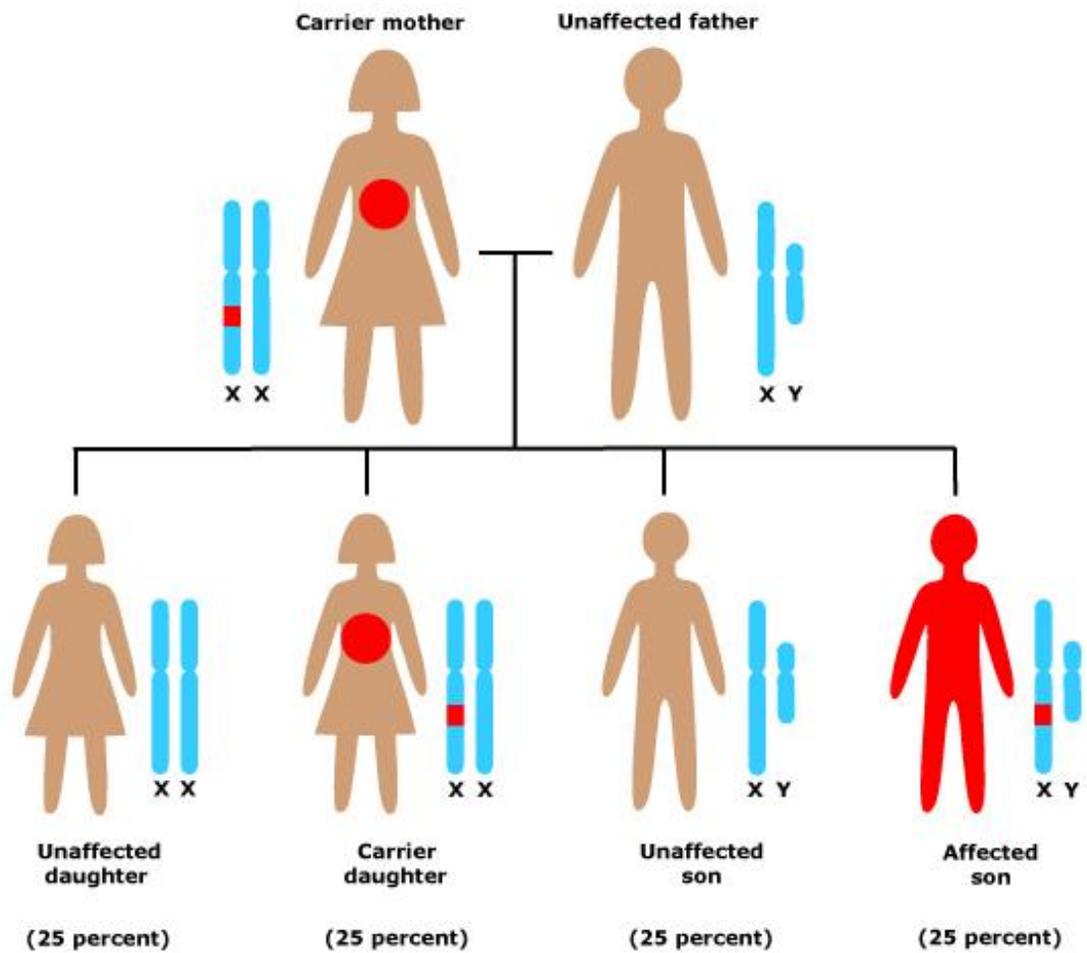


**Figure H-33 : Origine de la DMD, la dystrophine.**

(A). Visualisation du gène de la dystrophine porté par le chromosome X, chez un sujet DMD et un sujet sain.

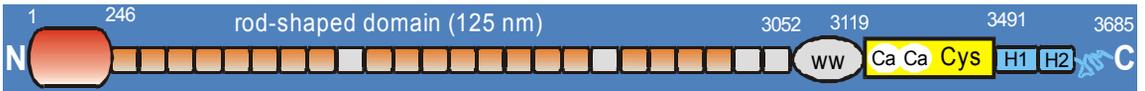
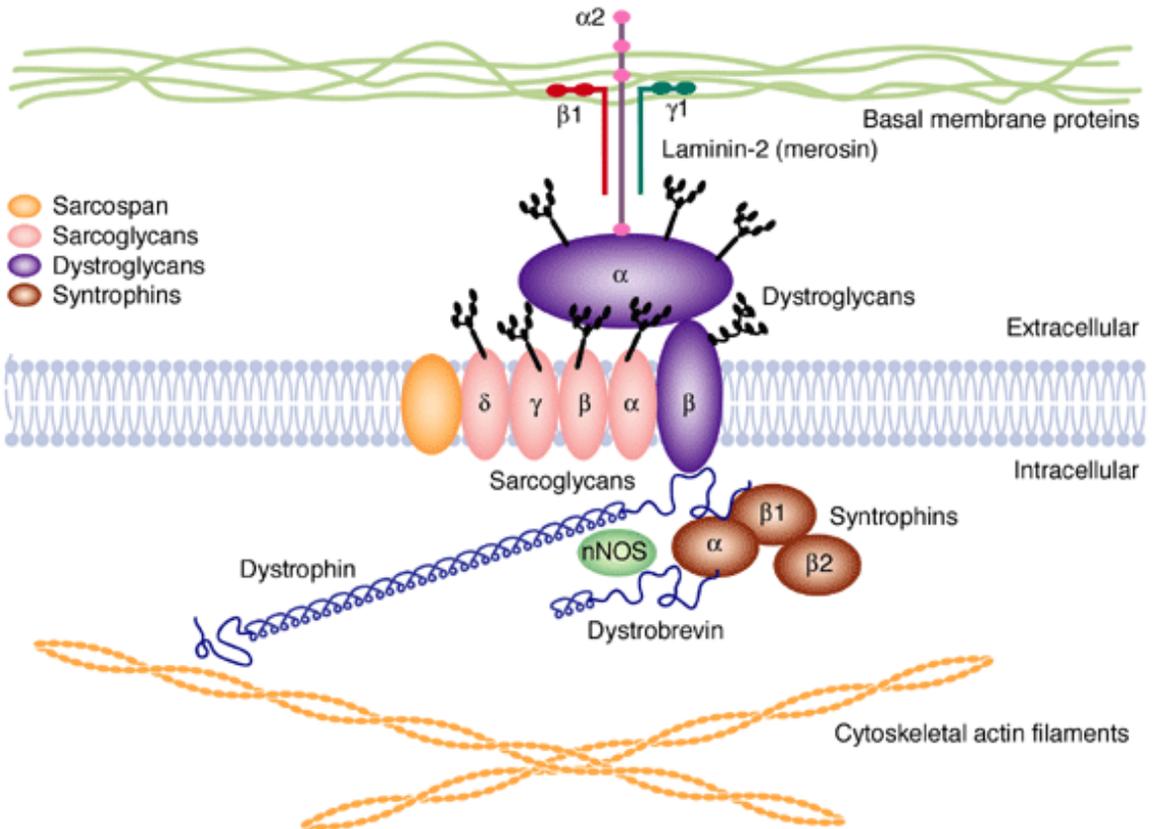
(B). Produit du gène: la protéine dystrophine.

(C). Localisation sous-membranaire de la dystrophine dans les cellules musculaires squelettiques.



**Figure H-34 :** Mode de transmission de la mutation du gène codant pour la dystrophine dans la DMD.

Source : [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)

**A****B**

### Dystrophin protein structure and interactions

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2002 Cambridge University Press

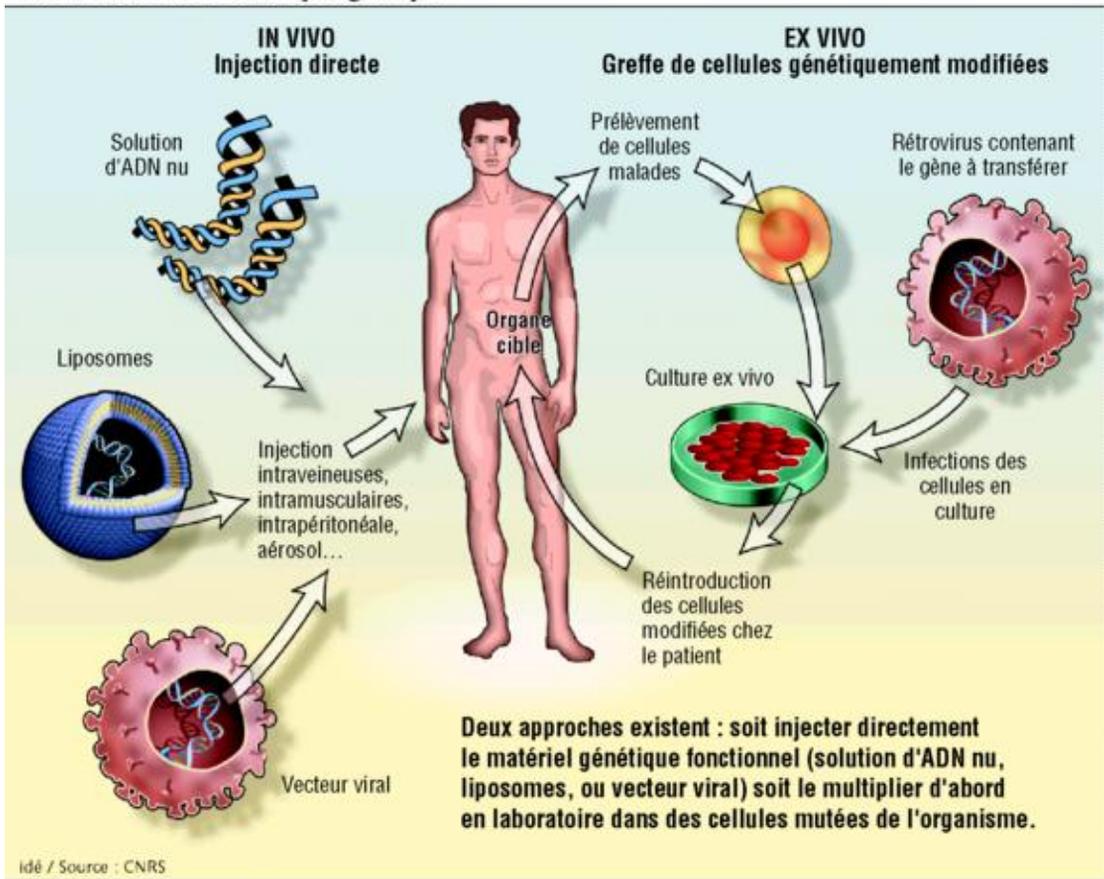
**Figure H-36 : Structure de la dystrophine et de son complexe protéique associé.**

(A). Structure de la dystrophine..

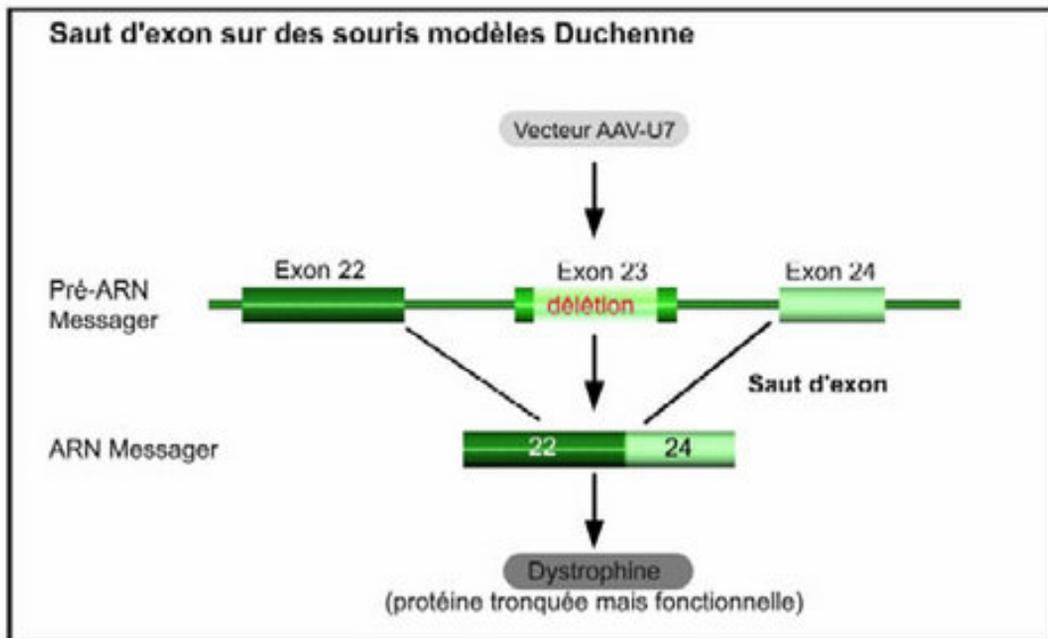
(B). Composition et localisation du complexe protéique associé à la dystrophine.

Source : *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2002.

