



UNIVERSITÉ
DE GENÈVE

Archive ouverte UNIGE

<https://archive-ouverte.unige.ch>

Thèse

2008

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

L'initiation de la différenciation des myoblastes humains requiert la déphosphorylation de la tyrosine 242 du canal potassique Kir2.1

Hinard, Valérie

How to cite

HINARD, Valérie. L'initiation de la différenciation des myoblastes humains requiert la déphosphorylation de la tyrosine 242 du canal potassique Kir2.1. 2008. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:527

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:527>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:527](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:527)

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biologie cellulaire

FACULTE DES SCIENCES

Professeur Jean-Claude Martinou

Département de neurosciences fondamentales

FACULTE DE MEDECINE

Professeur Laurent Bernheim

**L'initiation de la différenciation des myoblastes humains requiert
la déphosphorylation de la tyrosine 242 du canal potassique Kir2.1**

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences, mention biologie

par

Valérie HINARD

de

St Julien-en-Genevois (France)

Thèse n° 3958

Atelier ReproMail – Uni Mail

Genève

2008

TABLES DES MATIERES

ABBREVIATIONS	4
RESUME.....	6
INTRODUCTION.....	7
A. La régénération musculaire.....	9
1. <u>Le muscle strié squelettique</u>	9
1.1 Structure du muscle squelettique.....	9
1.2 Contrôle du mouvement musculaire	11
1.3 Capacité régénérative du muscle.....	12
2. <u>Les étapes de la régénération musculaire après lésion</u>	14
2.1 La nécrose du muscle après lésion	14
2.2 La régénération du muscle	15
B. La régulation de la différenciation des myoblastes	17
1. <u>Les facteurs de transcription</u>	17
1.1 Les facteurs des cellules satellites.....	17
1.2 Les facteurs MRFs	18
1.3 Les facteurs MEF2s.....	20
2. <u>Les voies de signalisation</u>	22
2.1 La voie de la PI3K.....	22
2.2 La voie de la p38-MAPK	22
2.3 La voie de la CaMK	23
2.4 La voie de la calcineurine.....	23

C. Le rôle de l'hyperpolarisation dans la différenciation.....	26
1. <u>Les canaux ioniques impliqués</u>	26
1.1 Les canaux h-eag et Kir2.1	26
1.2 Les canaux calciques	27
2. <u>Activation du canal potassique Kir2.1</u>	29
2.1 Caractéristiques du canal Kir2.1	29
2.2 Mécanismes de modulation de l'activité du canal Kir2.1	31
 MATERIELS ET METHODES	35
1. <u>Culture primaire de myoblastes humains</u>	35
2. <u>Mesure électrophysiologique</u>	36
3. <u>Détection de la protéine Kir2.1 endogène</u>	39
4. <u>Surexpression de canaux Kir2.1-GFP sauvages et mutants</u>	41
 ARTICLE I	43
A. Introduction à l'article I	43
B. Article Konig et al. publié en 2004 dans le <i>Journal of Biological Chemistry</i>	44
C. Résultats et discussion	55
1. <u>Résultats</u>	55
2. <u>Discussion</u>	56

ARTICLE II	58
A. Introduction à l'article II	58
B. Article Hinard et al. publié en 2008 dans le journal <i>Development</i>	59
C. Résultats et discussion	69
1. <u>Résultats additionnels</u>	69
2. <u>Discussion additionnelle</u>	73
3. <u>Hypothèse de travail</u>	75
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	77
REMERCIEMENTS	79
REFERENCES	80

ABBREVIATIONS

ATP	Adénosine Tri-Phosphate
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CaM	Calmodulin
CaMK	Calmodulin dependent Kinase
CaT	Ca ²⁺ T-type
CBP	CREB Binding Protein
DM	Differentiation Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
Foxh	Forkhead
GM	Growth Medium
HB-EGF	Heparin-Binding EGF-like Growth Factor
HDAC	Histone Deacetylase
h-eag	human ether-a-go-go
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
Kir	K ⁺ inward rectifier
MADS	MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCK	Muscle Creatin Kinase
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MNF	Myocyte Nuclear Factor
MPC	Myogenic Precursor Cell
MRF	Myogenic Regulatory Factor
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NFAT	Nuclear Factor Activated of T cells
NGF	Neuronal Growth Factor
NO	Nitric Oxide

ABBREVIATIONS

Pax	Paired-Box
PCAF	p300/CBP-Associated Factor
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PIP₂	Phosphatidyl Inositol 4,5-Biphosphate
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SDS-PAGE	SDS- Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
SOC	Store Operated Channel
TGF-β	Transfoming Growth Factor β
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

RESUME

La différenciation des myoblastes humains est un processus complexe et progressif qui comprend l'arrêt de leur prolifération, leur alignement, leur fusion et se termine par leur maturation en fibres musculaires fonctionnelles. Ce processus nécessite une régulation finement orchestrée qui est possible grâce à l'expression coordonnée de facteurs de transcription myogéniques, les facteurs MRFs (dont la myogénine) et les facteurs MEF2s. Mis à part ces facteurs de transcription, la différenciation des myoblastes est également sous contrôle d'évènements clés qui assurent sa progression cohérente.

Notre groupe a montré, il y a quelques années, que les myoblastes humains devaient s'hyperpolariser pour pouvoir se différencier. Cette hyperpolarisation est le résultat de l'activation séquentielle de 2 canaux potassiques, d'abord le canal h-eag qui abaisse le potentiel membranaire des myoblastes à -30mV, puis le canal Kir2.1 qui amène le potentiel jusqu'à -65mV (Bernheim et al., 1996; Liu et al., 1998; Bijlenga et al., 2000). Ce potentiel à -65mV est indispensable à l'induction du programme myogénique car il permet un influx calcique qui entraîne l'activation de la voie de la calcineurine qui, à son tour, active la myogénine et MEF2 (Arnaudeau et al., 2006; Constantin et al., 1996; Konig et al., 2004; Konig et al., 2006).

L'objectif de ma thèse a été de déterminer le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) responsable(s) de l'accroissement de l'activité des canaux Kir2.1 en début de différenciation. Les résultats obtenus ont montré que les canaux Kir2.1 étaient déjà présents à la membrane des myoblastes en prolifération mais dans un état inactivé, et que leur activation au cours de la différenciation précédait et induisait celle des facteurs myogénine et MEF2. J'ai ensuite montré que cette activation était due à une modulation de leur état de phosphorylation. Durant les premières heures de la différenciation, la tyrosine 242 des canaux Kir2.1 passe d'un état phosphorylé à un état déphosphorylé modulant l'activité du canal. Ainsi, l'activation des canaux Kir2.1 qui est une étape essentielle à la progression de la différenciation des myoblastes humains est induite par la déphosphorylation de leur tyrosine 242.

INTRODUCTION

Chez les mammifères, le muscle squelettique adulte est un tissu stable, différencié, avec un taux de renouvellement faible en l'absence de lésion. On estime que dans le muscle de rat adulte, seuls 1 à 2% des noyaux sont remplacés par semaine (Schmalbruch and Lewis, 2000). Par contre, lors d'une lésion, le muscle squelettique possède une capacité étonnante à se régénérer. Après une blessure aigüe, de nombreuses fibres sont reconstituées en quelques jours seulement et, après quelques mois, le muscle retrouve une structure quasi normale (Le Gros Clark, 1946). Cette capacité de régénération est due en particulier à la présence d'une population de cellules souches se trouvant à la périphérie des fibres musculaires, les cellules satellites. Ces cellules, activées lors de lésions, prolifèrent et fusionnent pour reformer des fibres fonctionnelles (Mauro, 1961).

Cependant, la capacité de régénération des muscles squelettiques grâce aux cellules satellites n'est pas infinie. Certaines personnes souffrent de dégénération musculaire parce que cette capacité de régénération a été épuisée. C'est le cas, par exemple, des patients atteints de la Dystrophie Musculaire de Duchenne, l'une des myopathies les plus sévères. Cette dystrophie est due à la mutation du gène codant pour la dystrophine, une protéine du cytosquelette qui, lorsqu'elle est absente ou non fonctionnelle, engendre une fragilité des fibres musculaires et une dégénération permanente des muscles squelettiques. Les cellules satellites sont alors continuellement activées et disparaissent rapidement. Les patients meurent par insuffisance cardiaque ou respiratoire après une trentaine d'années.

Les cellules satellites ainsi que leurs cellules filles, les myoblastes, sont porteuses de grands espoirs pour traiter les dystrophies musculaires. Elles pourraient être utilisées comme vecteurs cellulaires transplantables. En effet, les cellules satellites sont nombreuses, facilement accessibles et peuvent être aisément amplifiées sous forme de myoblastes in vitro (Baroffio et al., 1996). Le transfert de myoblastes a ainsi été proposé pour traiter les patients atteints de la Dystrophie Musculaire de Duchenne en réinjectant des myoblastes d'un donneur sain ou des myoblastes dystrophiques génétiquement transformés capables de synthétiser une dystrophine

fonctionnelle. Toutefois, bien que les résultats aient été encourageants chez les souris déficientes en dystrophine, les souris *mdx* (Partridge et al., 1989), les premiers essais cliniques chez l'homme ont été décevants (Tremblay et al., 1993; Karpati et al., 1993; Gussoni et al., 1997; Kakulas, 1997) et montrent qu'une meilleure compréhension de la régénération musculaire est nécessaire.

Le thème principal de recherche de notre laboratoire est d'étudier le processus de régénération musculaire chez l'humain et de déterminer précisément les événements moléculaires qui précèdent la fusion des myoblastes et les facteurs qui induisent leur différenciation. Ainsi, on pourra définir les conditions optimales de survie et de fusion des myoblastes après transplantation, pour finalement améliorer la thérapie cellulaire.

Après un bref rappel des caractéristiques du muscle squelettique humain et des étapes de la régénération musculaire, je détaillerai l'avancement de la recherche sur les facteurs et voies de signalisation induisant la différenciation des myoblastes. Puis, je présenterai les résultats obtenus par notre groupe indiquant que la différenciation des myoblastes humains est induite par l'hyperpolarisation du potentiel membranaire permettant un influx calcique essentiel à la différenciation.

A. La régénération musculaire

1. Le muscle strié squelettique

Le corps humain comprend plus de 600 muscles. Ce qui représente environ 40% de la masse d'un individu. Il existe 3 types de muscles chez les mammifères: le muscle cardiaque, les muscles lisses (qui composent un grand nombre d'organes comme l'utérus ou l'estomac) et les muscles squelettiques (nécessaires aux mouvements volontaires).

1.1 Structure du muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont composés de fibres striées regroupées en faisceaux et entourées d'une enveloppe tissulaire, l'endomysium (figure 1). La longueur moyenne des fibres musculaires est de 3cm et leur diamètre varie de 10 à 100µm. Toutefois, les fibres musculaires peuvent avoir des tailles très variables reflétant la fonction du muscle. Par exemple, les muscles responsables de mouvements précis possèdent des petits faisceaux, comme le muscle stapedius qui actionne l'étrier de l'oreille interne. A l'inverse, les muscles responsables de mouvements grossiers sont constitués de faisceaux volumineux, comme dans le muscle gastrocnémien de la cuisse où les fibres peuvent mesurer jusqu'à 50cm. Les fibres musculaires ont la particularité de posséder plusieurs noyaux (jusqu'à plusieurs centaines) localisés juste en dessous de la membrane plasmique et provenant de la fusion de nombreux myoblastes lors de la formation du muscle.

Chaque fibre est entourée d'une membrane appelée sarcolemme et est formée de myofibrilles. Chaque myofibrille est divisée en sarcomères, structures représentant l'unité fonctionnelle du muscle. Les sarcomères rassemblent un ensemble de myofilaments d'actine et de myosine, qui sont des protéines qui coulisent entre elles assurant ainsi la contraction du muscle. Une fibre possède en outre un réticulum très étendu appelé réticulum sarcoplasmique, qui est la source du calcium nécessaire à la contraction, et une grande quantité de mitochondries qui fournissent l'énergie indispensable à cette contraction (figure 1).

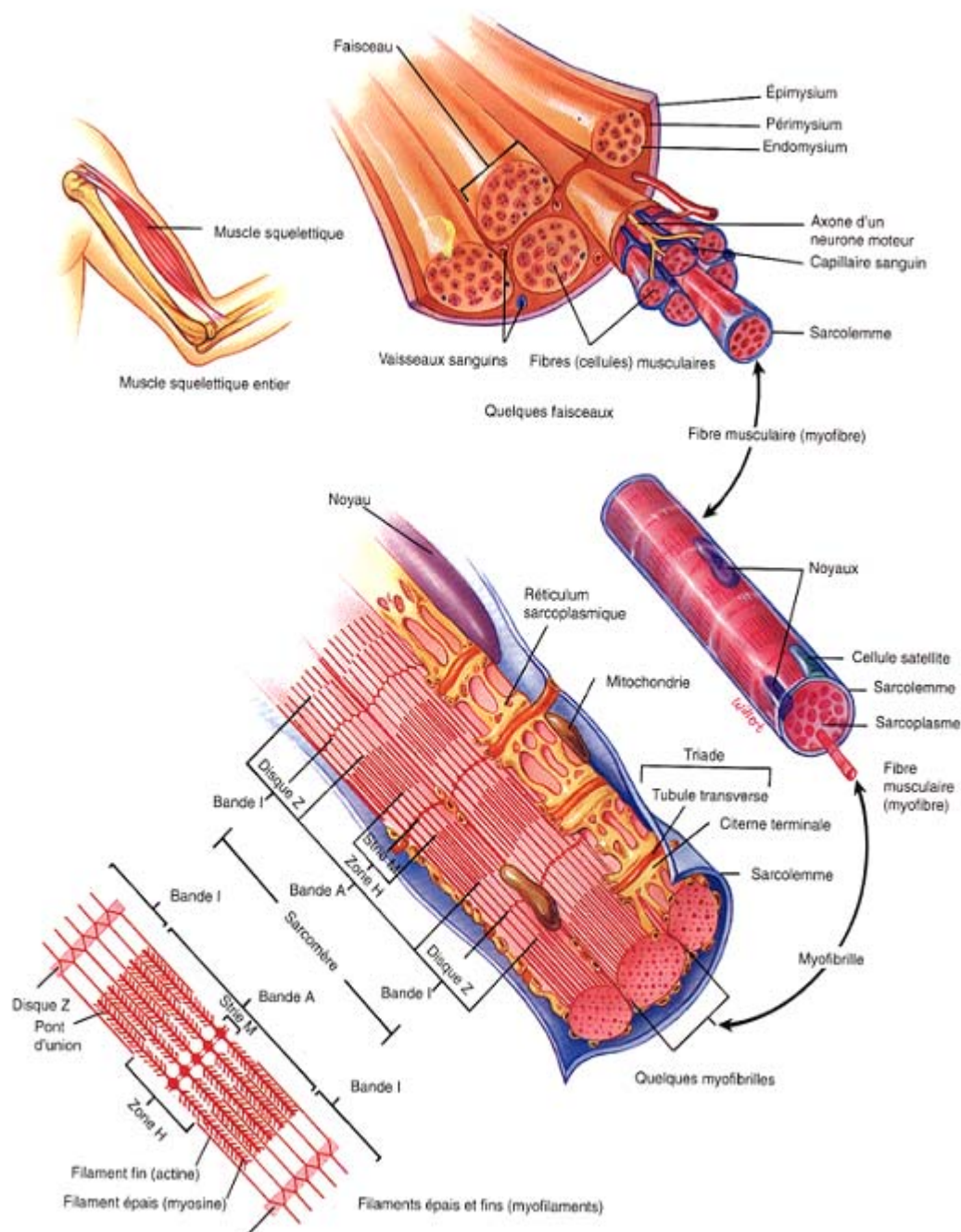


Figure 1 : Structure du muscle squelettique (tiré du livre de Tortora et Derrickson, *Principes d'anatomie et de physiologie*, 1994). Le muscle squelettique est composé de plusieurs faisceaux de fibres musculaires striées. Une fibre musculaire (ou myofibre) regroupe un ensemble de myofibrilles divisées en sarcomères qui sont constitués de filaments épais et fins, les myofilaments.