## Les 2 voies de la thérapie génique

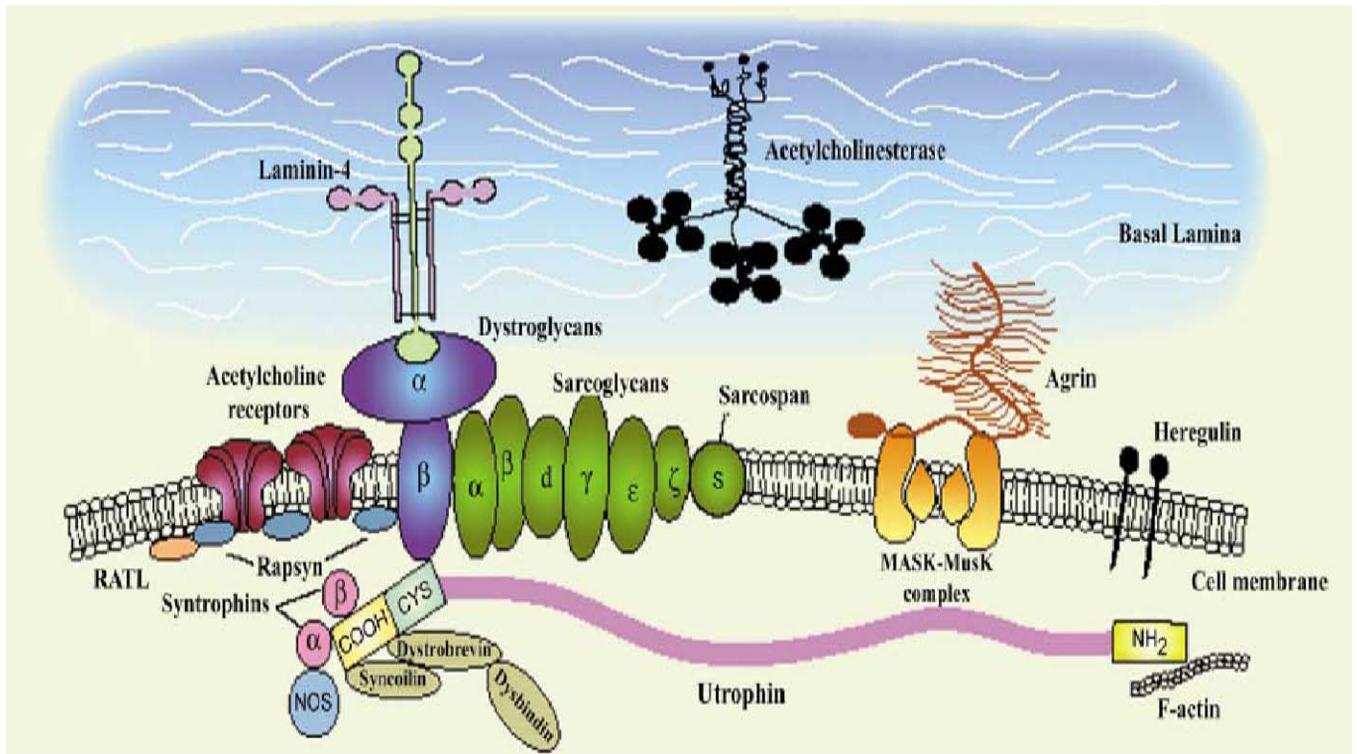


**Figure H-37** : Les deux approches de la thérapie génique.



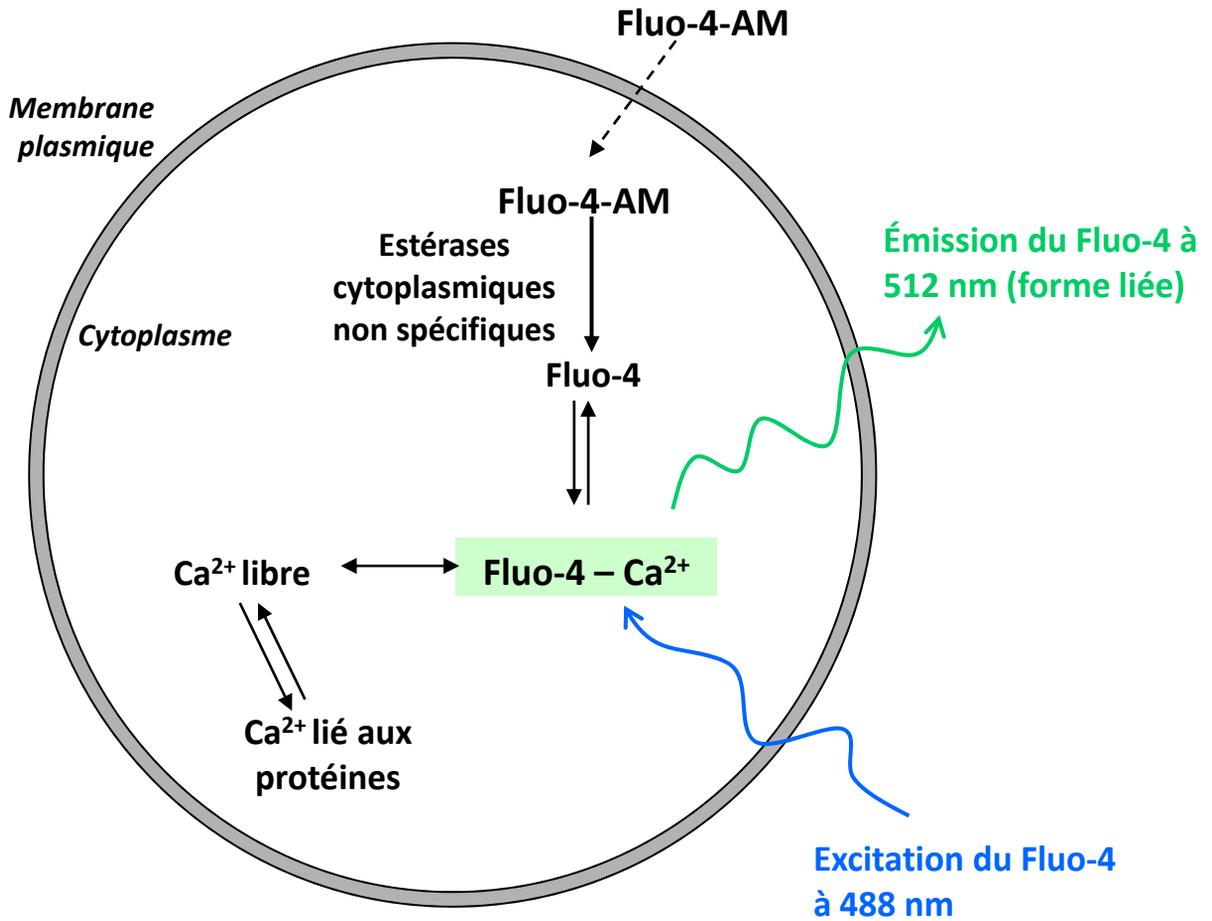
**Figure H-38 : Principe du saut d'exon dans la DMD.**

Source : [www.futura\\_sciences.com](http://www.futura_sciences.com)

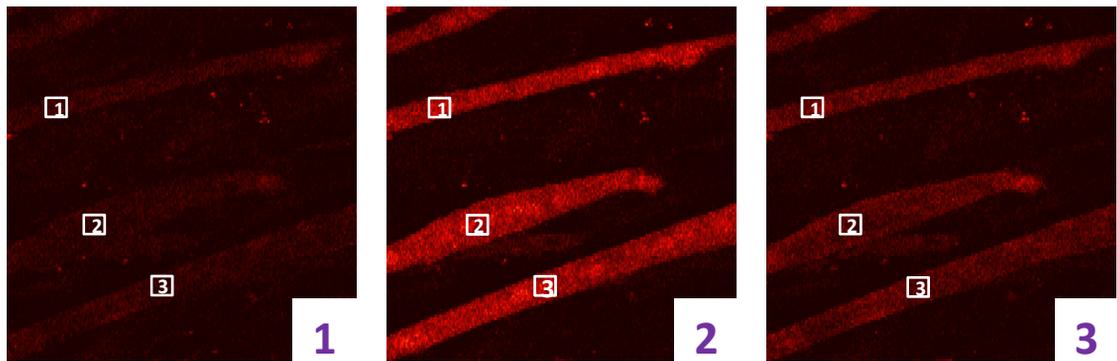
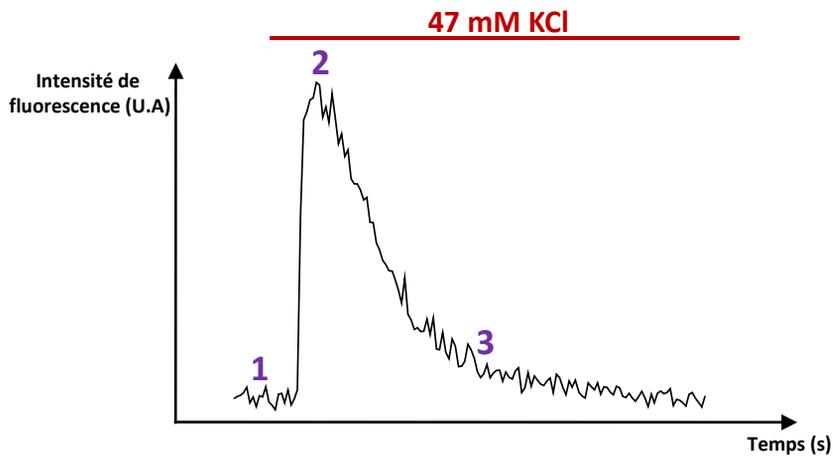


**Figure H-39 : L'utrophine**

L'utrophine est une protéine homologue à la dystrophine et localisée sous la membrane plasmique au niveau de la jonction neuromusculaire.



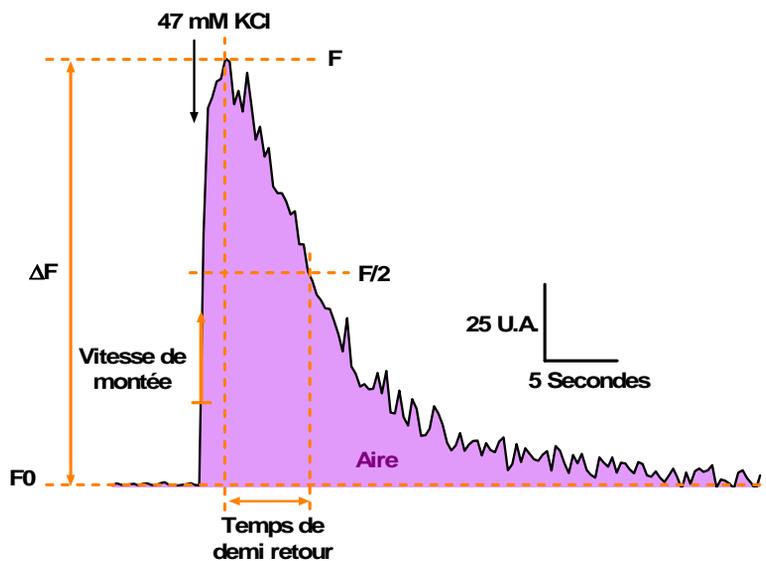
**Figure MM-1:** Principe de la détection du calcium intracellulaire par la sonde Fluo-4-AM

**A****B**

**Figure MM-2: Principe de l'enregistrement des libérations globales de calcium**

(A). Exemples d'images de fluorescence obtenues lors des libérations globales de calcium. Les régions d'intérêt (1, 2 et 3) sont placées sur les myotubes. Les images 1, 2 et 3 correspondent à trois étapes de l'enregistrement : l'état basal (1), au maximum de l'intensité de fluorescence (2) et lors du retour à l'état basal (3).

(B). Exemple de tracé représentant la variation de fluorescence en fonction du temps d'une région d'intérêt.



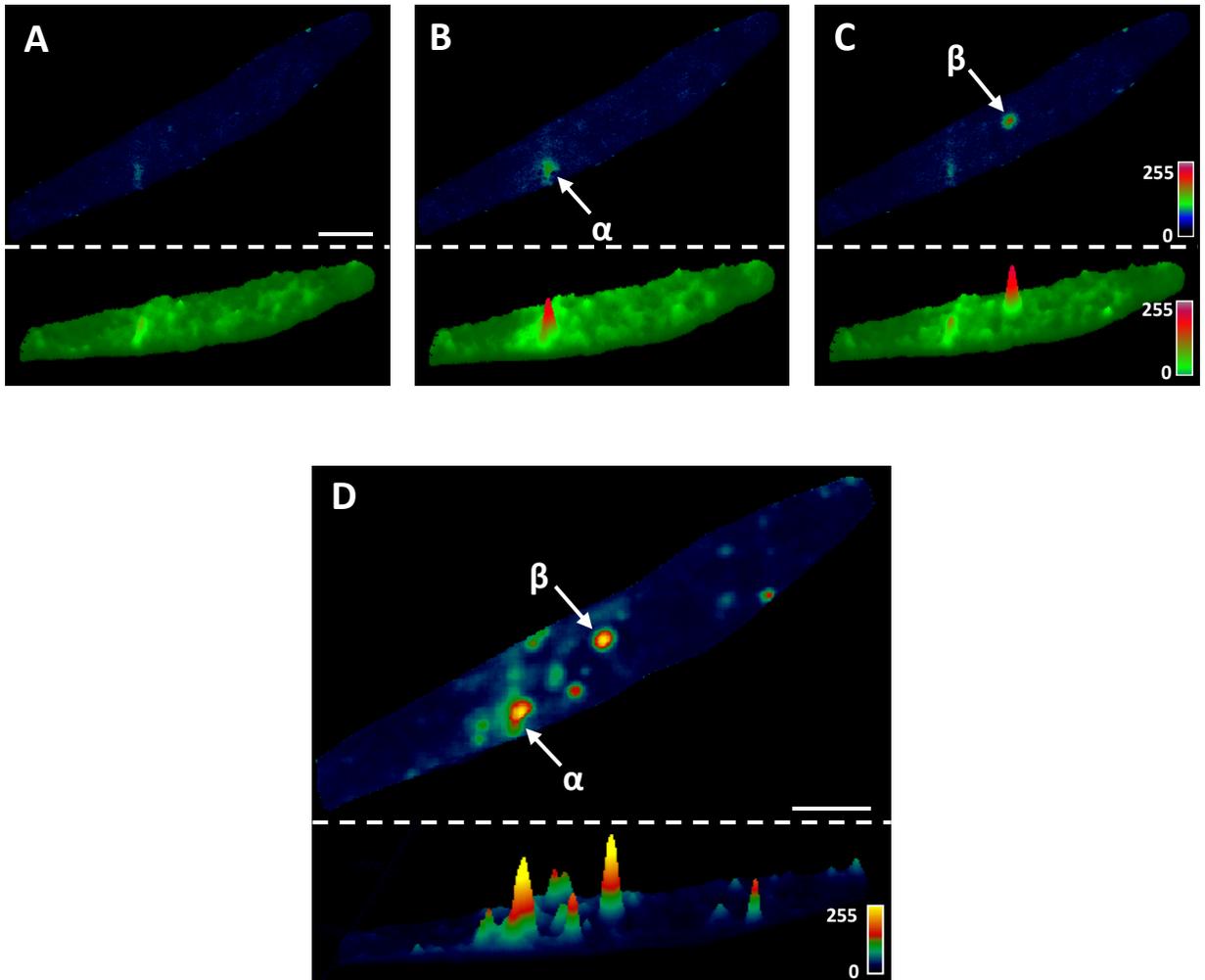
**Figure MM-3 : Tracé représentant la libération calcique lors de la dépolarisation membranaire et les différents paramètres analysés**

	Lignées cellulaires (myotubes)	Cultures primaires de souris mdx et B110 (myotubes)	Fibres musculaires squelettiques de souris mdx et B110
<b>Dépolarisations KCl</b>	2-APB 50 $\mu$ M – 30 mins XeC 5 $\mu$ M – 20 mins Rya 100 $\mu$ M – 10 mins CsA 10 et 100 $\mu$ M – 30 mins CsA 300 nM – 16 h Cyp 170 nM – 16 h VIVIT 1 $\mu$ M – 16h	2-APB 50 $\mu$ M - 30 mins Rya 100 $\mu$ M – 10 mins	
<b>Libérations calciques spontanées localisées</b>	2-APB 50 $\mu$ M – 30 mins CsA 100 nM, 1, 10 et 100 $\mu$ M – 30 mins		
<b>Décageage de calcium</b>		2-APB 100 $\mu$ M – 30 mins	2-APB 50 $\mu$ M – 30 mins

**Tableau T-2 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés en fonction des différentes préparations biologiques et des différents enregistrements calciques**

	Fluo-4-AM	NP-EGTA-AM
<b>Cultures primaires</b>	3 $\mu$ M – 20 mins	5 $\mu$ M – 20 mins
<b>Fibres</b>	1,5 $\mu$ M – 15 mins	5 $\mu$ M – 1 h

**Tableau T-3 : Concentrations et temps de charge du Fluo-4-AM et du NP-EGTA-AM en fonction des préparations biologiques**

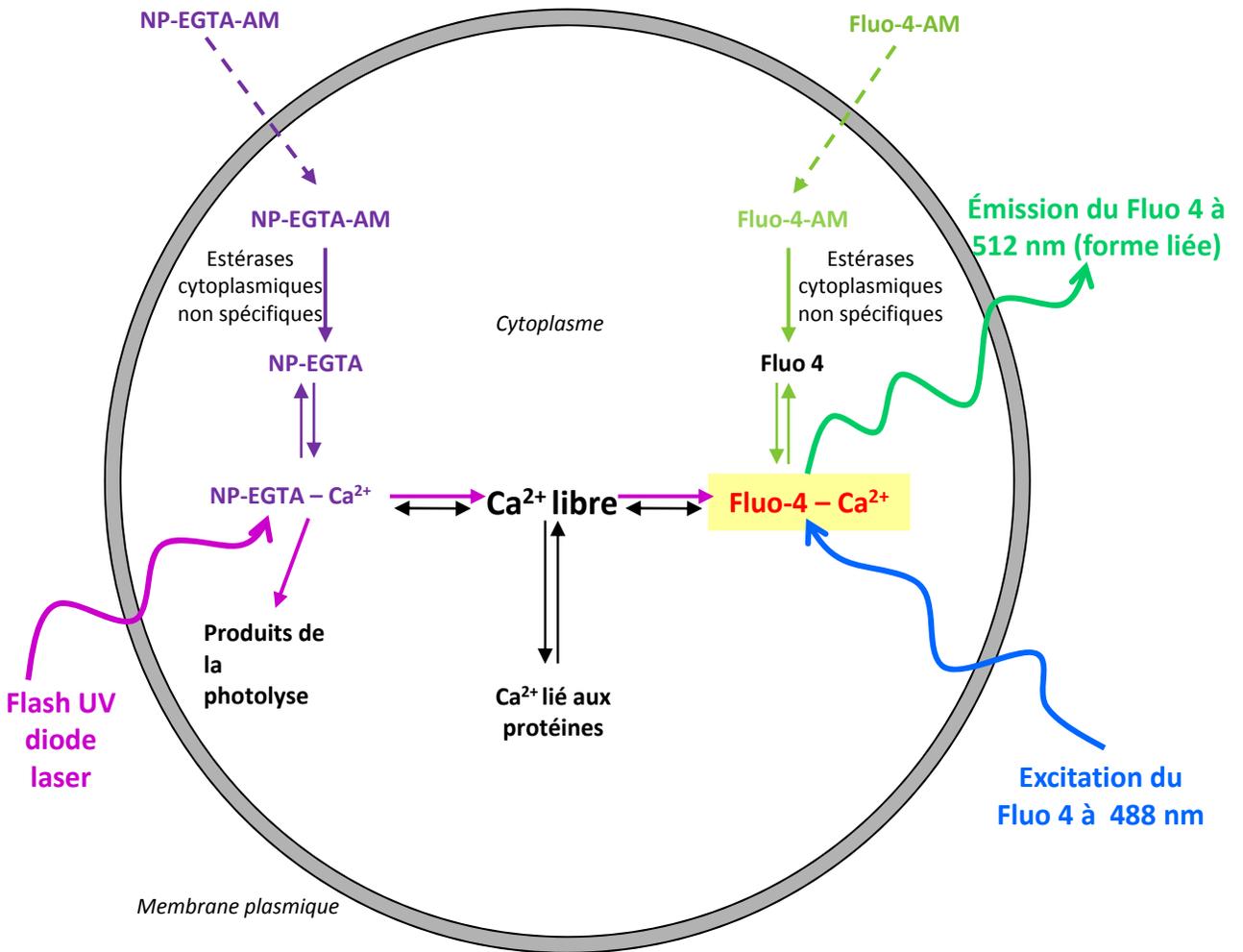


**Figure MM-4 : Principe de la détermination de la densité de « sparks »**

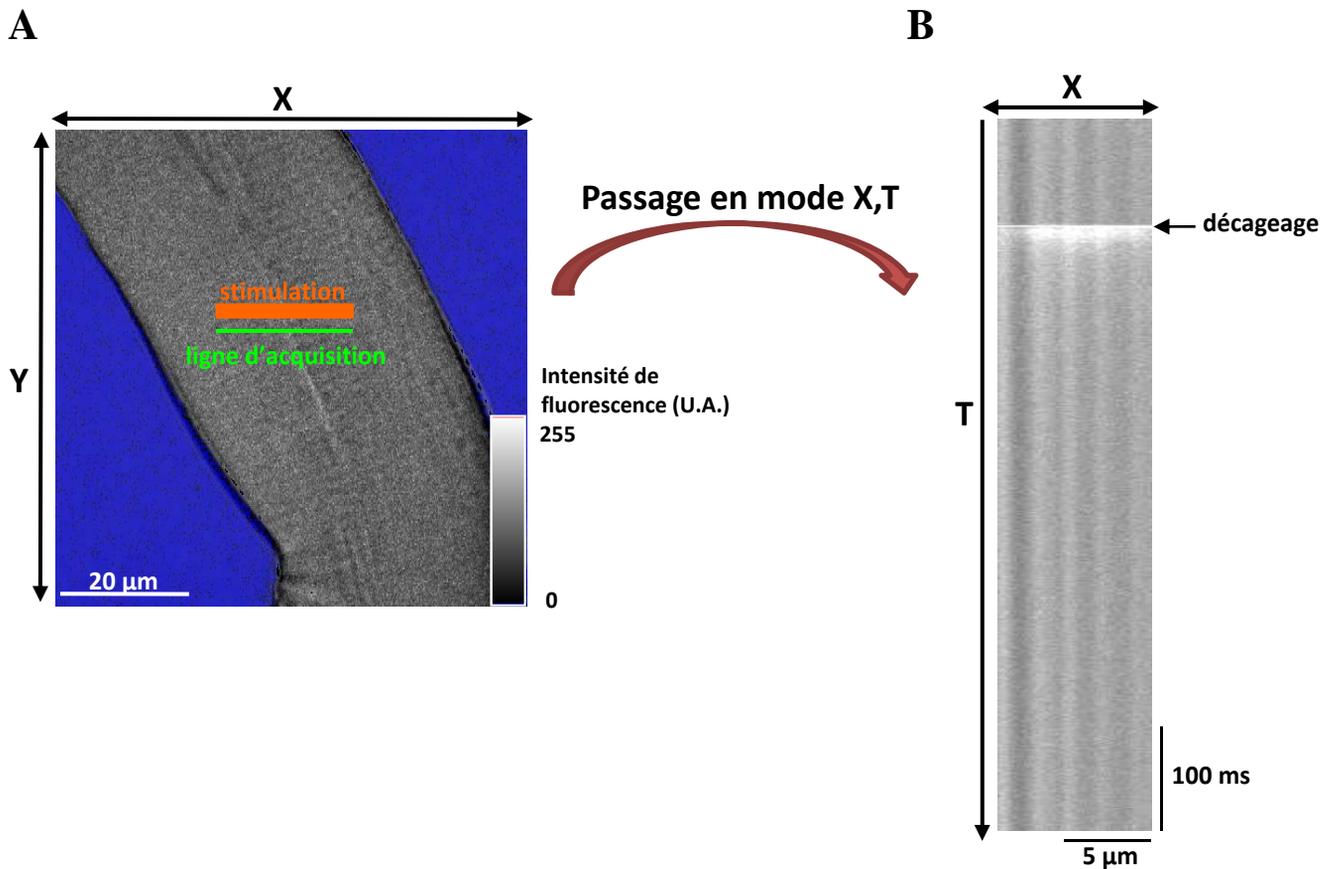
(A-C). Les figures 3A-C représentent des exemples de 3 images différentes extraites de la même séquence d'acquisition. Les « spots » de fluorescence correspondent à un évènement de libération calcique dans un myotube ( $\alpha$  et  $\beta$ ).

(D). Image reflétant la déviation standard compilée de toutes les images de la séquence sur laquelle sont visualisés les sites de libération  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que quatre autres sites plus petits.

Echelle : 30  $\mu$ m



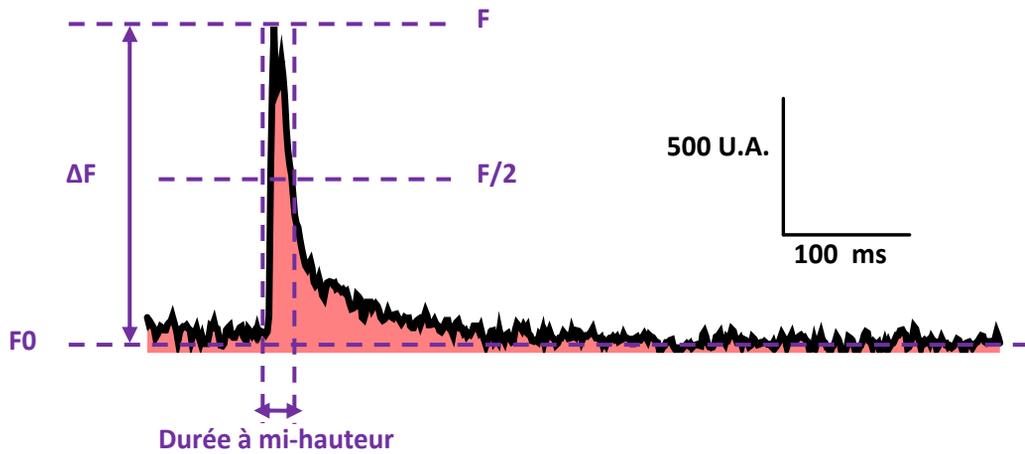
**Figure MM-5** : Principe du décaage de calcium du NP-EGTA-AM par l'UV et de sa détection par le Fluo-4-AM



**Figure MM-6 : Acquisition en X,T lors du décaage de calcium**

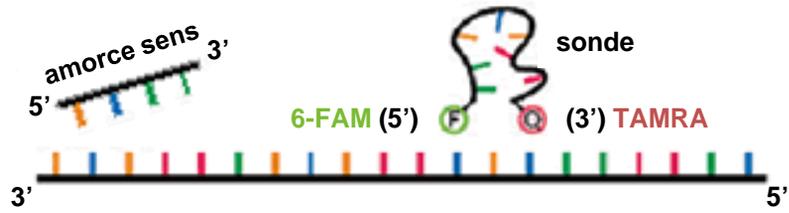
(A). Image en X,Y du champ d'acquisition. La ligne d'acquisition est placée à proximité de la zone de stimulation.

(B). Image recrée lors du mode en X,T. Les deux dimensions sont X (largeur de la ligne d'acquisition en μm) et le temps (T en millisecondes).

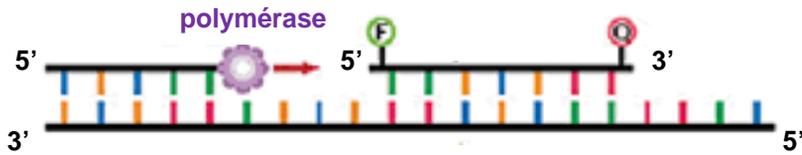


**Figure MM-7 : Exemple d'un profil obtenu lors du décaageage de calcium en mode X,T et les paramètres analysés.**

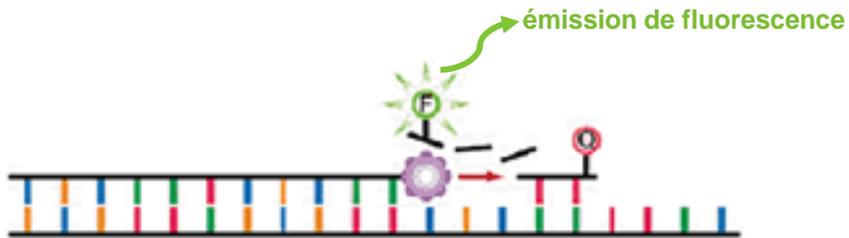
# 1. Dénaturation



# 2. Hybridation de l'amorce et de la sonde



# 3. Elongation



# 4. Fin de cycle et détection de la fluorescence

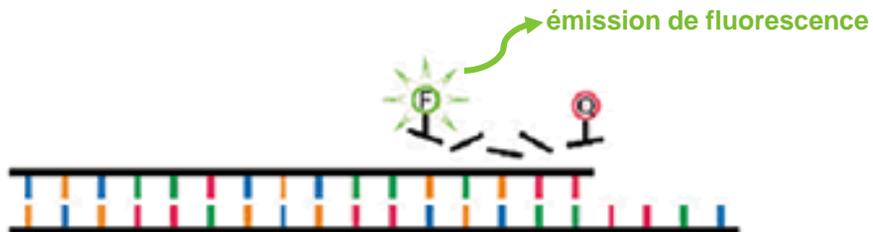
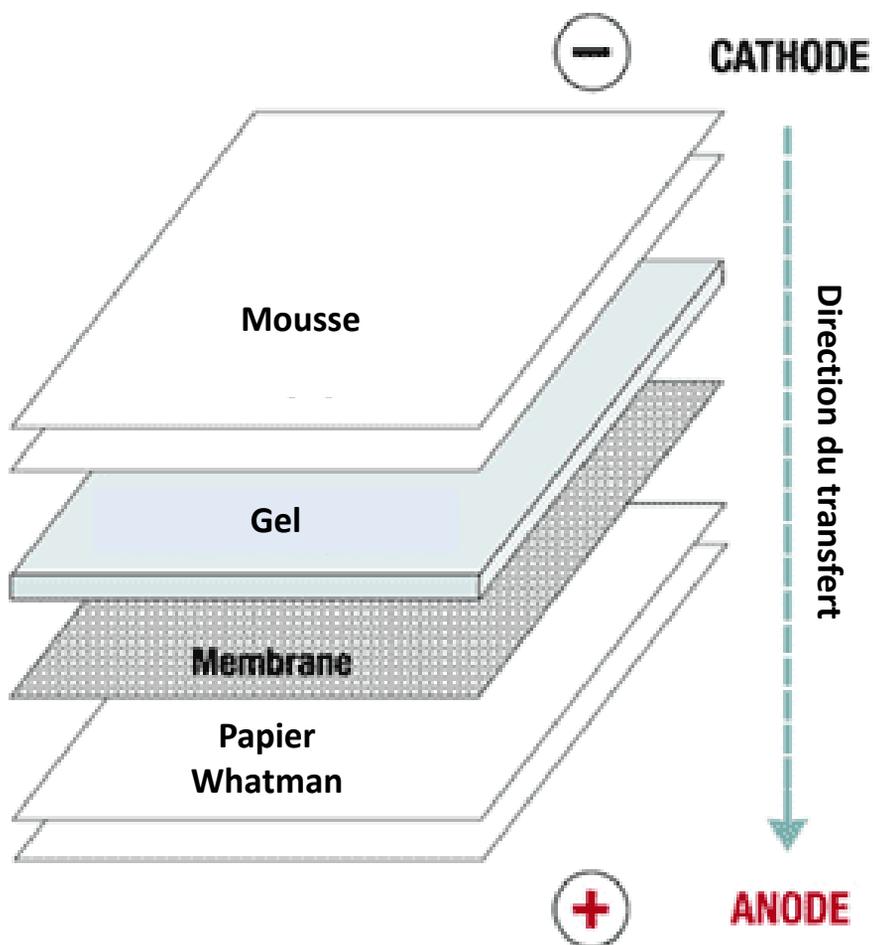
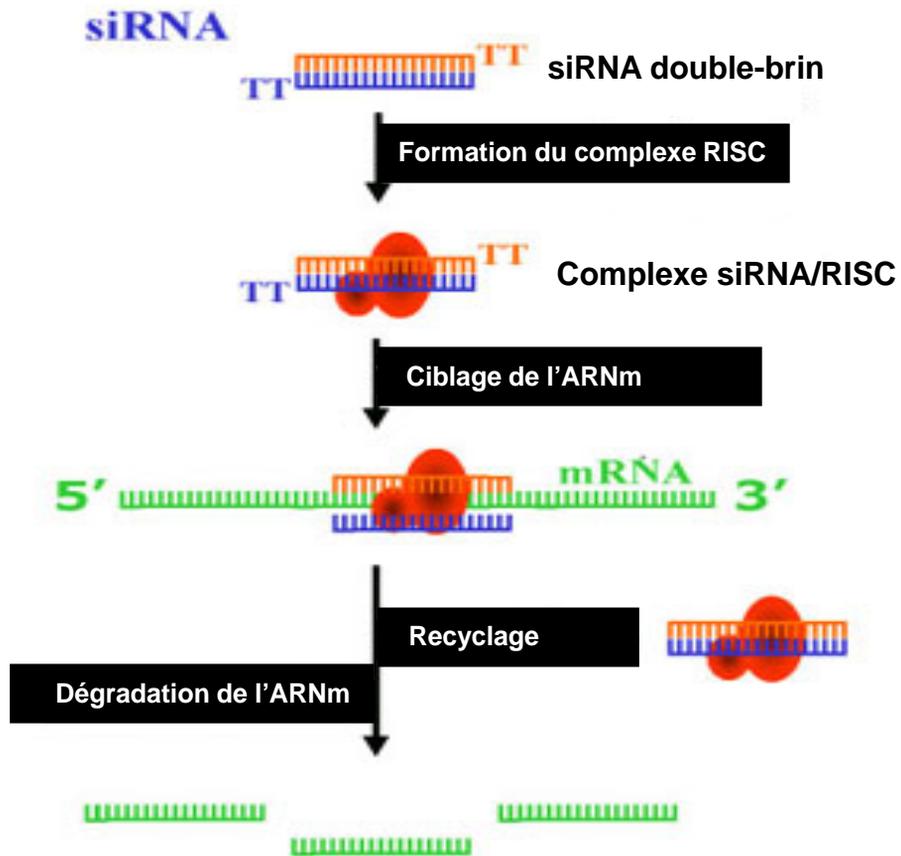