1.2 Contrôle du mouvement musculaire

Chaque fibre musculaire est innervée par un motoneurone provenant de la corne antérieure de la moelle épinière. Un motoneurone peut innerver plusieurs fibres musculaires et on appelle unité motrice l'ensemble des fibres musculaires contrôlées par le même motoneurone.

L'influx nerveux provenant du cerveau est propagé le long de l'axone du motoneurone et entraîne la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique qui sépare le neurone de la fibre musculaire. L'acétylcholine libérée provoque la contraction de la fibre musculaire par un mécanisme de couplage électromécanique.

Brièvement, la liaison de l'acétylcholine à des récepteurs présents sur la membrane de la fibre musculaire engendre une dépolarisation locale de la membrane de la fibre. Cette dépolarisation crée un potentiel d'action qui se propage le long de la fibre musculaire via les tubules transverses au niveau de la triade (figure 1), et active la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique dans le cytosol. Le calcium permet la liaison de la myosine à l'actine, protéines qui "coulissent" alors l'une par rapport à l'autre, en présence d'ATP, entraînant la contraction de la fibre musculaire (figure 2).

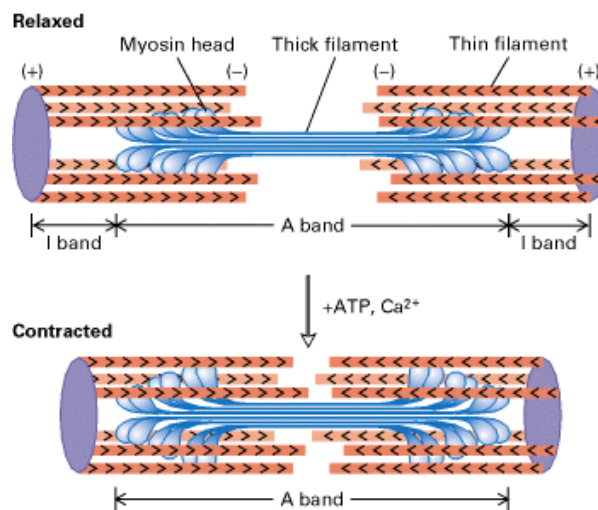


Figure 2 : Contraction d'un sarcomère (tiré du livre de Biologie moléculaire des cellules, Freeman and Co, 1999). Les têtes de myosines (*thick filament*) "coulissent" le long des filaments fins d'actine (*thin filament*) en présence de calcium et d'ATP, permettant le raccourcissement du muscle ou contraction.

1.3 Capacité régénérative du muscle

Le muscle squelettique possède des cellules souches qui permettent la croissance de la masse musculaire pendant l'enfance et la régénération du muscle adulte après lésion. Ces cellules, appelées cellules satellites et décrites pour la première fois par Alex Mauro en 1961, sont mononucléées et localisées à la périphérie des fibres musculaires, entre la membrane plasmique et la lame basale des fibres, d'où leur nom (Mauro, 1961). Dès leur découverte, les scientifiques ont cherché à identifier les marqueurs moléculaires spécifiques de cette population afin de les différencier des autres cellules mononucléées du muscle (Hawke and Garry, 2001). Ainsi, la M-cadhérine, molécule d'adhésion calcium-dépendante, c-met, le récepteur au facteur de croissance hépatocytaire, MNF, le facteur nucléaire des myocytes, VCAM-1, la molécule d'adhésion des cellules vasculaires, NCAM, la molécule d'adhésion des cellules neurales et le facteur de transcription Pax7 ont été décrits pour être spécifiquement exprimés par les cellules satellites (Tableau 1).

Les cellules satellites apparaissent à la surface des fibres musculaires durant la dernière phase de la formation du muscle pendant l'embryogenèse et restent quiescentes jusqu'à ce qu'un "stress" musculaire (croissance ou lésion) entraîne leur activation. Durant la période de croissance, leur nombre diminue avec l'âge. Représentant environ 50% des noyaux des fibres musculaires à la naissance, elles ne sont plus que 5% à l'âge adulte (Morgan and Partridge, 2003).

Mais, les cellules satellites ne sont pas les seules cellules capables de régénérer le muscle squelettique. De récentes études ont montré que d'autres populations de cellules pouvaient contribuer à la régénération musculaire (Wagers and Conboy, 2005). Tout d'abord, des cellules musculaires appelées "*side population*" ont été retrouvées dans les myofibres régénérées (Asakura et al., 2002), puis des cellules d'origine non musculaire appelées "*nonmuscle resident stem cells*" ont été proposées comme source alternative à la régénération musculaire. Ainsi, des cellules de la moelle osseuse ou des cellules de la paroi aortique appelées mésangioblastes sont capables de reconstituer des myofibres après avoir été injectées dans le muscle lésé (LaBarge and Blau, 2002; De angelis et al., 1999; Peault et al., 2007). Toutefois, ces populations de cellules semblent n'avoir qu'un rôle mineur dans la réparation du muscle squelettique lésé.

Molecular Marker	Expression Observed in the Adult
MNF	Quiescent, activated, and proliferating satellite cells
Pax7	Quiescent, activated, and proliferating satellite cells
c-Met	Quiescent, activated, and proliferating satellite cells
M-cadherin	Quiescent, activated, and proliferating satellite cells
NCAM	Quiescent, activated, and proliferating satellite cells; synaptic junctions in adult myofibers
VCAM-1	Quiescent, activated, and proliferating satellite cells
Desmin	Activated and proliferating satellite cells
myf5	Activated and proliferating satellite cells
MyoD	Activated and proliferating satellite cells

Tableau 1 : Marqueurs utilisés pour identifier les cellules satellites (Hawke and Garry, 2001).

Deux populations se démarquent : les cellules satellites quiescentes et les cellules satellites activées.

2. Les étapes de la régénération musculaire après lésion

La régénération musculaire est caractérisée par deux phases successives : d'abord une phase de dégénérescence des fibres endommagées, puis une phase de régénération du muscle.

2.1 La nécrose du muscle après lésion

Dans les premières heures qui suivent une lésion, la zone lésée est envahie par de nombreuses cellules inflammatoires qui phagocytent les fibres musculaires nécrotiques (Tidball, 2005). Ce processus de lyse est une étape primordiale de la régénération musculaire. Elle permet sans doute de faire place nette avant la reconstruction du muscle. La rupture des fibres musculaires libère de nombreuses molécules qui (1) activent la protéolyse, comme le calcium provenant du réticulum sarcoplasmique qui induit l'activation des protéases calpaines (Kwak et al., 1993), et (2) activent les cellules inflammatoires résidant dans le muscle. Ces cellules libèrent, une fois activées, des facteurs chimiotactiques qui attirent d'autres cellules inflammatoires circulantes (Tidball, 1995).

Les premières cellules inflammatoires à infiltrer la blessure sont les neutrophiles. Ces cellules sont capables de sécréter des protéases qui dégradent les fibres endommagées et de phagocyter les débris cellulaires (MacIntyre et al., 2001). Les neutrophiles relâchent aussi des molécules cytotoxiques et cytolytiques comme les superoxydes qui contribuent à la dégradation des fibres nécrotiques. Il a, en effet, été montré que l'inhibition des superoxydes par la *superoxide dismutase* dans une co-culture de cellules musculaires et de neutrophiles activés prévient la lyse des cellules musculaires par les neutrophiles (Nguyen and Tidball, 2003a). Puis, environ 48h après la lésion, les macrophages deviennent les cellules inflammatoires prédominantes. Ils phagocytent et lysent massivement les fibres détériorées selon un mécanisme dépendant de l'oxyde nitrique (NO). De récents travaux ont également démontré que ces deux populations de cellules inflammatoires s'activaient l'une l'autre. Les macrophages, par exemple, sont activés par la présence de neutrophiles (Nguyen and Tidball, 2003b).

Toutefois, le rôle des cellules inflammatoires ne s'arrête pas à la destruction des fibres musculaires lésées. Elles ont également un rôle d'induction de la régénération musculaire. Les macrophages sécrètent des facteurs qui augmentent le taux de prolifération des myoblastes (Cantini and Carraro, 1995). Ces facteurs ne sont pas encore identifiés mais plusieurs candidats sont proposés, comme le TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) qui est sécrété environ 48h après lésion, soit au moment où les macrophages deviennent actifs (Barash et al., 2004), ou l'HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like Growth Factor*) connu pour être sécrété par les macrophages et pour augmenter la survie des cellules musculaires après un stress oxydatif (Horikawa et al., 1999).

2.2 La régénération du muscle

La formation de nouvelles fibres musculaires ou la réparation des fibres endommagées est possible grâce à l'activation des cellules souches du muscle, les cellules satellites. Ces cellules sont activées très tôt après la lésion par de multiples facteurs, en particulier les facteurs de croissance HGF, FGF, IGF-I et IGF-II, qui sont, soit libérés de la matrice extracellulaire lors de la lésion, soit sécrétés par des cellules adjacentes (Charge and Rudnicki, 2004). L'HGF (*Hepatocyte Growth Factor* ou *Scatter factor*) est libéré après un étirement des fibres ou après une lésion par un mécanisme dépendant du NO. Tatsumi et collaborateurs ont montré que l'HGF agissait sur les cellules satellites en se liant à son récepteur c-met, et réactivait ainsi leur entrée dans le cycle de division cellulaire (Tatsumi et al., 1998; Tatsumi et al., 2002). Les différents membres de la famille des FGF (*Fibroblast Growth Factor*), qui sont relâchés par les fibres endommagées, activent quant à eux la prolifération des cellules satellites qui expriment à leur surface les récepteurs FGFR1-4 (Yablonka-Reuveni and Anderson, 2006; Sheehan and Allen, 1999). Enfin, l'IGF-I et l'IGF-II (*Insulin Growth Factor I or II*) dont la transcription est induite dans les myoblastes pendant le processus de régénération (Edwall et al., 1989) sont connus pour stimuler la prolifération et la différenciation des myoblastes (Allen and Boxhorn, 1989; Doumit et al., 1993).

Après leur activation, les cellules satellites se divisent de façon asymétrique. Sur les deux cellules filles issues de la première division cellulaire, une des cellules redevient dormante et reconstitue le stock de cellules souches (on dit qu'elles sont capables de s'auto-renouveler), tandis que l'autre cellule continue à se multiplier (Webster and Blau, 1990; Widmer et al., 1995).

Les cellules qui prolifèrent sont les cellules qui reformeront des fibres musculaires en se différenciant. Elles sont appelées myoblastes ou cellules précurseurs myogéniques (*mpc*). Le processus de différenciation des myoblastes comprend plusieurs étapes : (1) une étape de retrait du cycle cellulaire, (2) une étape d'alignement, (3) une étape de fusion et d'expression des protéines spécifiques du muscle et enfin (4) une étape de maturation des myotubes en fibres musculaires contractiles (Le Moigne et al., 1990). Notons que les myoblastes peuvent soit fusionner entre eux pour former de nouvelles fibres musculaires soit, fusionner avec des fibres existantes (Figure 3).

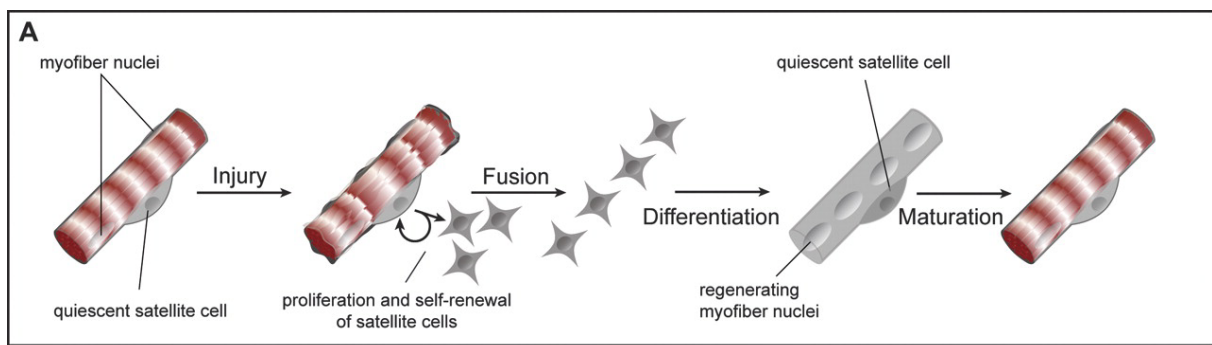


Figure 3 : Les étapes de la régénération musculaire (Shi and Garry, 2006).

Ce processus de différenciation est complexe et nécessite l'activation finement orchestrée de nombreux facteurs et voies de signalisation.

B. La régulation de la différenciation des myoblastes

1. Les facteurs de transcription

La régulation de la régénération musculaire se fait en deux phases : une phase de détermination et d'activation des cellules satellites contrôlée par les facteurs Pax, Notch et Forkhead, suivie d'une phase qui comprend la prolifération et la différenciation des myoblastes contrôlée par les facteurs MRFs et MEF2s.

1.1 Les facteurs des cellules satellites

Les facteurs Pax3 et Pax7, spécifiquement exprimés dans les cellules satellites, sont impliqués dans leur détermination. Ils contrôlent l'entrée des cellules satellites dans le programme myogénique. Pax7 agit en particulier sur la survie des cellules satellites. Ainsi, l'absence de Pax7 chez les souris mutantes est caractérisée par l'absence totale de cellules satellites (Seale et al., 2000). Récemment, le groupe de Buckingham a démontré que Pax3 était également présent dans les cellules satellites mais son rôle n'est pas connu. On sait, cependant, que Pax3 ne compense pas l'effet anti-apoptotique de Pax7 quand ce dernier est absent (Relaix et al., 2006).

Les facteurs Notch et Forkhead sont exprimés très tôt dans les cellules satellites. Notch entraînerait l'activation et la prolifération des cellules satellites et inhiberait l'entrée en différenciation des myoblastes (Kuroda et al., 1999; Kitamura et al., 2007; Conboy and Rando, 2002). De son côté, Forkhead régulerait la progression des cellules satellites dans le cycle cellulaire. Ainsi, l'absence de Foxh-1 chez les souris mutantes entraîne une diminution importante du nombre de cellules satellites (Hawke et al., 2003).

Une fois activées, les cellules satellites réduisent l'expression de Pax3 et Pax7 au profit de deux familles de facteurs de transcription : les facteurs MRFs qui régulent l'expression des gènes spécifiques du muscle et les membres de la famille des MEF2 qui collaborent avec les facteurs MRFs pour induire la transcription de ces gènes.

1.2 Les facteurs MRFs

Les facteurs MRFs (*Myogenic Regulatory Factors*), au nombre de quatre (MyoD, Myf5, myogénine et MRF4), font partie de la famille des facteurs de transcription *basic helix-loop-helix* (bHLH) qui possèdent un domaine conservé basique qui lie l'ADN et un motif *helix-loop-helix* requis pour l'hétéromérisation. La particularité de ces facteurs MRF est qu'ils activent la transcription de gènes spécifiques du muscle squelettique au cours de la différenciation en se liant à la séquence consensus CANNTG appelée *E-box* qui se trouve sur les promoteurs de ces gènes (Davis et al., 1990; Sabourin and Rudnicki, 2000). Pour ce faire, ils forment des hétérodimères avec une classe de protéines bHLH ubiquitaires les *E proteins* et les MEF2 (voir plus loin).

Chacun de ces quatre facteurs permet l'initiation du programme myogénique quand ils sont exprimés dans des cellules non musculaires (Olson, 1990; Emerson, 1993; Wright, 1992; Lassar and Munsterberg, 1994). MyoD est le premier facteur à avoir été identifié en vertu de sa capacité à convertir des fibroblastes en cellules musculaires (Davis et al., 1987). Ces quatre facteurs sont exprimés selon une séquence temporelle précise au cours de la myogenèse et de la régénération musculaire, et permettent de contrôler les différentes étapes de la différenciation (Figure 4). Nous ne nous intéresserons ici qu'à leurs rôles dans la régénération musculaire.