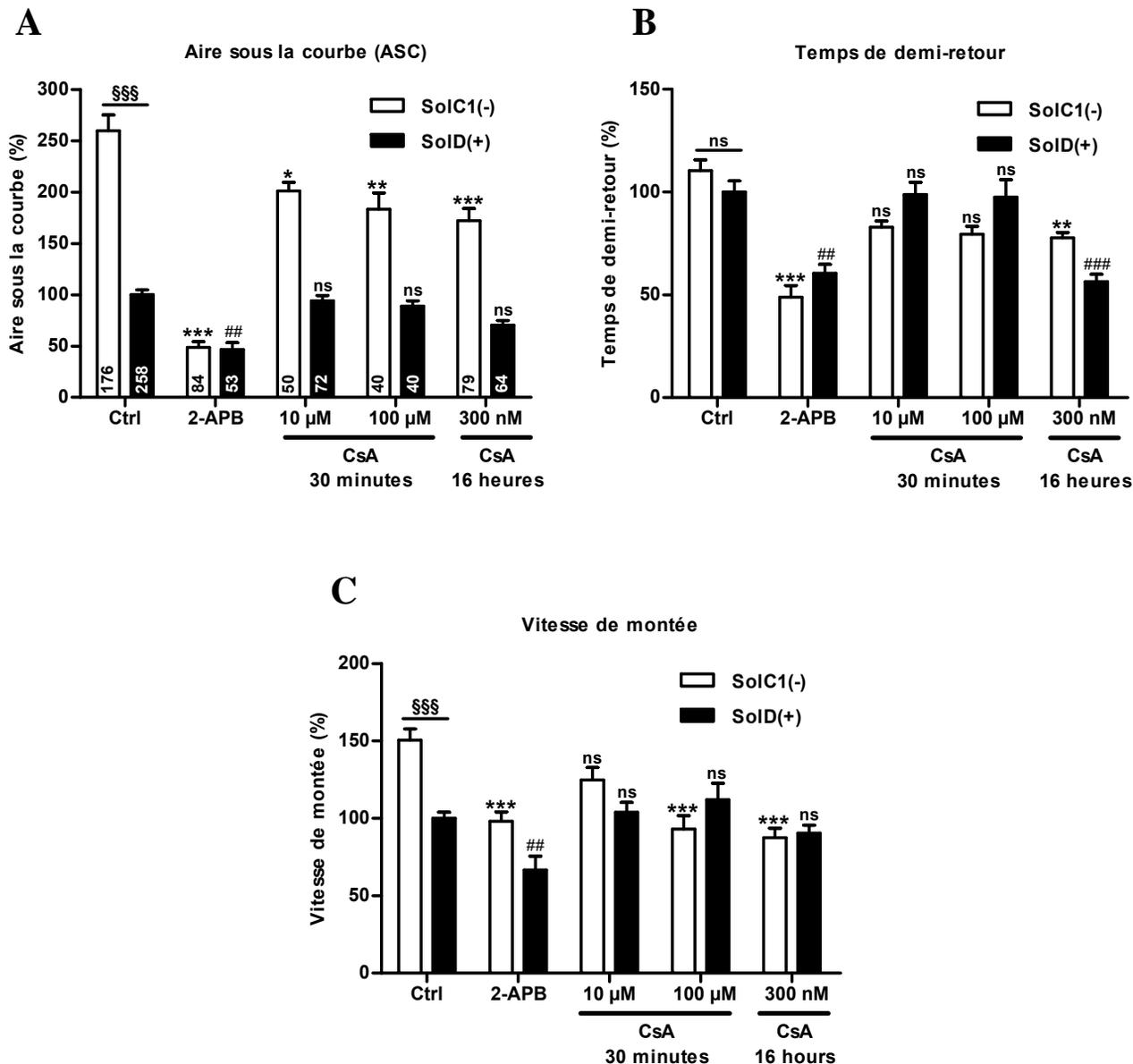
Figure MM-8 : Les différentes étapes de la PCR quantitative



**Figure MM-9** : Schéma de montage de l'électro-transfert des protéine sur membrane de nitrocellulose



**Figure MM-10** : Principe général de l'ARN interférence



**Figure R-1** : Effet du 2-APB et de la cyclosporine A sur les valeurs des paramètres cinétiques lors de la libération calcique globale.

Deux protocoles de traitement sont utilisés. Une incubation à court terme (30 minutes) est effectuée avec 50  $\mu\text{M}$  de 2-APB ainsi qu'avec 10  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  de cyclosporine A (CsA). Une incubation à long terme (16 heures) est appliquée en présence de 300 nM de CsA. Les expériences sont effectuées à D4 (4 jours après la mise en fusion).

L'aire sous la courbe (A), le temps de demi-retour (B) et la vitesse de montée (C) de la libération calcique globale après dépolarisation membranaire sont représentés par des histogrammes, en valeurs relatives aux SolD(+) en condition contrôle (100%). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de chaque paramètre pour les différents types cellulaires et traitements.

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. SolC1(-) contrôle. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$  et \*\*\*:  $P < 0.001$  pour SolC1(-) contrôle vs. chacune des conditions de SolC1(-). ##:  $P < 0.01$  et ###:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. chacune des conditions de SolD(+). ns: non significativement différent.

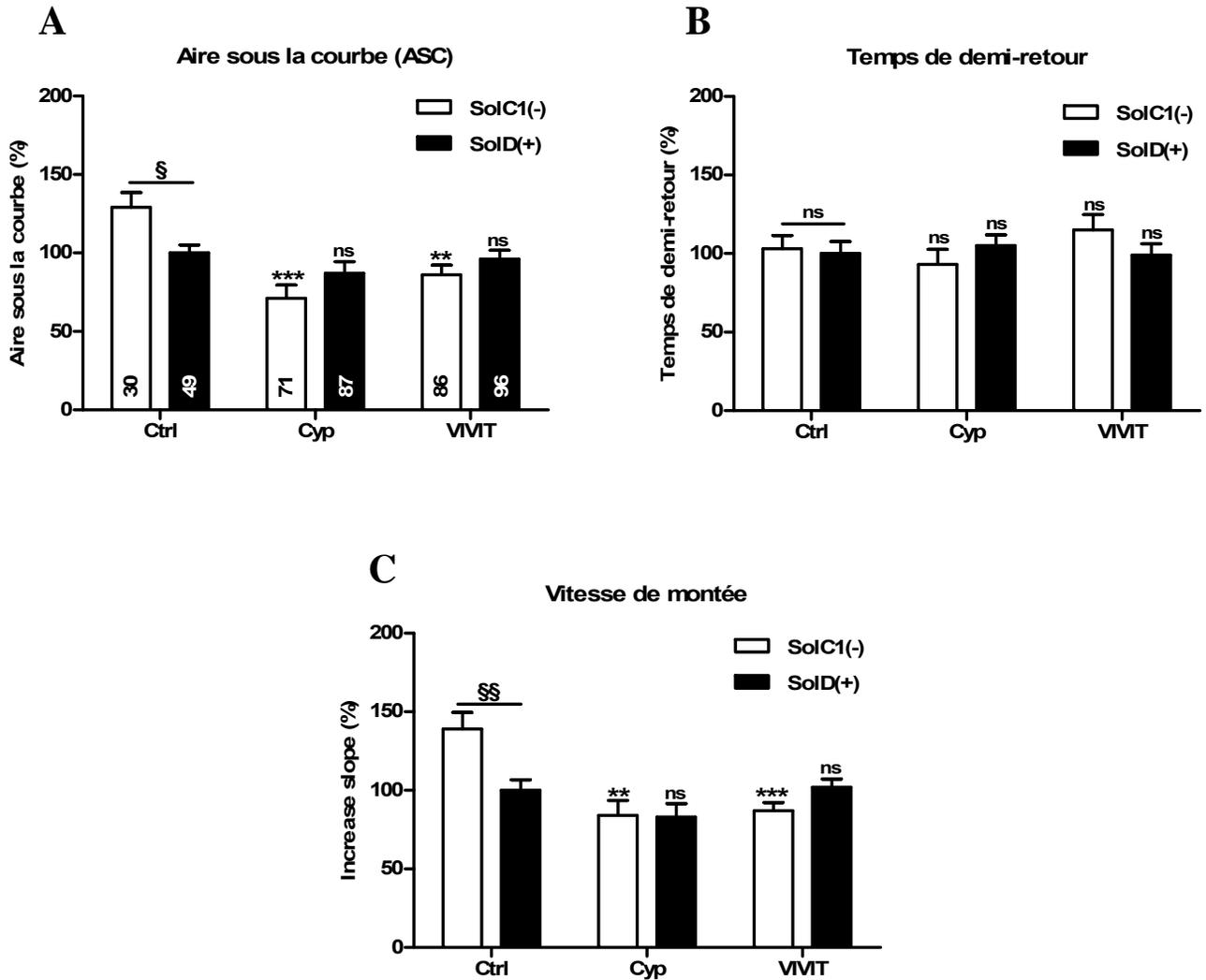
	SolC1(-)			SolD(+)			
	Aire sous la courbe (%)	Temps de demi-retour (%)	Vitesse de montée (%)	Aire sous la courbe (%)	Temps de demi-retour (%)	Vitesse de montée (%)	
	Moyenne ± S.E.M (n)	Moyenne ± S.E.M (n)	Moyenne ± S.E.M (n)	Moyenne ± S.E.M (n)	Moyenne ± S.E.M (n)	Moyenne ± S.E.M (n)	
Court terme (10 à 30 minutes)	Contrôle	259 ± 15 (176)	110 ± 5 (176)	152 ± 8 (176)	100 ± 5 (258) §§§	100 ± 6 (258) ns	100 ± 5 (258) §§§
	2-APB	49 ± 6 (84) ***	49 ± 6 (84) ***	98 ± 6 (84) ***	47 ± 7 (53) ##	61 ± 4 (53) ##	67 ± 9 (53) ##
	XeC	105 ± 11 (21) ***	112 ± 10 (21) ns	62 ± 4 (21) ***	56 ± 9 (17) ##	116 ± 5 (17) ns	44 ± 5 (17) ###
	Rya	5 ± 2 (120) ***	177 ± 5 (120) ***	11 ± 1 (120) ***	5 ± 2 (163) ###	179 ± 5 (163) ###	12 ± 2 (163) ###
	2-APB + Rya	6 ± 2 (5) ***	210 ± 8 (5) ***	15 ± 1 (5) ***	6 ± 2 (13) ###	197 ± 6 (13) ###	13 ± 2 (13) ###
Long terme (16 heures)	CsA (300 nM)	172 ± 12 (79) ***	78 ± 3 (79) **	87 ± 6 (79) ***	70 ± 5 (64) ns	56 ± 4 (64) ###	90 ± 5 (64) ns

**Tableau T-5 : Valeurs obtenues pour les paramètres cinétiques lors de libérations calciques globales en présence des différents agents pharmacologiques.**

Les valeurs sont exprimées en valeurs relatives aux SolD(+) en condition contrôle (100%) par la moyenne ± S.E.M (erreur standard de la moyenne) de chaque paramètre pour les différents types cellulaires et traitements. Les expériences sont effectuées à D4.

Les myotubes sont incubés le 2-APB (50 µM, 30 mins), la xestospongine C (5 µM, 20 mins), la ryanodine (100 µM, 10 mins), le 2-APB + la ryanodine (mêmes concentrations et même temps d'incubation que lors de leur utilisation seule) et la cyclosporine A (300 nM, 16 heures).

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. SolC1(-) contrôle. \*\*:  $P < 0.01$  et \*\*\*:  $P < 0.001$  pour SolC1(-) contrôle vs. chacune des conditions de SolC1(-). ##:  $P < 0.01$  et ###:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. chacune des conditions de SolD(+). ns: non significativement différent.

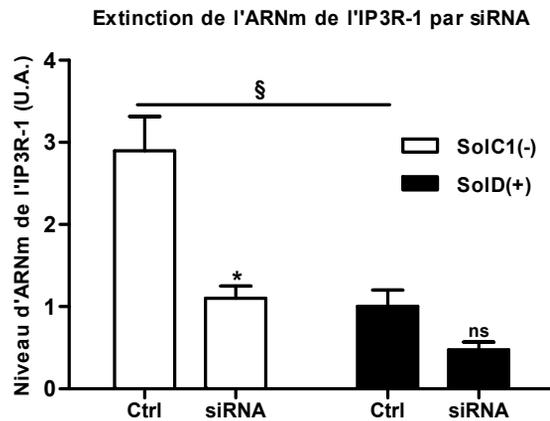
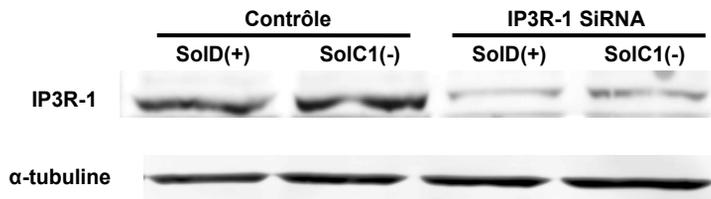
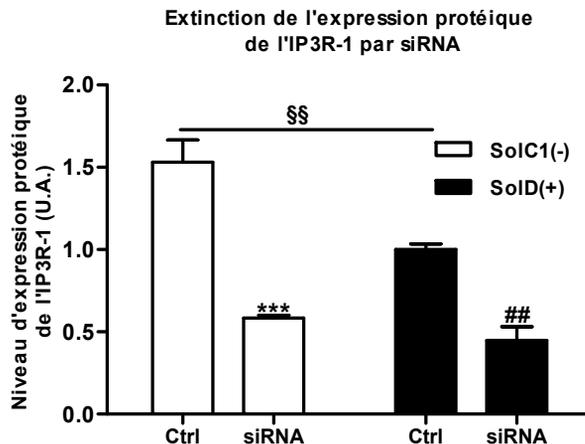


**Figure R-3 : Effet du VIVIT et de la cyperméthrine sur les valeurs des paramètres cinétiques de libération calcique globale.**

L'aire sous la courbe (A), le temps de demi-retour (B) et la vitesse de montée (C) de la libération calcique globale après dépolarisation membranaire sont représentés par des histogrammes, en valeurs relatives aux SolD(+) en condition contrôlée (100%). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de chaque paramètre pour les différents types cellulaires et traitements. Les expériences sont effectuées à D4 (4 jours après la mise en fusion).

Les myotubes sont incubés avec 170 nM de cyperméthrine (Cyp) ou 1  $\mu$ M de VIVIT pendant 16 heures.

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §:  $P < 0.05$  et §§:  $P < 0.01$  pour SolD(+) contrôlé vs. SolC1(-) contrôlé. \*\*:  $P < 0.01$  et \*\*\*:  $P < 0.001$  pour SolC1(-) contrôlé vs. chacune des conditions de SolC1(-). ns: non significativement différent.

**A****B****C**

**Figure R-4 : Validation de l'extinction de l'expression de l'IP3R-1 par siRNA spécifique.**

(A). Niveau d'expression de l'ARNm l'IP3R-1. Les histogrammes représentent les valeurs relatives de l'expression de l'ARNm par rapport aux SolD(+) en condition contrôle (normalisé à 1). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne),  $n = 3$ .

(B). Exemple de western-blot obtenu pour les myotubes SolD(+) et SolC1(-) en présence de siRNA dirigé spécifiquement contre l'IP3R-1 ou avec un siRNA contrôle n'ayant aucune cible particulière.

(C). Niveau d'expression protéique de l'IP3R-1. Les histogrammes représentent les valeurs relatives de l'expression protéique de l'IP3R-1 par rapport aux SolD(+) en condition contrôle (normalisé à 1). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne),  $n = 3$ .

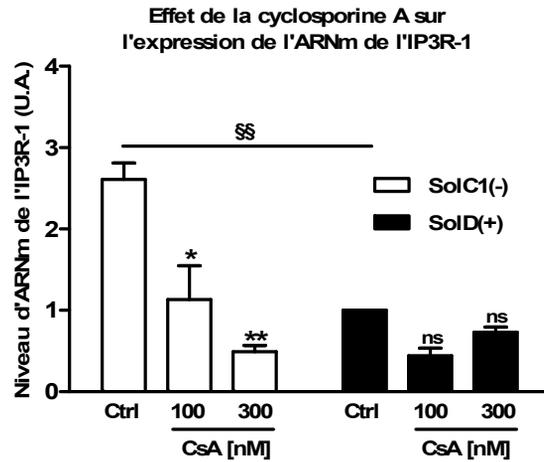
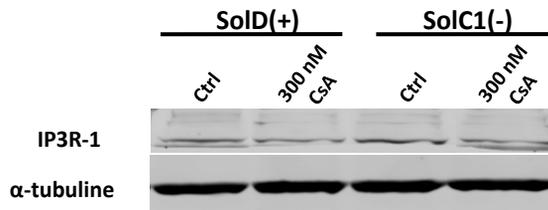
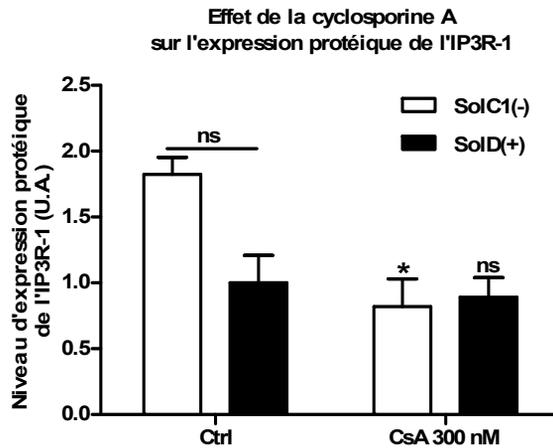
L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §:  $P < 0.05$  et §§:  $P < 0.01$  pour SolD(+) contrôle vs. SolC1(-) contrôle. \*:  $P < 0.05$  et \*\*\*:  $P < 0.001$  pour SolC1(-) contrôle vs. chacune des conditions de SolC1(-). ##:  $P < 0.01$  pour SolD(+) contrôle vs. chacune des conditions de SolD(+). ns: non significativement différent.

	SolC1(-)			SolD(+)		
	Aire sous la courbe (%)	Temps de demi-retour (%)	Vitesse de montée (%)	Aire sous la courbe (%)	Temps de demi-retour (%)	Vitesse de montée (%)
	Moyenne $\pm$ S.E.M (n)	Moyenne $\pm$ S.E.M (n)	Moyenne $\pm$ S.E.M (n)	Moyenne $\pm$ S.E.M (n)	Moyenne $\pm$ S.E.M (n)	Moyenne $\pm$ S.E.M (n)
<b>Contrôle</b>	259 $\pm$ 15 (176)	110 $\pm$ 5 (176)	152 $\pm$ 8 (176)	100 $\pm$ 5 (258) §§§	100 $\pm$ 6 (258) ns	100 $\pm$ 5 (258) §§§
<b>siRNA IP3R-1</b>	109 $\pm$ 8 (61) ***	68 $\pm$ 4 (61) ***	38 $\pm$ 2 (53) ***	57 $\pm$ 5 (75) ##	60 $\pm$ 3 (75) ##	36 $\pm$ 2 (74) ##

**Tableau T-6 : Valeurs obtenues pour les paramètres cinétiques lors de libérations calciques globales lors de l’extinction de l’IP3R-1 par siRNA spécifique.**

Les valeurs sont exprimées en valeurs relatives aux SolD(+) en condition contrôle (100%) par la moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de chaque paramètre pour les différents types cellulaires et traitements. Les myotubes sont transfectés avec des siRNA dirigés spécifiquement contre l’IP3R-1 ou avec des siRNA contrôle (ghost) n’ayant pas de cible particulière.

L’analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. SolC1(-) contrôle. \*\*\*:  $P < 0.001$  pour SolC1(-) contrôle vs. SolC1(-) siRNA IP3R-1. ##:  $P < 0.01$  pour SolD(+) contrôle vs. SolD(+) siRNA IP3R-1. ns: non significativement différent.

**A****B****C**

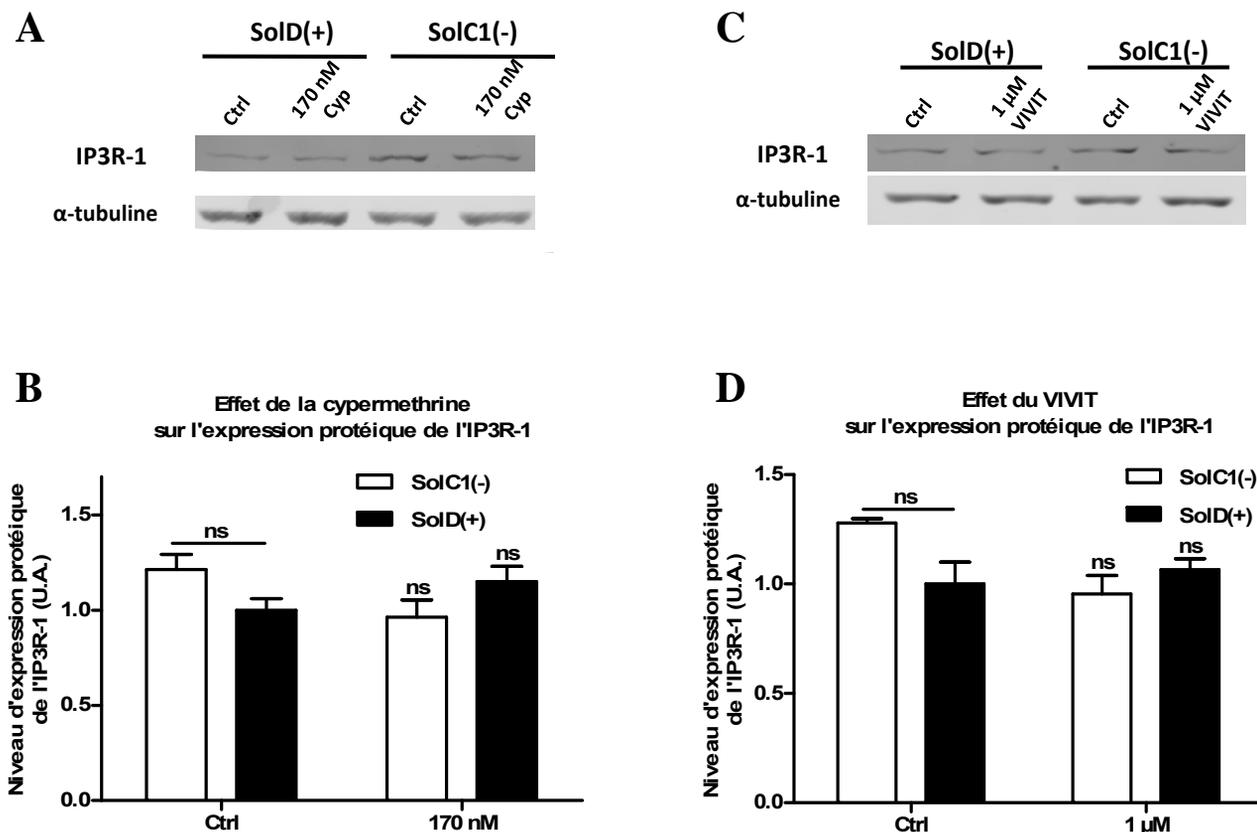
**Figure R-7 : Effet de la cyclosporine A sur l'expression de l'ARNm et de la protéine de l'IP3R-1.**

(A). Niveau d'expression de l'ARNm l'IP3R-1 après incubation des myotubes avec 100 ou 300 nM de cyclosporine A pendant 48 heures. Les histogrammes représentent les valeurs relatives de l'expression de l'ARNm par rapport aux SolD(+) en condition contrôle (normalisé à 1). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne),  $n = 3$ .

(B). Exemple de western-blot obtenu pour les myotubes SolD(+) et SolC1(-) en condition contrôle ou après incubation des myotubes avec 300 nM de cyclosporine A pendant 48 heures.

(C). Niveau d'expression protéique de l'IP3R-1 en condition contrôle ou après incubation avec 300 nM de cyclosporine A pendant 48 heures. Les histogrammes représentent les valeurs relatives de l'expression protéique de l'IP3R-1 par rapport aux SolD(+) en condition contrôle (normalisé à 1). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne),  $n = 3$ .

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§:  $P < 0.01$  pour SolD(+) contrôle vs. SolC1(-) contrôle. \*:  $P < 0.05$  et \*\*:  $P < 0.01$  pour SolC1(-) contrôle vs. chacune des conditions de SolC1(-). ns: non significativement différent.



**Figure R-8: Effet de la cyperméthrine et du VIVIT sur l'expression protéique de l'IP3R-1.**

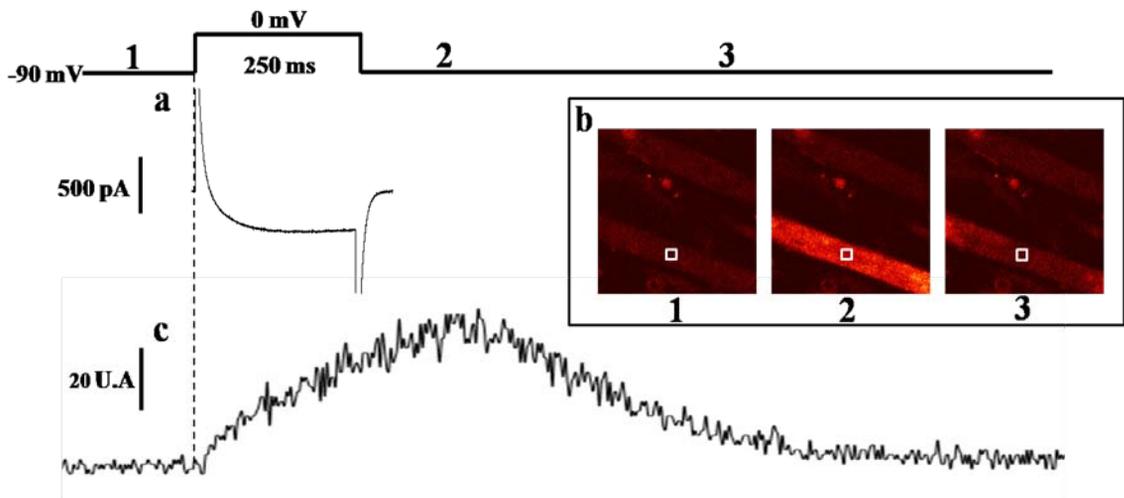
(A). Exemple de western-blot obtenu pour les myotubes SolD(+) et SolC1(-) en condition contrôle ou après incubation des myotubes avec 170 nM de cyperméthrine (Cyp) pendant 48 heures.

(B). Niveau d'expression protéique de l'IP3R-1 en condition contrôle ou après incubation avec 170 nM de cyperméthrine pendant 48 heures. Les histogrammes représentent les valeurs relatives de l'expression protéique de l'IP3R-1 par rapport aux SolD(+) en condition contrôle (normalisé à 1). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne),  $n = 3$ .

(C). Exemple de western-blot obtenu pour les myotubes SolD(+) et SolC1(-) en condition contrôle ou après incubation des myotubes avec 1  $\mu$ M de VIVIT pendant 48 heures.

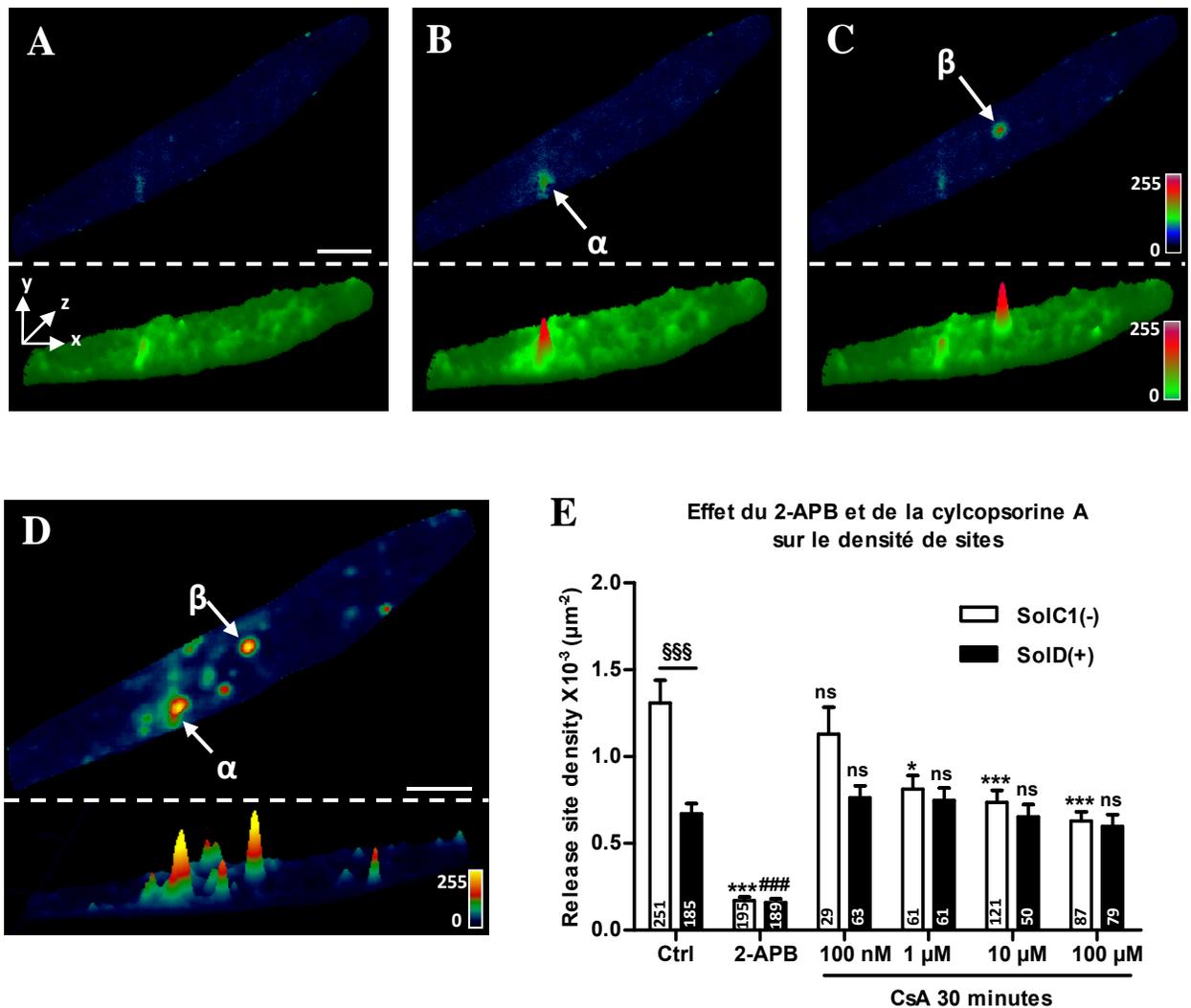
(D). Niveau d'expression protéique de l'IP3R-1 en condition contrôle ou après incubation avec 1  $\mu$ M de VIVIT pendant 48 heures. Les histogrammes représentent les valeurs relatives de l'expression protéique de l'IP3R-1 par rapport aux SolD(+) en condition contrôle (normalisé à 1). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne),  $n = 3$ .

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée. ns: non significativement différent.



**Figure R-9: Exemple de protocole de mesure et d'enregistrement simultanés des courants calciques et des libérations intracellulaires de calcium dans les myotubes**

Exemples d'une stimulation en voltage clamp (de -90 à 0 mV, 250 ms), du courant calcique entrant de type L (a) et du signal fluorescent du Fluo-4 obtenus (b : images de fluorescence obtenues aux temps 1, 2 et 3 indiqués sur le protocole de stimulation). c : courbe de fluorescence calcique provenant de la zone d'intérêt (moyenne des pixels) sélectionnée dans les images (modifié d'après Hubert, 2009)



**Figure R-10** : Libérations calciques spontanées localisées et effet du 2-APB et de la cyclosporine A sur la densité de sites.