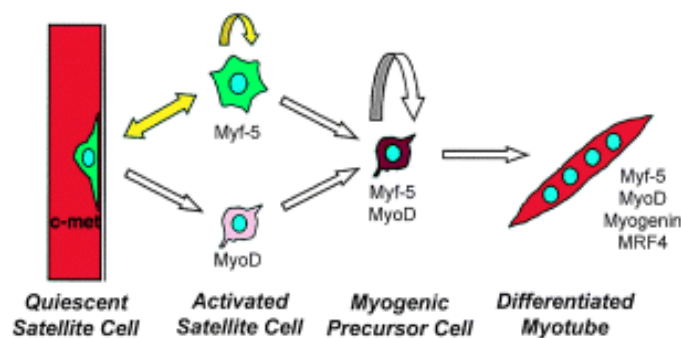


Figure 4 : Expression des facteurs MRFs au cours de la différenciation (Sabourin and Rudnicki, 2000). MyoD et Myf5 sont exprimés dans les cellules satellites activées alors que la myogénine et MRF4 sont exprimés plus tardivement, dans les myoblastes (ou *mpc*) en différenciation.

- **MyoD**

Le facteur MyoD est exprimé dès la douzième heure après l'activation des cellules satellites et bien avant les premiers signes de division cellulaire. MyoD est un facteur clé de l'induction de la différenciation des myoblastes (Cooper et al., 1999). En effet, après la naissance, les souris knock-out $\text{MyoD}^{-/-}$ régénèrent faiblement leur muscle car même si elles possèdent des myoblastes qui se divisent, ces derniers ne se différencient plus (Sabourin et al., 1999). MyoD aurait deux rôles principaux : il serait essentiel au retrait du cycle cellulaire en activant les inhibiteurs du cycle Rb et p21 (Kitzmann and Fernandez, 2001) et il permettrait l'activation de gènes spécifiques du muscle comme la myogénine en se liant à différents facteurs tels que MEF2 ou les acétyl-transférases p300/CBP et PCAF (Puri et al., 1997).

- **Myf5**

Myf5 est également exprimé très tôt après une lésion. Toutefois, alors qu'il peut se substituer à MyoD durant l'embryogenèse, Myf5 ne compense pas la perte de MyoD chez l'adulte (Megeney et al., 1996). Certains travaux suggèrent que Myf5 favoriserait l'auto-renouvellement des cellules satellites. Plusieurs groupes se sont rendus compte que les cellules satellites activées exprimaient soit Myf5, soit MyoD avant de les exprimer ensemble et de se différencier. L'hypothèse suivante a alors été proposée : les cellules $\text{Myf5}^+/\text{MyoD}^-$ seraient les cellules qui redeviendraient quiescentes alors que les cellules $\text{Myf5}^-/\text{MyoD}^+$ seraient les cellules qui continueraient à se diviser en exprimant par la suite les deux facteurs conjointement (Yoshida et al., 1998).

- **Myogénine**

La myogénine est induite au cours de la phase précoce de différenciation. Elle est exprimée quelques heures après MyoD et Myf5, avant même que les myoblastes ne soient sortis du cycle cellulaire (Andres and Walsh, 1996). Elle contrôle le processus de différenciation en activant la transcription de gènes codant des protéines telles la desmine ou la créatine kinase (MCK) (Ohkawa et al., 2007). Relevons cependant que Knapp et collaborateurs ont récemment découvert que la myogénine n'était pas essentielle à la régénération musculaire postnatale. Pour ce faire, ils ont créé une souris mutante conditionnelle car les souris $\text{Myog}^{-/-}$ meurent à la naissance. Grâce à cette souris conditionnelle, ils ont pu étudier le rôle de la myogénine dans le processus de régénération chez l'adulte. Leurs résultats indiquent que la formation musculaire postnatale peut avoir lieu en absence de myogénine et qu'elle est alors

contrôlée par des mécanismes distincts de ceux du développement embryonnaire (Knapp et al., 2006).

- **MRF4**

Le dernier facteur, MRF4, a été décrit comme un facteur de différenciation tardif activant des gènes de maturation des fibres musculaires. Il ne semble pas être impliqué dans les étapes de la prolifération et de la différenciation précoce des myoblastes (Zhou and Bornemann, 2001; Becker et al., 2003). De plus, alors que Kassar-Duchossoy et collaborateurs montrent que MRF4 peut compenser le rôle de MyoD et de Myf5 pendant la myogenèse embryonnaire (Kassar-Duchossoy et al., 2004), des travaux récents indiquent qu'il ne peut pas jouer ce rôle compensateur dans les cellules satellites chez l'adulte (Gayraud-Morel et al., 2007).

Malgré les avancées rapides dans ce domaine, relevons qu'il reste encore beaucoup à découvrir sur le rôle de ces facteurs dans la régénération musculaire adulte.

1.3 Les facteurs MEF2s

La famille des facteurs de transcription MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) comprend quatre membres chez les vertébrés : MEF2-A, -B, -C et -D. Originellement, MEF2 fut identifié grâce à sa capacité à se lier à une séquence d'ADN riche en bases A et T qui se trouve sur le promoteur de la créatine kinase musculaire (Gossett et al., 1989). Depuis, la liste des gènes spécifiques du muscle activés par MEF2 s'est considérablement allongée avec, entre autres, la myosine, la desmine, la myoglobine, la dystrophine et la troponine C (Black and Olson, 1998). Les MEF2 font partie de la famille des facteurs de transcription MADS (*MCM1 Agamous Deficiens SRF*) qui possèdent une séquence de 57 acides aminés sur leur partie N-terminale permettant leur dimérisation et leur liaison à l'ADN (Molkentin et al., 1996). Toutefois, bien que MEF2 soit un activateur transcriptionnel, il n'est pas capable, seul, d'activer le programme myogénique (Yu et al., 1992). Il agit sur l'activation des gènes spécifiques du muscle en recrutant et en s'associant aux protéines bHLH myogéniques. Les facteurs MEF2 peuvent se lier aux protéines bHLH grâce à une séquence en N-terminale appelée domaine MEF2. En 1995, le groupe d'Olson démontre que MEF2A, MEF2C et MEF2D peuvent se lier à MyoD et à la myogénine pour activer la différenciation myogénique (Molkentin et al., 1995). Par exemple, MEF2C s'associe à MyoD/E12 pour activer

l'expression de la chaîne lourde de la myosine, et MEF2D se lie à la myogénine pour induire la transcription de la desmine et de la créatine kinase musculaire (Ohkawa et al., 2007).

Dans les muscles embryonnaires et adultes, les quatre facteurs MEF2 sont exprimés de façon distincte dans le temps. Dans les cellules musculaires squelettiques en culture, MEF2D est exprimé durant la phase de prolifération des myoblastes, alors que MEF2A est exprimé au début de la différenciation des myoblastes et MEF2C en fin de différenciation (Black and Olson, 1998). Le facteur MEF2B, bien que présent sous forme de protéine, ne semble pas être impliqué dans la régénération musculaire (d'après nos observations non publiées). Les facteurs MEF2 sont également présents dans de nombreux autres tissus : dans le cerveau, les lymphocytes, les muscles lisses, le muscle cardiaque, les os et l'endothélium vasculaire. Pour chacun de ces tissus, comme pour le muscle squelettique, MEF2 agit comme un régulateur central de développement grâce à sa capacité à potentialiser d'autres facteurs de transcription (Potthoff and Olson, 2007). Dans le muscle squelettique adulte, en plus de contrôler de nombreux gènes de structure du muscle, MEF2 module aussi l'expression des facteurs bHLH myogéniques, comme la myogénine et MyoD, entraînant un rétrocontrôle positif qui permet d'amplifier le programme de différenciation (Haberland et al., 2007). Enfin, MEF2 contrôlerait aussi la spécification des fibres musculaires en fibres lentes ou rapides en réponse aux fluctuations du calcium intracellulaire engendrées par les signaux physiologiques externes (Bassel-Duby and Olson, 2006).