(A-C). Les images 3A-C représentent des exemples de 3 images différentes extraites de la même séquence d'acquisition. Les « spots » de fluorescence correspondent à un événement de libération calcique dans un myotube ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Echelle : 20  $\mu\text{m}$

(D). Image de la déviation standard compilée de toutes les images de la séquence sur laquelle sont visualisés les sites de libération  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que quatre autres sites plus petits. Echelle : 30  $\mu\text{m}$

En A, B, C et D la partie inférieure des images correspond à des représentation pseudo 3D des images supérieures.

(E). La densité de sites (en  $\mu\text{m}^{-2}$ ) de libération calcique localisée spontanée est représentée par des histogrammes. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de la densité de sites des différents types cellulaires et traitements. Les myotubes sont incubés avec du 2-APB (50  $\mu\text{M}$ , 30 minutes) ou avec différentes concentrations de cyclosporine A (CsA) (30 minutes).

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. SolC1(-) contrôle. \*:  $P < 0.05$ ; et \*\*\*:  $P < 0.001$  pour SolC1(-) contrôle vs. chacune des conditions de SolC1(-). ####:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. chacune des conditions de SolD(+). ns: non significativement différent.

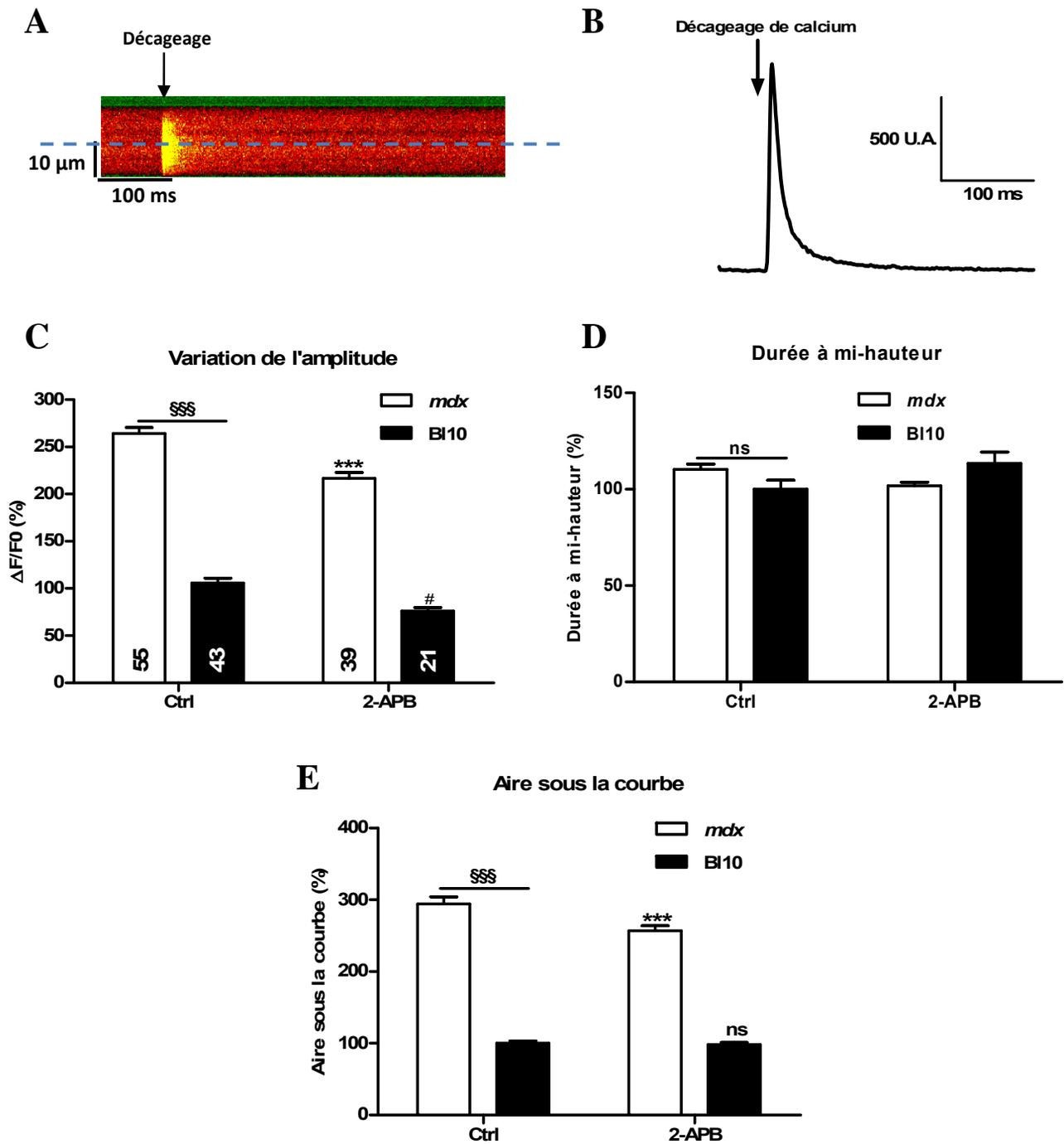
Densité de sites ( $\mu\text{m}^2$ )	SolC1(-)	SolD(+)
	Moyenne ( $\times 10^{-3}$ ) $\pm$ S.E.M ( $\times 10^{-4}$ ) ( <i>n</i> )	Moyenne ( $\times 10^{-3}$ ) $\pm$ S.E.M ( $\times 10^{-4}$ ) ( <i>n</i> )
Ctrl	1.31 $\pm$ 0.13 (251)	0.67 $\pm$ 0.58 (185) §§§
siRNA (IP3R-1)	0.69 $\pm$ 0.82 (60) ***	0.50 $\pm$ 0.54 (96) #

**Tableau T-7 : Valeurs obtenues pour la densité de sites lors de l'extinction de l'IP3R-1 par siRNA spécifique.**

Les valeurs sont exprimées en densité de sites ( $\mu\text{m}^2$ ) par la moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) pour les différents types cellulaires en condition contrôle ou lors de l'incubation avec les siRNA dirigés spécifiquement contre l'IP3R-1.

Les myotubes sont transfectés avec des siRNA dirigés spécifiquement contre l'IP3R-1 ou avec des siRNA contrôle (ghost) n'ayant pas de cible particulière.

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P < 0.001$  pour SolD(+) contrôle vs. SolC1(-) contrôle. \*\*\*:  $P < 0.001$  pour SolC1(-) contrôle vs. SolC1(-) siRNA IP3R-1. #:  $P < 0.05$  pour SolD(+) contrôle vs. SolD(+) siRNA IP3R-1. ns: non significativement différent.

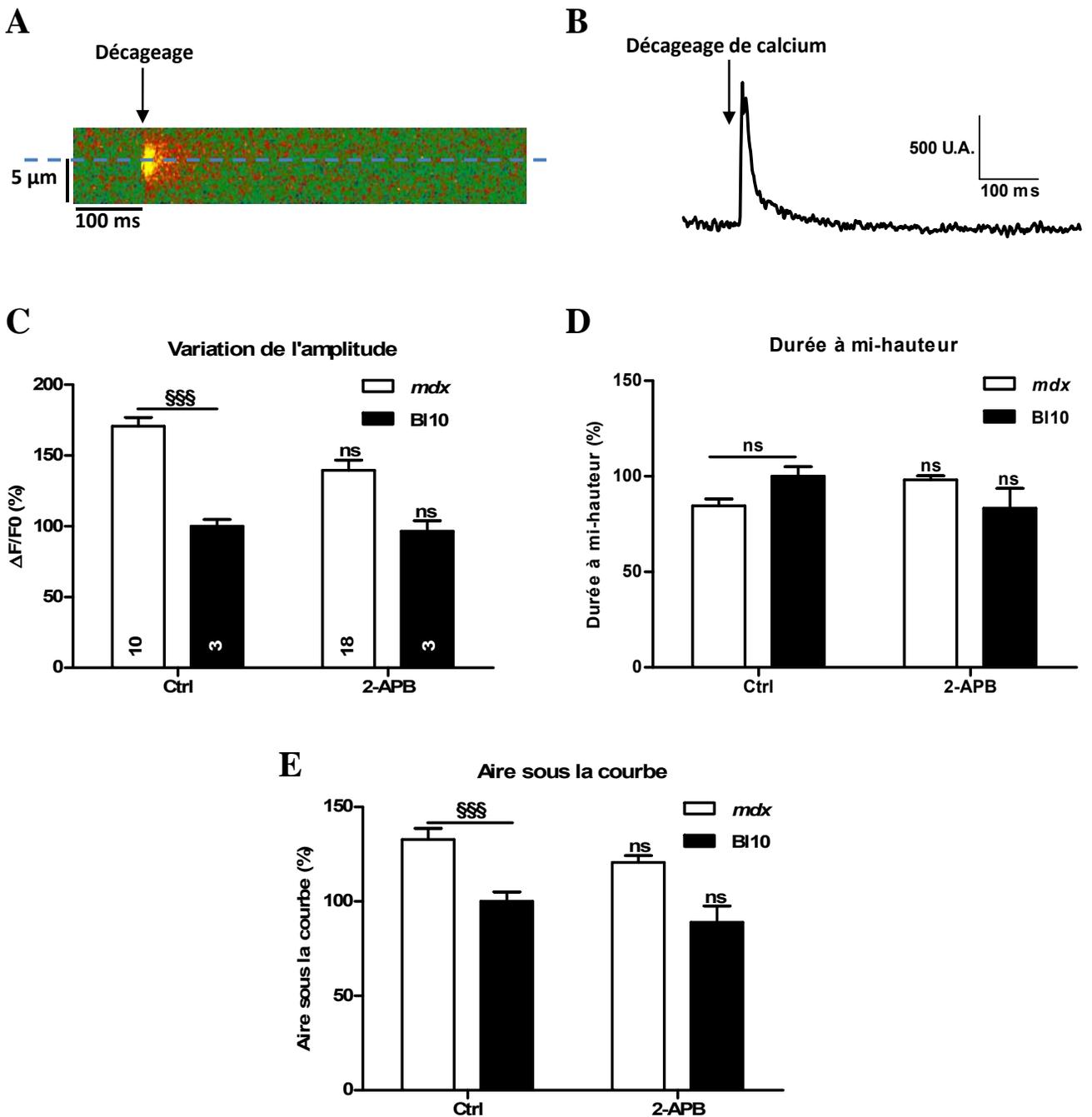


**Figure R-13** : Effet du 2-APB sur les paramètres d'augmentation du calcium lors du décaage dans les myotubes *mdx* et BI10.

Exemple d'enregistrement obtenu en X,T lors du décaage de calcium dans un myotube *mdx* (A) et profil représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps obtenu à partir de cet enregistrement au niveau de la ligne bleue en pointillés (B).

La variation d'amplitude (C), la durée à mi-hauteur (D) et l'aire sous la courbe (E) sont représentés par des histogrammes, en valeurs relatives par rapport aux myotubes BI10 en condition contrôle (100%). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de chaque paramètre pour les différents types cellulaires en condition contrôle et en présence de 2-APB (100  $\mu$ M, 30 minutes).

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P < 0.001$  pour BI10 contrôle vs. *mdx* contrôle. \*\*\*:  $P < 0.001$  pour *mdx* contrôle vs. *mdx* 2-APB. #:  $P < 0.05$  pour BI10 contrôle vs. BI10 2-APB. ns: non significativement différent.

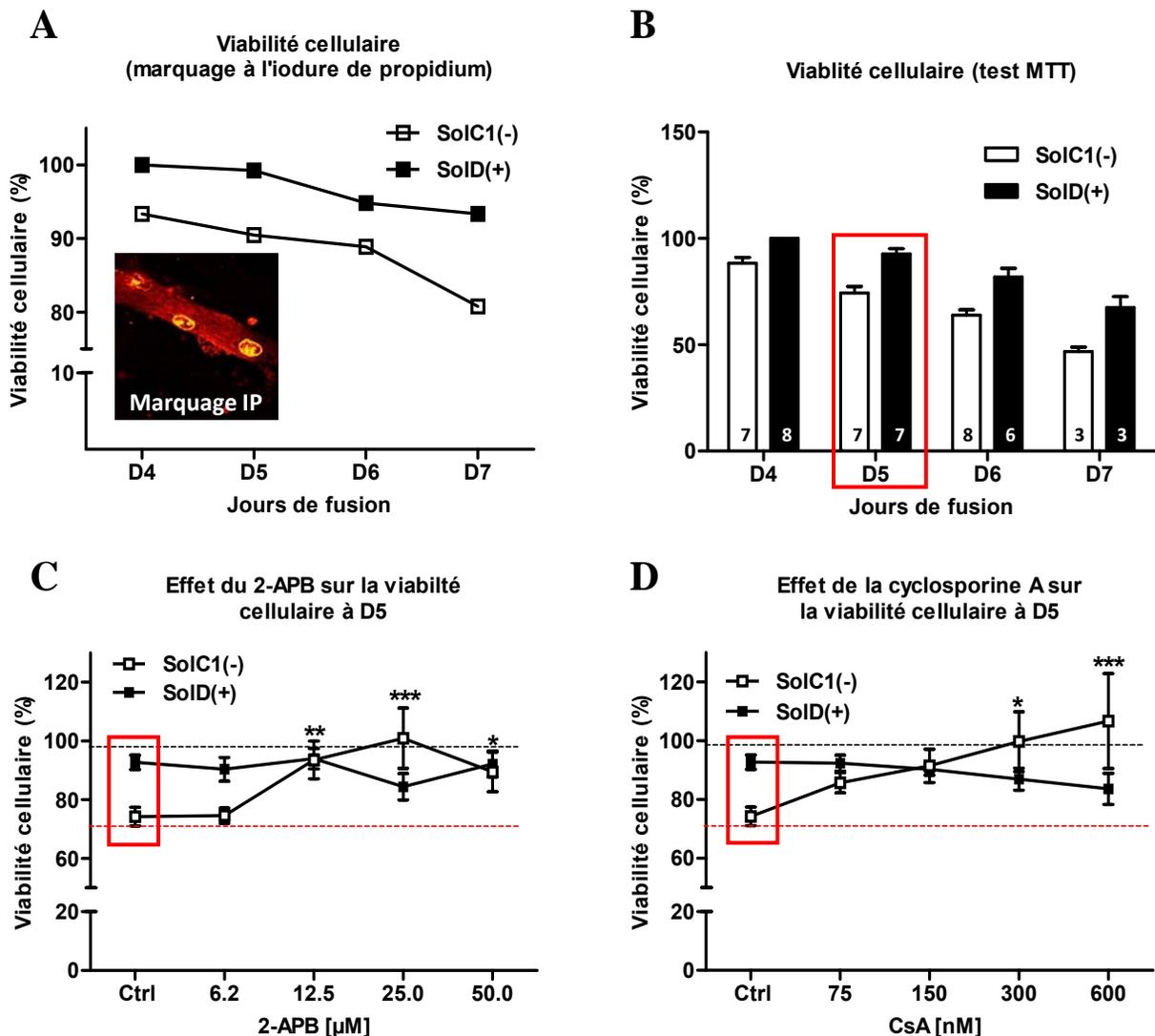


**Figure R-14** : Effet du 2-APB sur les paramètres d'augmentation du calcium lors du décageage dans les fibres musculaires squelettiques *mdx* et BI10.

Exemple d'enregistrement obtenu en X,T lors du décageage de calcium dans une fibre musculaire squelettique *mdx* (A) et profil représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps obtenu à partir de cet enregistrement au niveau de la ligne en bleue en pointillés (B).

La variation d'amplitude (C), la durée à mi-hauteur (D) et l'aire sous la courbe (E) sont représentés par des histogrammes, en valeurs relatives par rapport aux fibres musculaires BI10 en condition contrôlée (100%). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de chaque paramètre pour les différents types cellulaires en condition contrôlée et en présence de 2-APB (50  $\mu$ M, 30 minutes).

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P < 0.001$  pour BI10 contrôlée vs. *mdx* contrôlée. ns: non significativement différent.



**Figure R-15 : Survie cellulaire des myotubes SolC1(-) et SolD(+) au cours du temps et effet du 2-APB et de la cyclosporine A sur la survie cellulaire des deux types de myotubes.**

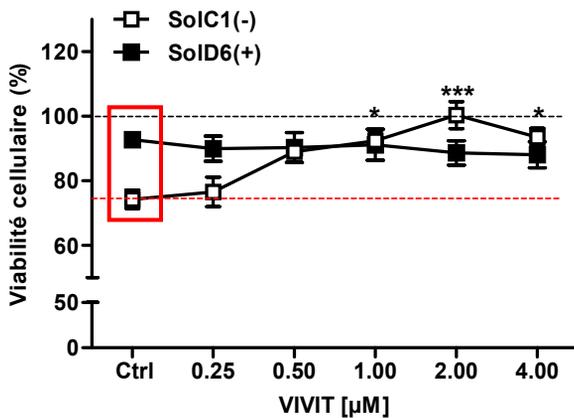
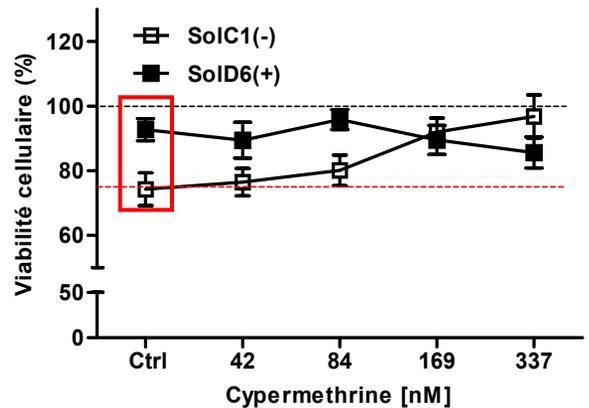
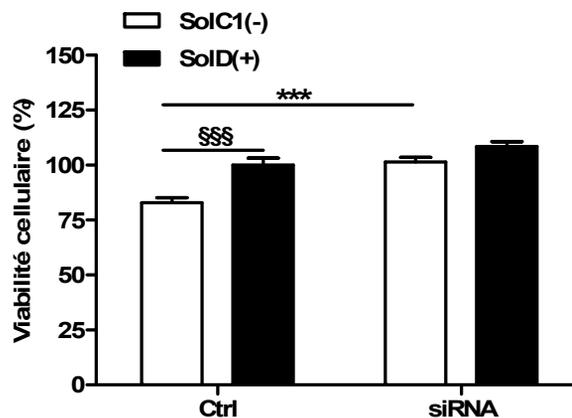
(A) et (B). Mort cellulaire naturelle dans les myotubes SolC1(-) et SolD(+) de D4 à D7 (jours après la mise en fusion). (A). Pourcentage de viabilité cellulaire par la technique de marquage à l'iodure de propidium (IP) (insert). (B). Pourcentage de survie cellulaire par test colorimétrique MTT. Dans les deux cas (A et B), la viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage relatif au nombre de myotubes SolD(+) viables à D4 (100% de cellules vivantes).

Effet du 2-APB (C) et de la cyclosporine A (CsA) (D) sur la viabilité cellulaire des myotubes SolC1(-) et SolD(+) à D5. La viabilité cellulaire est exprimée en valeur relative par rapport aux myotubes SolC1(-) et SolD(+) non traités à D5 (rectangles rouges).

Les barres (B) et les symboles (C et D) représentent la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) du pourcentage de la viabilité cellulaire.  $n=5$  pour le test MTT avec le 2-APB et  $n=4$  pour le test MTT avec la cyclosporine A.

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$  et \*\*\*:  $P<0.001$  pour la viabilité cellulaire observée en présence de 2-APB et de cyclosporine A (SolC1(-) contrôle vs. chaque condition de SolC1(-)).

La ligne noire pointillée représente le 100% de survie cellulaire et la ligne rouge pointillée représente le pourcentage de viabilité cellulaire des myotubes SolC1(-) en condition contrôle à D5.

**A****Effet du VIVIT sur viabilité cellulaire à D5****B****Effet de la Cyperméthrine sur la viabilité cellulaire à D5****C****Effet de l'extinction de l'IP3R-1 par siRNA sur la viabilité cellulaire**

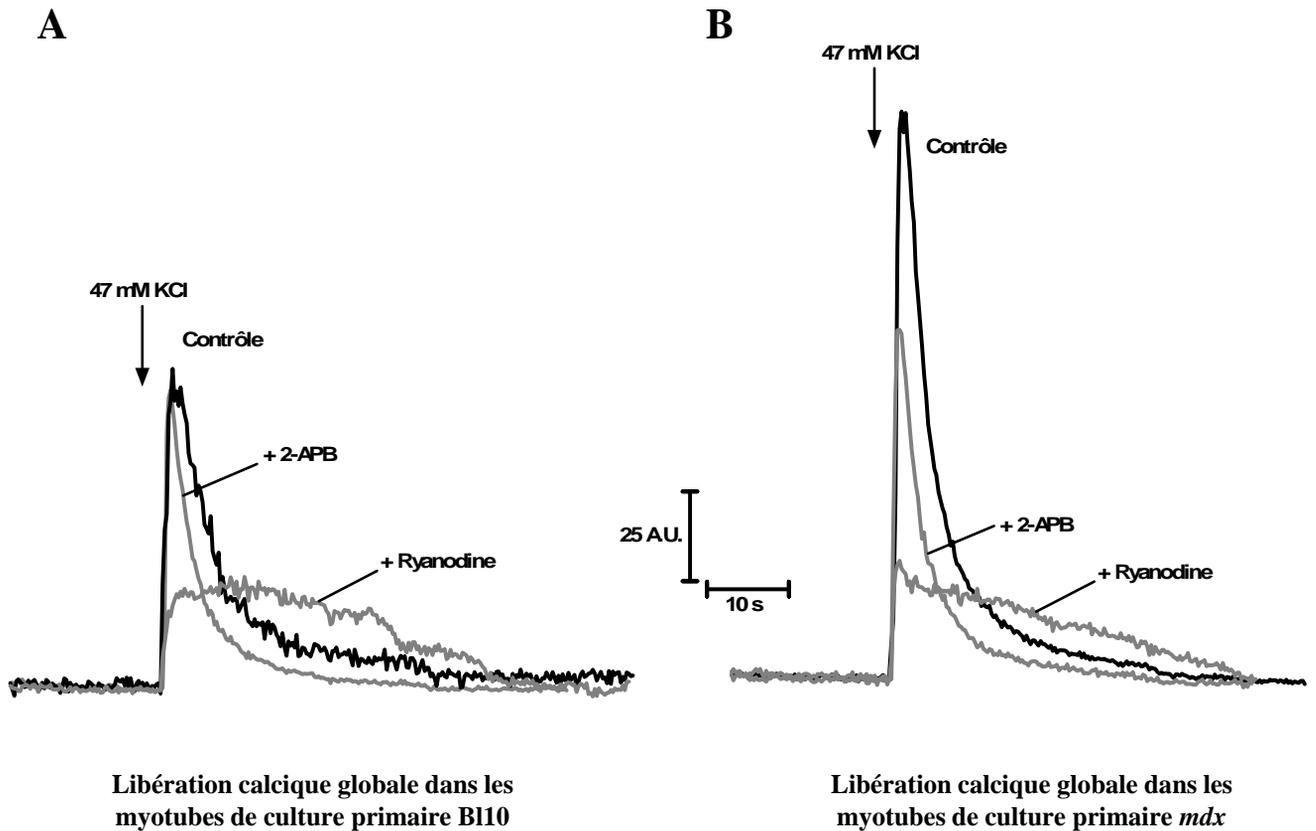
**Figure R-16** : Effet du VIVIT, de la cyperméthrine et de l'extinction de l'IP3R-1 par siRNA sur la viabilité cellulaire des myotubes SolC1(-) et SolD(+).

Effet du VIVIT (A) et de la cyperméthrine (B) sur la viabilité cellulaire des myotubes SolC1(-) et SolD(+) à D5. La viabilité cellulaire est exprimée en valeur relative par rapport aux myotubes SolC1(-) et SolD(+) non traités à D5 (rectangles rouges). La ligne noire pointillée représente le 100% de survie cellulaire et la ligne rouge pointillée représente le pourcentage de viabilité cellulaire des myotubes SolC1(-) en condition contrôle à D5.

(C). Effet de l'extinction de l'IP3R-1 par siRNA spécifique sur la viabilité cellulaire des myotubes SolC1(-) et SolD(+) à D3. La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage relatif au nombre de myotubes SolD(+) viables à D3 en condition contrôle (100% de cellules vivantes).

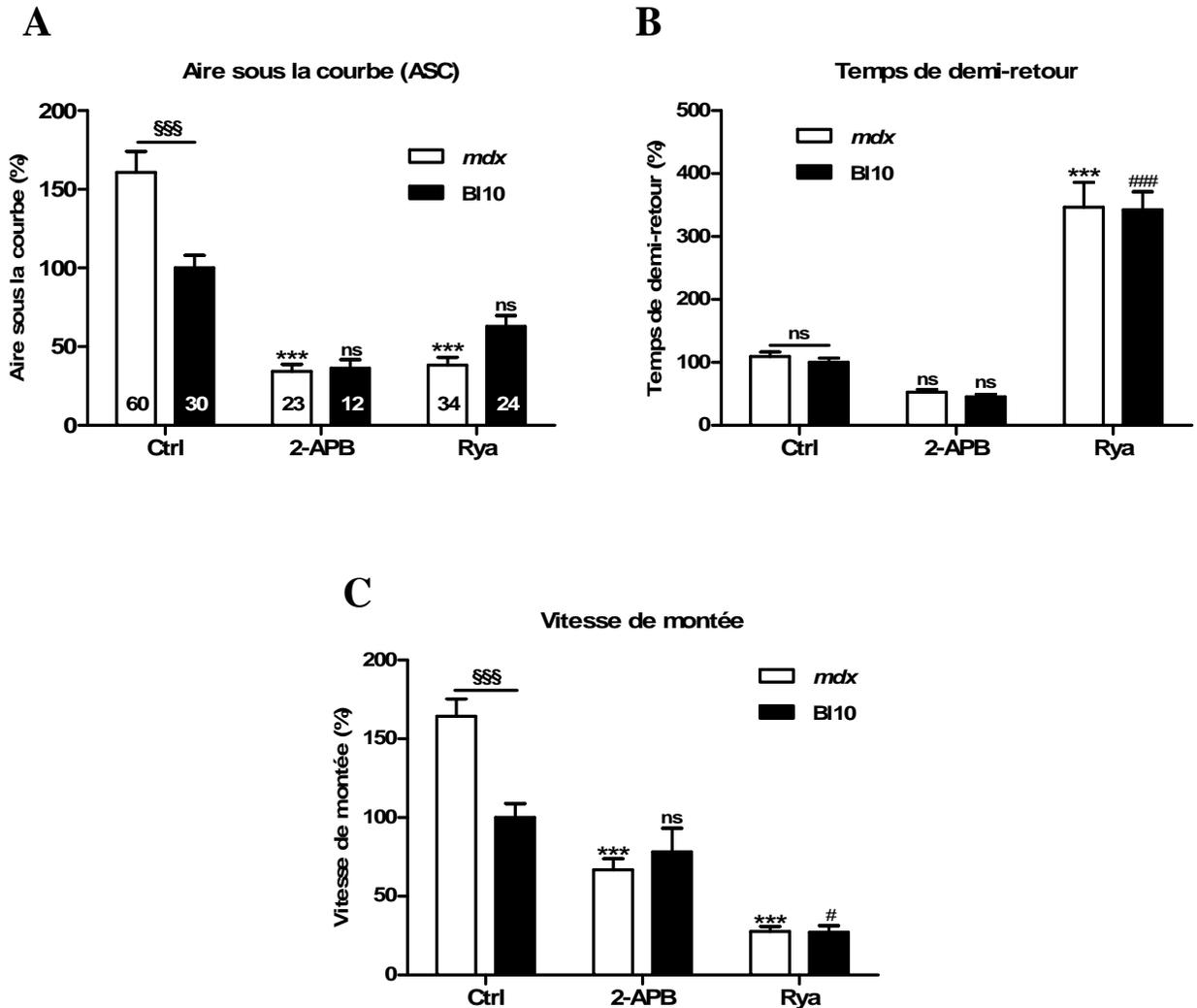
Les barres (C) et les symboles (A et B) représentent la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) du pourcentage de la viabilité cellulaire.  $n=4$  pour le test MTT avec le VIVIT,  $n=3$  pour le test MTT avec la cyperméthrine et  $n=3$  pour le test MTT avec les siRNA IP3R-1.

L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. §§§:  $P<0.001$  pour SolC1(-) contrôle vs. SolD(+) contrôle; \*:  $P<0.05$ ; et \*\*\*:  $P<0.001$  pour la viabilité cellulaire observée en présence de VIVIT, cyperméthrine et siRNA IP3R-1 pour SolC1(-) contrôle vs. chaque condition de SolC1(-).



**Figure R-5** : Exemples représentatifs de libérations calciques globales dans les myotubes B110 et *mdx*.

Les tracés représentent les libérations calciques globales induites lors de la dépolarisation membranaire par une solution hyperpotassique (47 mM KCl). Les courbes noires représentent les libérations calciques globales obtenues en condition contrôle pour les myotubes provenant de souris B110 (**A**) et *mdx* (**B**). Les tracés gris sont obtenus en présence de 2-APB (50  $\mu$ M, 30 minutes) et de ryanodine (100  $\mu$ M, 10 minutes) pour les cultures primaires de souris B110 (**A**) et *mdx* (**B**).

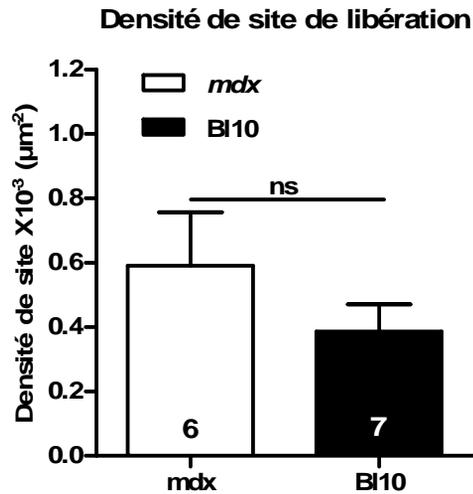


**Figure R-6 : Effet du 2-APB et de la ryanodine sur les valeurs des paramètres cinétiques de libération calcique globale dans les myotubes de souris Bl10 et *mdx*.**

L'aire sous la courbe (A), le temps de demi-retour (B) et la vitesse de montée (C) de la libération calcique globale après dépolarisation membranaire sont représentés par des histogrammes, en valeurs relatives par rapport aux myotubes Bl10 en condition contrôle (100%). Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de chaque paramètre pour les différents types cellulaires et traitements.

Les myotubes sont incubés avec le 2-APB (50  $\mu$ M, 30 minutes) ou la ryanodine (100  $\mu$ M, 10 minutes).