L'association des protéines MEF2 et bHLH, activant en synergie les gènes spécifiques du muscle, est certainement le mécanisme majeur de la régulation transcriptionnelle du programme myogénique (Black et al., 1998). Par conséquent, l'étude des voies de signalisation et des molécules intracellulaires régulant leur expression et leur activité au cours de la différenciation est vite apparue comme un enjeu important pour la compréhension du processus global.

2. Les voies de signalisation

Les voies de signalisation contrôlant la différenciation ciblent en particulier les facteurs MEF2 et myogénine. Quatre voies de signalisation indépendantes induisent l'activation de la myogénine et de MEF2 durant la différenciation des myoblastes (figure 5) : la voie du Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K), la voie de la p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38-MAPK), la voie de la Ca^{2+} -Calmodulin dependent Kinase (CaMK) et enfin la voie de la calcineurine (Xu et al., 2002; Wu et al., 2000; Tamir and Bengal, 2000; Keren et al., 2006).

2.1 La voie de la PI3K

De nombreuses études ont prouvé que la PI3K était impliquée dans le processus de différenciation myogénique. La PI3K est le messager secondaire activé par l'IGF-I, dont l'un des rôles est de promouvoir la différenciation en induisant l'expression et l'activation des MRFs (Musaro and Rosenthal, 1999). Ces études démontrent que l'activité transcriptionnelle des protéines MEF2 est induite lorsque la PI3K activée phosphoryle Akt (aussi appelé PKB). L'activation des facteurs MEF2 engendre alors la transcription de la myogénine (Tamir and Bengal, 2000; Xu et al., 2002). L'expression de la myogénine et l'activation de MEF2 sont donc tous les deux sous le contrôle de la voie de signalisation IGF/PI3K/Akt (figure 5).

2.2 La voie de la p38-MAPK

Les études de ces dernières années indiquent que la p38-MAPK serait une des voies de signalisation intracellulaire majeures affectant la myogenèse (Keren et al., 2006). La p38-MAPK est activée par une cascade de kinases. Elle est d'abord phosphorylée par des kinases appelées MAPK Kinase (MAP2K) qui sont elles même phosphorylées et activées par des MAPK Kinases Kinases (MAP3K) reliées aux récepteurs de facteurs de croissance tyrosine kinase (RTK). La p38-MAPK, dont l'activité est induite au cours de la différenciation, phosphorylerait directement MEF2A et MEF2C permettant ainsi leur activation (Wu et al., 2000). MEF2D est aussi un substrat de la p38-MAPK, qui une fois phosphorylé peut s'associer à MyoD pour activer des gènes de différenciation tardifs comme la desmine et la myosine (Penn et al., 2004). Enfin, la p38-MAPK semble aussi jouer un rôle dans les phases très précoces de la différenciation. Une étude récente indique que la

p38-MAPK phosphoryle E47 (un partenaire de MyoD) qui, une fois en association avec lui, permet la transcription de nombreux gènes précoces de la différenciation myogénique (Lluis et al., 2005). La p38-MAPK contrôle également l'expression de la myogénine via l'activation des facteurs MEF2 et MyoD (figure 5) (Xu et al., 2002).

2.3 La voie de la CaMK

Il y a quelques années, une série de travaux ont montré (1) que l'expression des gènes dépendants de MEF2 était réprimée par l'interaction de MEF2 avec des histones déacétylases de classe II, la HDAC4 et la HDAC5, et (2) que l'activation de la CaMK permettait la libération des facteurs MEF2 de la répression des HDACs (Lu et al., 2000; McKinsey et al., 2000a). Les CaMK sont des kinases sérine/thréonine activées par le calcium et la calmoduline, la calmoduline (ou CaM) étant une petite protéine sensible aux élévations intracellulaires de calcium. Les résultats indiquent que, dans les cellules myogéniques, l'activation de la CaMK entraîne la phosphorylation des sérines 259 et 498 d'HDAC5 qui est alors dissocié de MEF2 par l'enzyme 14-3-3. Une fois dissocié, l'HDAC5 est exporté du noyau au cytoplasme et le facteur MEF2 peut alors jouer son rôle de facteur de transcription (figure 5) (McKinsey et al., 2000a; McKinsey et al., 2000b). En 2002, le groupe de Wu et collaborateurs confirme que l'inhibition de la CaMK empêche la différenciation de la lignée myogénique C2C12 et montre que son activation entraîne l'augmentation de l'expression de la myogénine via l'activation de MEF2 et de MyoD (Xu et al., 2002).

2.4 La voie de la calcineurine

La dernière voie de signalisation, mais certainement pas la moindre, est la voie de la calcineurine. La calcineurine est une phosphatase sérine/thréonine dépendante du calcium qui possède une sous-unité catalytique A se liant à la calmoduline et une sous-unité régulatrice B se liant directement au calcium. Dans les lymphocytes, la calcineurine déphosphoryle le facteur nucléaire activé des cellules T (NFAT), entraînant une translocation du NFAT du cytoplasme dans le noyau où il s'associe avec les facteurs de transcription pour activer les gènes dépendants du calcium (Rao et al., 1997). Au cours de la régénération musculaire, l'activation de la calcineurine induit la différenciation des myoblastes en augmentant l'expression de la myogénine via l'activation de MEF2 (Xu et al., 2002). Toutefois, aucune étude n'a jusqu'à maintenant confirmé que cet effet sur MEF2 était dépendant de NFAT. De

plus, certains travaux sur le rôle de NFAT dans la différenciation sont contradictoires. Dans un cas, il est clairement démontré que NFATc3 intervient dans l'effet stimulateur de la calcineurine sur la différenciation (Delling et al., 2000), tandis qu'une autre étude écarte complètement l'hypothèse d'un rôle de NFAT dans la différenciation précoce (Friday et al., 2000). Au contraire, ce dernier groupe montre que l'activation des facteurs MEF2 et MyoD par la calcineurine est due à l'inhibition de l'expression de Egr-1 et de Id, deux protéines connues pour réprimer MEF2 et MyoD (figure 5) (Friday et al., 2003).

Notons que les voies de la CaMK et de la calcineurine sont actuellement l'objet de multiples recherches montrant qu'elles sont également impliquées, lors d'étapes ultérieures de la différenciation, dans la spécification des fibres musculaires en fibres lentes ou rapides (Mu et al., 2007).