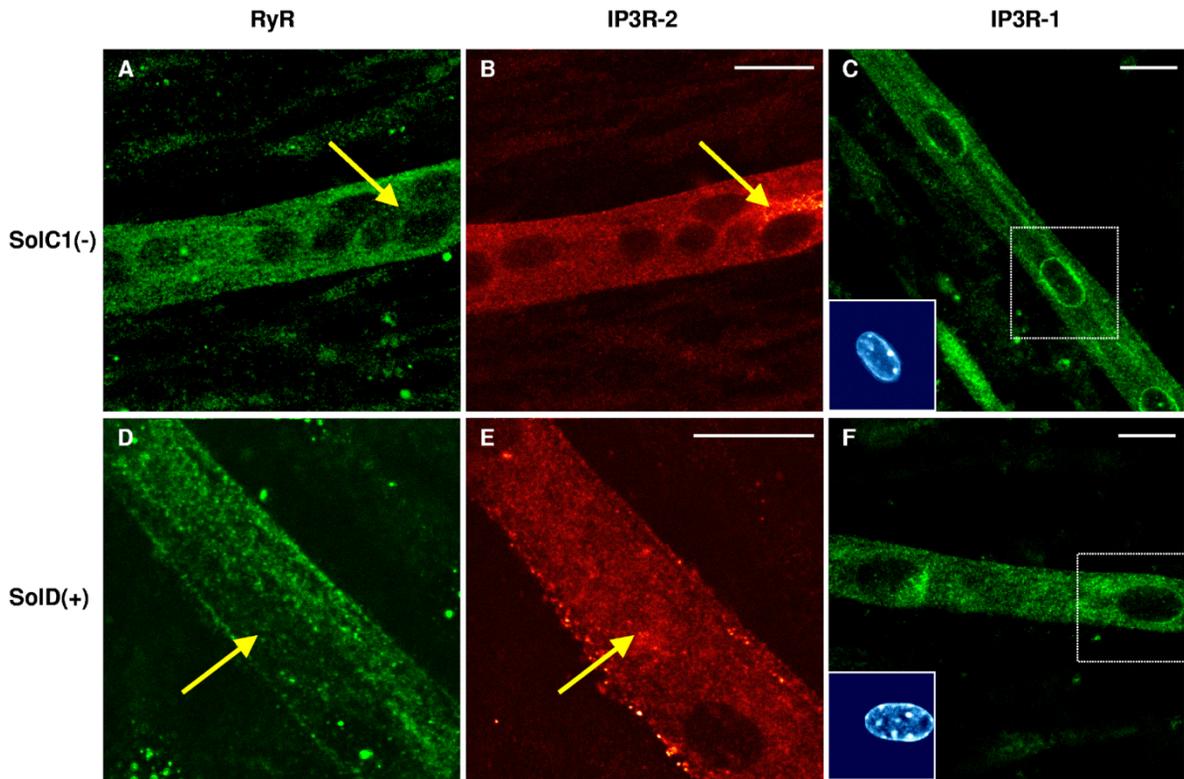
L'analyse statistique est effectuée par un test Anova double entrée suivi par un test post-hoc de Tukey. \$\$\$:  $P < 0.001$  pour Bl10 contrôle vs. *mdx* contrôle. \*\*\*:  $P < 0.001$  pour contrôle vs. chacune des conditions *mdx*. #:  $P < 0.05$  et ###:  $P < 0.001$  pour Bl10 contrôle vs. chacune des conditions Bl10. ns: non significativement différent.



**Figure R-11** : Densité de sites de libération dans les myotubes de cultures primaires B110 et *mdx*.

La densité de sites (en  $\mu\text{m}^{-2}$ ) de libération calcique localisée spontanée est représentée par des histogrammes. Chaque barre représente la valeur moyenne  $\pm$  S.E.M (erreur standard de la moyenne) de la densité de sites pour les myotubes *mdx* et B110.

L'analyse statistique est effectuée par un test de Student (*t*). ns: non significativement différent.

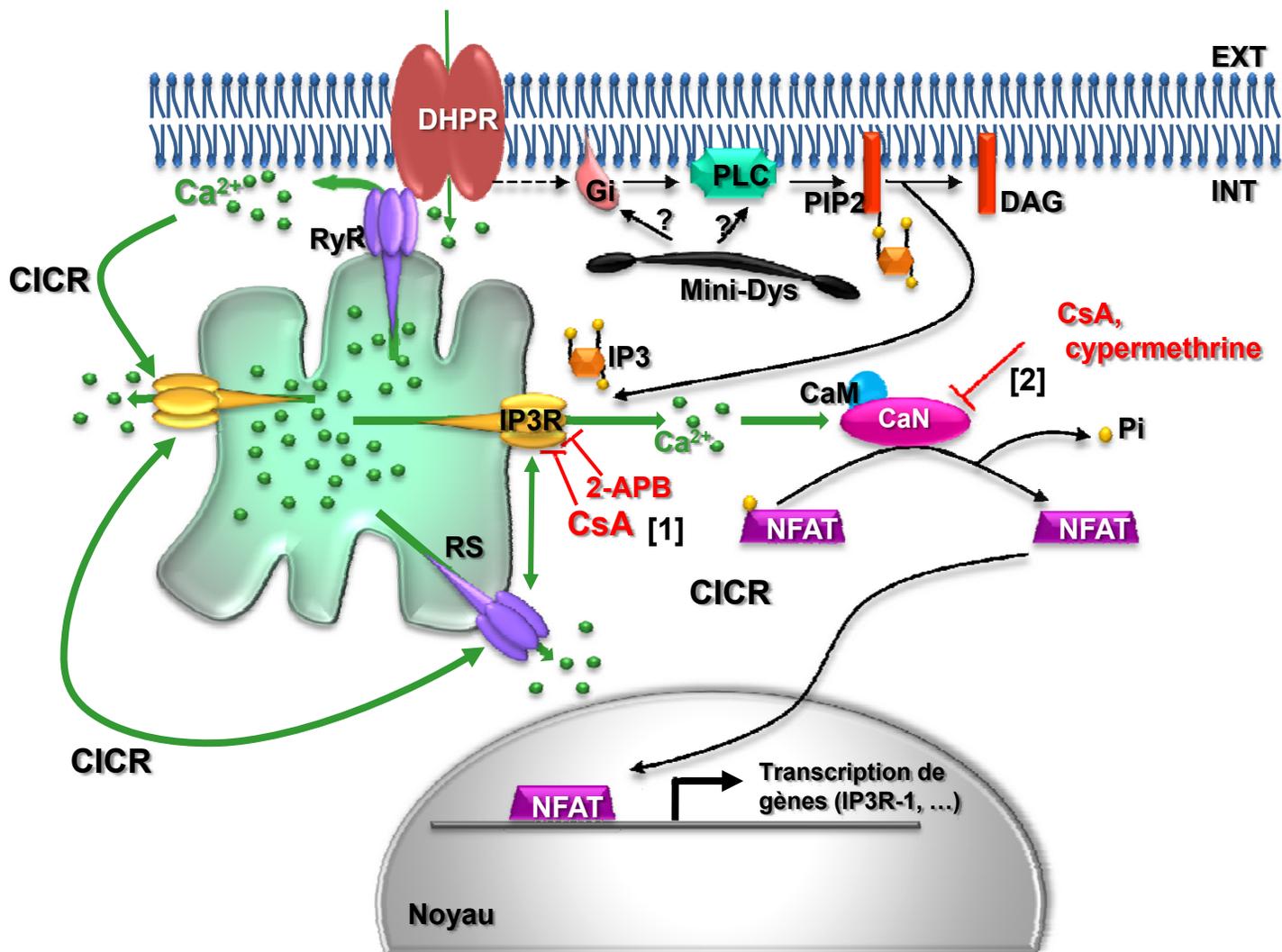


**Figure R-12 : Localisation des récepteurs à la ryanodine et à l'IP3 dans les myotubes SolC1(-) et SolD(+).**

La répartition des récepteurs à la ryanodine (RyR) (**A** et **D**) et des récepteurs à l'IP3 de type 2 (IP3R-2) (**B** et **E**) et 1 (IP3R-1) (**C** et **F**) dans les myotubes SolC1(-) et SolD(+) est visualisée par immunomarquage observé par la microscopie confocale. Echelle 20  $\mu\text{m}$ .

Les RyRs et les IP3R-2 sont répartis de la même façon dans les deux types cellulaires. Les zones de présence abondante des IP3R-2 correspondent à des zones de faible présence des RyRs (flèches jaunes) dans les deux types cellulaires.

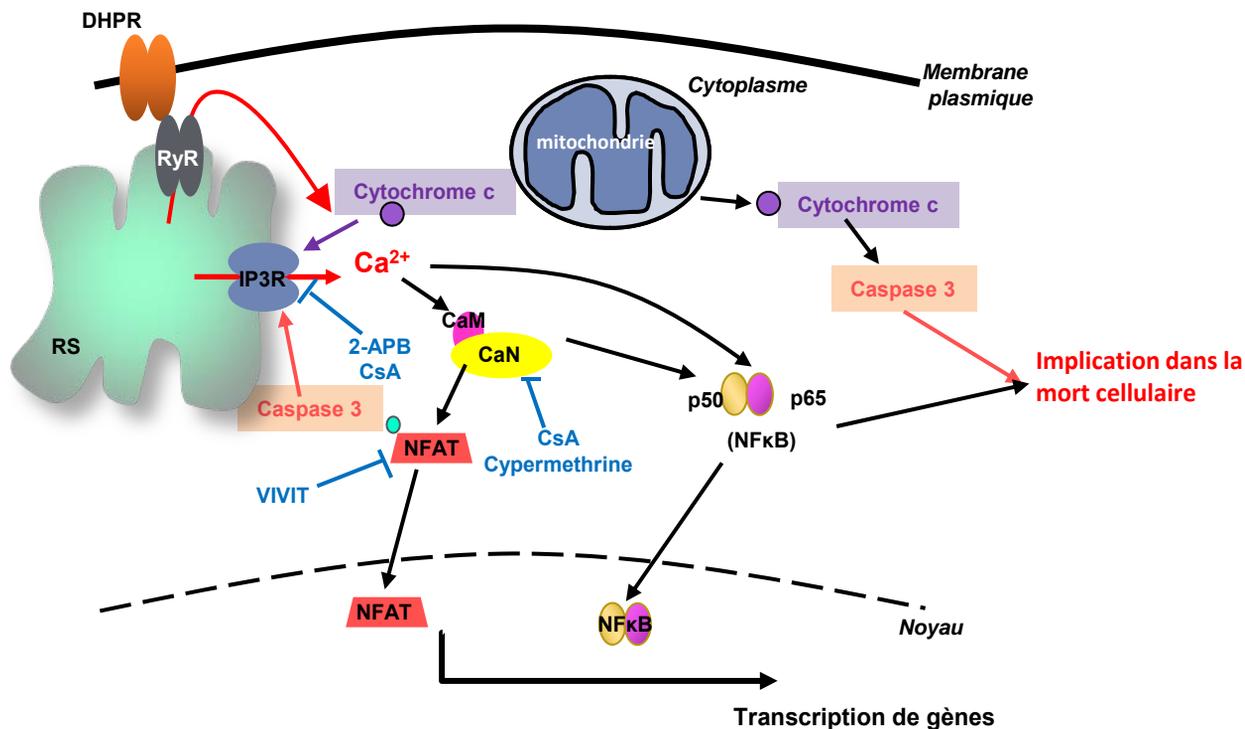
Les IP3R-1 sont localisés dans le cytoplasme avec marquage périnucléaire de ce canal dans les myotubes SolC1(-). Insert (**C** et **D**): marquage du noyau par la sonde TO-PRO-3.



**Figure CP-1 : Modèle des modes d'action de la cyclosporine A sur les libérations de calcium provenant du RS dans les cellules musculaires, et son rôle modulateur dans les cellules déficientes en dystrophine.**

La cyclosporine A peut directement interagir avec les IP3Rs et moduler la libération calcique dépendante de ces récepteurs ([1]: effet à court terme). Elle peut également inhiber l'activité phosphatase de la calcineurine ([2]: effet à long terme) et par conséquent diminuer la transcription de gènes (dont l'IP3R-1) dépendante de la translocation du NFAT dans le noyau. Ces deux modes d'action contribuent à la réduction de libérations calciques dépendantes de la voie IP3.

Signification des abréviations utilisées dans la figure: 2-APB, 2-aminoéthoxydiphényle borate; CaM, calmoduline; CaN, calcineurine; CsA, cyclosporine A; DAG, diacylglycérol; DHPR, récepteur aux dihydropyridines; Gi, protéine Gi; IP3, inositol 1,4,5-trisphosphate; IP3R, récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate; Mini-Dys, mini-dystrophine; NFAT, nuclear factor of activated T cells; Pi, phosphate inorganique PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLC, phospholipase C; RyR, récepteur à la ryanodine; RS, reticulum sarcoplasmique.



**Figure CP-2 : Perspectives générales**

Il serait intéressant d'examiner les voies activées par le cytochrome c. Le cytochrome c libéré par la mitochondrie lors d'une surcharge calcique active la caspase 3, pouvant ainsi engendrer la mort cellulaire. La caspase 3 activée peut également aller cliver l'IP3R-1, le rendant conformationnellement actif, libérant du calcium en continu dans le cytoplasme. Le cytochrome c peut lui aussi activer les IP3Rs, amplifiant la libération calcique de ces canaux. Ces mécanismes concourent à la surcharge calcique du cytoplasme, pouvant activer divers voies de signalisation comme celle de la calcineurine, du NFAT et du NFkB, et pouvant également engendrer la mort cellulaire.

Signification des abréviations utilisées dans la figure: 2-APB, 2-aminoéthoxydiphényle borate; CaM, calmoduline; CaN, calcineurine; CsA, cyclosporine A; DHPR, récepteur aux dihydropyridines; IP3R, récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate; NFAT, nuclear factor of activated T cells; RyR, récepteur à la ryanodine; RS, reticulum sarcoplasmique.

# **Homéostasie calcique et survie des cellules musculaires squelettiques déficientes en dystrophine :effets de la modulation de l'activité et de l'expression des Récepteurs à l'Inositol Trisphosphate.**

## **Résumé de la thèse :**

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie musculaire sévère caractérisée par l'absence d'une protéine : la dystrophine, protéine sous-membranaire permettant de faire le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. La déficience en dystrophine entraîne une dégénérescence musculaire progressive conduisant à la mort du patient. Le lien entre l'absence de dystrophine et la mort des cellules musculaires reste encore mal établi. De nombreuses études ont mis en évidence une dérégulation calcique des cellules musculaires squelettiques déficientes en dystrophine, ainsi qu'une implication des stocks intracellulaires de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique. De plus, le calcium libéré par les récepteurs à l'IP3 (IP3Rs) semblent être impliqué dans cette dérégulation calcique.

Dans cette étude, nous avons confirmé la présence d'une libération calcique globale, après stimulation, supérieure dans les cellules sans dystrophine comparativement aux cellules exprimant la mini-dystrophine. De même, au repos, les libérations calciques localisées spontanées sont plus abondantes dans les cellules déficientes en dystrophine. Ces résultats ont également été observés dans les myotubes provenant de culture primaire de souris *mdx* (modèle animal de la DMD), comparativement aux souris B110 (souris contrôles). Afin d'étudier la régulation de la libération de calcium, des expérimentations de libération calcique artificielle par la méthode de photolyse de calcium encagé ont été menées à différents stades de maturation des cellules musculaires provenant des souris *mdx* et contrôles.

Nous avons également étudié la régulation à court et à long terme du calcium provenant des IP3Rs à l'aide de la cyclosporine A. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une possible implication de la voie calcineurine/NFAT. De plus, la régulation pharmacologique de cette voie a révélé une modulation des libérations calciques globales et spontanées, ainsi qu'une diminution de l'expression de l'IP3R1. A ces deux effets, s'ajoute une protection contre la mort cellulaire naturelle des cellules déficientes en dystrophine par la modulation de la voie IP3.

Ces résultats suggèrent l'implication des IP3Rs dans la dérégulation calcique des cellules déficientes en dystrophine entraînant la mort prématurée de ces cellules. Il serait maintenant intéressant de comprendre comment la dystrophine intervient dans la modulation de cette voie de libération du calcium.

**Mots clés :** muscle squelettique, dystrophine, souris *mdx*, calcium, récepteur IP3, calcineurine, cyclosporine A, NFAT, survie cellulaire.

Travaux réalisés au sein de l'Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires,  
CNRS, UMR 6187

40, avenue du Recteur Pineau 86022 Poitiers cedex