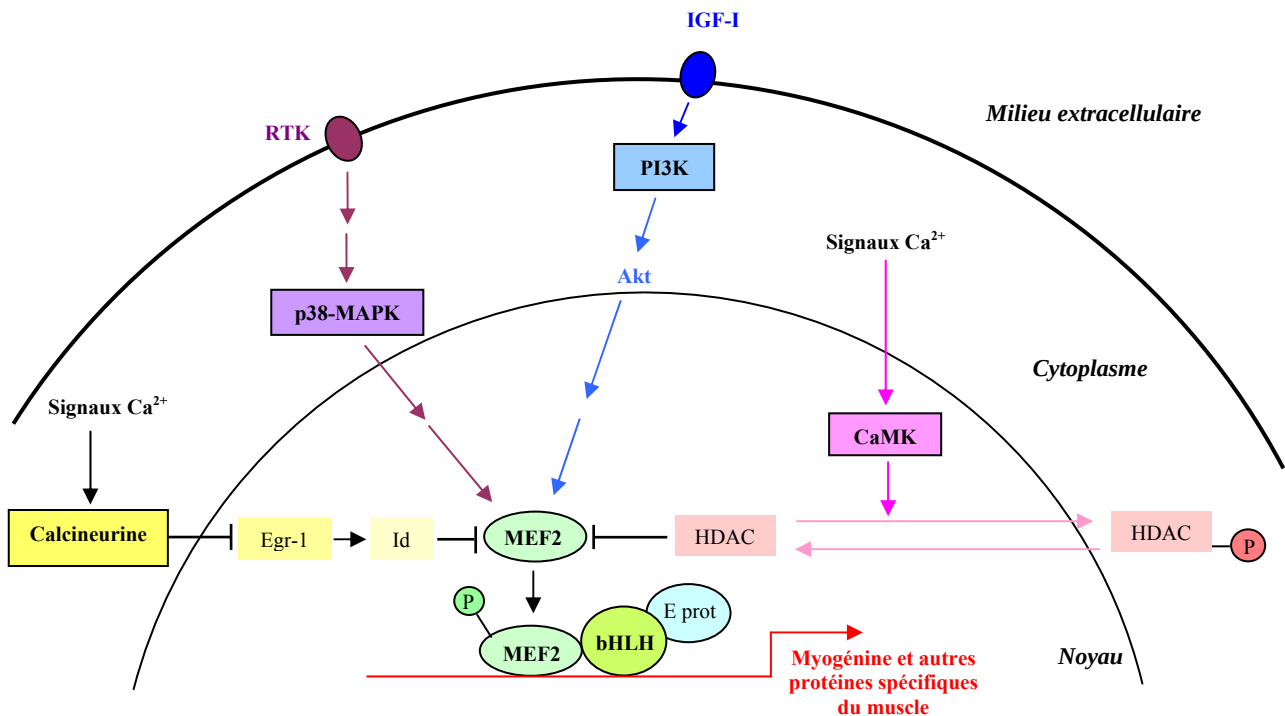


Figure 5 : Les quatre voies de signalisation impliquées dans l'induction de la différenciation myogénique. La calcineurine (jaune), la p38-MAPK (violet), la PI3K (bleu) et la CaMK (rose) agissent sur les facteurs de transcription MEF2 et bHLH pour activer la transcription des gènes spécifiques du muscle (dont la myogénine).

Dès lors, deux questions se posent : quels signaux sont nécessaires au déclenchement de ces voies de signalisation et par quel mécanisme ces signaux sont-ils induits ? C'est en voulant répondre à ces questions que notre groupe a découvert qu'une étape d'hyperpolarisation membranaire engendrant un influx calcique était essentielle à la différenciation des myoblastes humains.

C. Le rôle de l'hyperpolarisation dans la différenciation

1. Les canaux ioniques impliqués

Il y a environ une dizaine d'années, notre groupe a mesuré le potentiel membranaire de myoblastes humains durant le processus de différenciation. Nous avons observé que les myoblastes s'hyperpolarisaient d'un potentiel de membrane peu négatif dans les myoblastes en prolifération (-8mV) vers un potentiel très négatif dans les myoblastes capables de fusionner et les myotubes nouvellement formés (-65mV). Notre groupe a montré depuis que cette hyperpolarisation était due à l'activation séquentielle de deux canaux potassiques distincts (figure 6).

1.1 Les canaux h-eag et Kir2.1

Lors de l'induction de la différenciation, les myoblastes humains expriment un canal potassique non-inactivant, l'éther-a-go-go ou h-eag (Bernheim et al., 1996). Ce canal a la particularité de s'ouvrir et de rester ouvert quand le potentiel de membrane est dépolarisé et de se fermer quand il est hyperpolarisé. Il permet donc aux myoblastes de s'hyperpolariser jusqu'aux environs de -40mV. Puis, les myoblastes expriment un second canal potassique, le canal Kir2.1, ou canal potassique rectifiant entrant famille 2 membre 1 (Liu et al., 1998; Fischer-Lougheed et al., 2001). Ce deuxième canal s'ouvre quand le potentiel de membrane s'hyperpolarise et se ferme lorsqu'il se dépolarise. Lors de son expression, il entraîne donc l'hyperpolarisation des myoblastes de -40mV à -65mV. En raison de leurs propriétés biophysiques respectives, l'expression séquentielle des deux canaux est requise pour permettre l'hyperpolarisation des myoblastes jusqu'à -65mV. Exprimé seul, le canal Kir2.1 ne pourrait pas hyperpolariser les myoblastes puisqu'il serait dans un état fermé au potentiel de -8mV.

Les myoblastes capables de fusionner ont donc un potentiel membranaire aux environs de -65mV juste avant leur fusion. Il est connu depuis longtemps que les fibres musculaires squelettiques ont un potentiel très hyperpolarisé. Ce potentiel est nécessaire à l'activité des canaux sodiques dépendants du voltage à l'origine de la contraction musculaire. Toutefois,

l'activation des canaux Kir2.1 durant la différenciation a un rôle très différent. Notre groupe a montré que l'hyperpolarisation des myoblastes humains était nécessaire à leur différenciation et leur fusion. Lorsque l'expression des canaux Kir2.1 est inhibée par des constructions Kir2.1 anti-sens, la fusion des myoblastes n'a pas lieu (Fischer-Lougheed et al., 2001). De même, lorsque les canaux Kir2.1 sont bloqués par l'ajout de césium dans le milieu extracellulaire, les myoblastes ne fusionnent plus (Liu et al., 1998).

1.2 Les canaux calciques

Dès 1969, de nombreux groupes se sont penchés sur le rôle du calcium dans la différenciation musculaire, après que Shainberg et collaborateurs aient remarqué que la présence de calcium dans le milieu de culture de cellules musculaires squelettiques de rats était nécessaire à leur différenciation (Shainberg et al., 1969). Le calcium aussi bien intracellulaire qu'extracellulaire est impliqué dans le processus de régénération des fibres, autant au niveau des étapes précoces de la différenciation des myoblastes qu'au niveau de la fusion. Une augmentation du calcium intracellulaire est cruciale pour l'induction de la différenciation. Plusieurs groupes ont observé une inhibition de la fusion quand le calcium intracellulaire est chélaté par le BAPTA-AM (Constantin et al., 1996) ou au contraire une accélération de la fusion quand l'influx calcique est augmenté (David et al., 1981). Le calcium extracellulaire est également essentiel à la fusion car les cadhérines qui sont des protéines d'adhésion indispensables à la fusion des myoblastes sont dépendantes du calcium (Lognonne and Wahrman, 1986).

Il y a 8 ans, notre groupe a montré que l'hyperpolarisation des myoblastes permettait un influx de calcium à travers des canaux calciques de type T dépendants du voltage, les canaux CaT- α 1H (Bijlenga et al., 2000). Dû au chevauchement de leurs propriétés d'activation et d'inactivation, ces canaux ont la particularité de permettre un influx de calcium petit mais constant entre -40mV et -70mV (le courant de fenêtre, *window current*, figure 6). À -75mV, les canaux sont fermés et à -35mV ils sont activés transitoirement. Par contre, entre -70mV et -40mV, il existe une probabilité non nulle qu'une fraction des canaux T reste ouverte en permanence.

Notre groupe a ensuite montré que cet influx calcique était nécessaire à la fusion des myoblastes. En effet, l'inhibition spécifique des canaux CaT- α 1H par l'ajout de 200 μ M de nickel dans le milieu extracellulaire bloque la fusion des myoblastes.

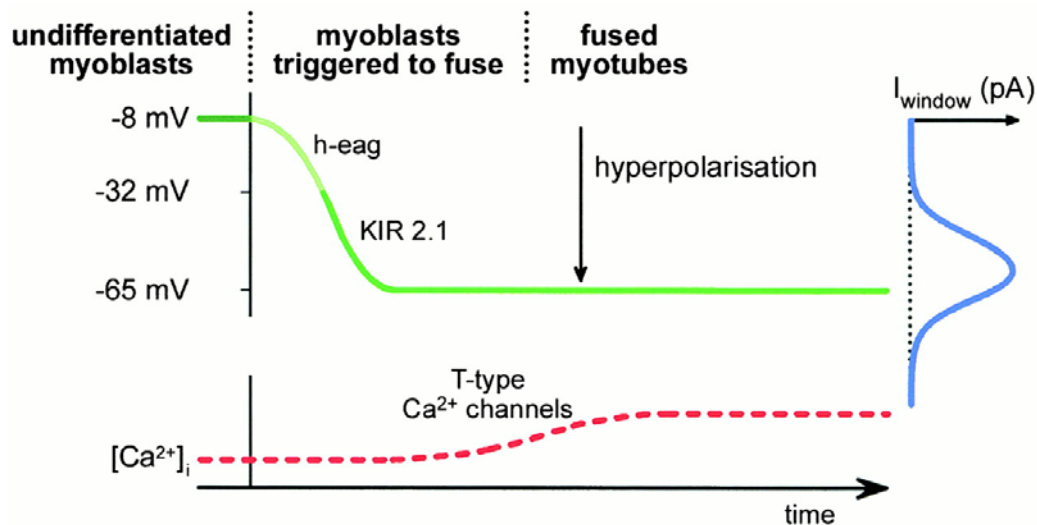


Figure 6 : Modèle des événements qui induisent la différenciation des myoblastes humains (Cooper, 2001). L'hyperpolarisation des myoblastes induits à différencier (ligne verte) permet un influx de calcium à travers les canaux calciques de type T (ligne rouge) dont le courant de fenêtre maximum est aux environs de -65mV (ligne bleue).

Quelques années plus tard, nous avons observé que d'autres canaux calciques étaient capables de subvenir à l'augmentation cytoplasmique de calcium nécessaire à la fusion des myoblastes. Nous avons montré que les myoblastes humains pouvaient utiliser deux mécanismes additionnels : en plus de l'influx passant par les canaux CaT, l'influx peut venir de l'activation de canaux SOC (*Store-Operated Channel*) ou d'une libération de calcium provenant des stocks internes à travers les récepteurs IP3 (Arnaudeau et al., 2006). Cette étude suggère, de plus, que les myoblastes sont capables de sélectionner entre les trois mécanismes de façon alternative.

Enfin, nous avons montré que l'initiation de la différenciation qui suit l'augmentation de calcium intracellulaire était due à l'implication de voies de signalisation dépendantes du calcium telle la calcineurine et/ou la CaMK. La chélation du calcium intracellulaire par le BAPTA-AM empêche l'expression de MEF2 au cours de la différenciation (Arnaudeau et al., 2006) et l'abaissement du calcium extracellulaire à un niveau où l'activité de la CaMK est réduite diminue également l'expression de MEF2 (Konig et al., 2006). Ces résultats confirment que des changements de concentration du calcium intracellulaire sont cruciaux pour l'induction de la différenciation.

2. Activation du canal potassique Kir2.1

2.1 Caractéristiques du canal Kir2.1

Le premier courant potassique rectifiant entrant Kir (K^+ inward rectifier) a été mesuré dans le muscle squelettique de grenouille par Katz, il y a 40 ans. Il l'appelle originellement le courant "rectifiant anormal" par opposition aux courants rectifiants sortants qui sont classiquement observés dans le muscle squelettique (Katz and Eakins, 1969). Depuis, on a répertorié dans la famille des canaux Kir, 7 sous-familles, de Kir1 à Kir7, rassemblant quinze canaux. Leur rôle principal est de stabiliser le potentiel membranaire autour du potentiel d'équilibre potassique (E_K). Le canal Kir2.1 fait partie de la sous-famille des Kir2 qui comprend quatre membres (Kir2.1 à Kir2.4). Le canal fonctionnel est formé de quatre sous-unités identiques qui sont chacune composée de deux domaines transmembranaires, d'une boucle extracellulaire formant le pore du canal (P-loop), et d'extrémités N- et C- terminales intracellulaires. La structure tridimensionnelle de son domaine cytoplasmique a été récemment résolu (Pegan et al., 2005) et la structure cristallographique du canal Kir bactérien (KirBac1.1) a permis de modéliser le canal entier (figure 8).

Chez l'homme, le canal Kir2.1 se caractérise par une conductance d'environ 20pS et d'une des plus fortes rectifications parmi tous les canaux Kir. Cette rectification est due à la liaison d'ions magnésium (Vandenberg, 1987) ou de polyamines cationiques telles la spermine ou la spermidine (Lopatin et al., 1994) sur des sites intracellulaires qui bloquent la sortie des ions K^+ . Une sous-unité du canal Kir2.1 est composée de 427 acides aminés codés par le gène KCNJ2 qui se trouve sur le chromosome 17q23. Le canal Kir2.1 a d'abord été cloné chez la souris en 1993 (Kubo et al., 1993), puis chez l'homme dans le cœur et le cerveau (Raab-Graham et al., 1994; Tang et al., 1995).

Le canal Kir2.1 est exprimé dans de nombreux tissus mais il est surtout présent dans le cœur (Ishii et al., 1994), le cerveau (Tang et al., 1995; Ashen et al., 1995) et les muscles squelettiques (Matsuda and Stanfield, 1989). Dans le cœur, le canal Kir2.1 a un rôle important car il contribue à la majeure partie du courant rectifiant entrant cardiaque IK_1 , lequel permet la repolarisation des myocytes ventriculaires en début de diastole (Lopatin and Nichols, 2001). Dans le système nerveux, de nombreux canaux de la famille Kir, dont le canal Kir2.1,

contrôlent l'excitabilité neuronale de façon directe ou indirecte (Neusch et al., 2003). Par exemple, il a été suggéré que l'activité électrique des axones du nerf sciatique était dépendante de l'activité des canaux Kir2.1 des cellules de Schwann car ces derniers permettraient de maintenir le potentiel membranaire des neurones dans une zone excitable grâce à une recapture des ions K^+ après un potentiel d'action (Mi et al., 1996). Dans les muscles squelettiques, le canal Kir2.1 est surtout localisé dans les tubules transversaux et permet de maintenir l'excitabilité des fibres musculaires. Son rôle est de contrebalancer l'hyperpolarisation induite par les pompes Na^+/K^+ et de restaurer la balance potassique en récupérant le potassium libéré après chaque potentiel d'action (Sejersted and Sjogaard, 2000).

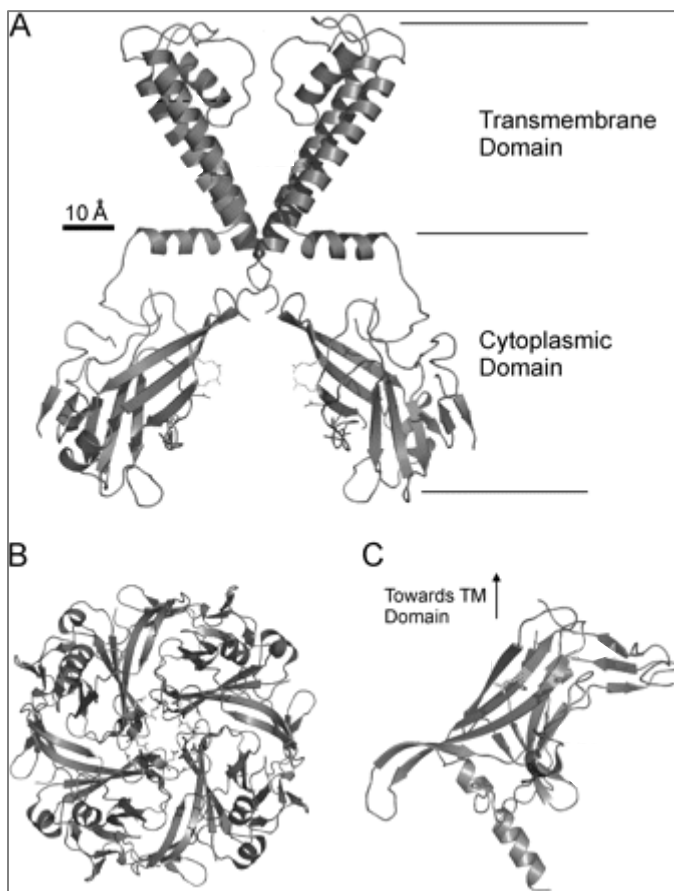


Figure 8 : Structure par cristallographie de Kir2.1 (légèrement simplifié d'après Kurata et al., 2007).

A. Domaine transmembranaire de KirBac1.1 avec le domaine cytoplasmique Kir2.1. Deux sous-unités sont représentées.

B et C. Structure cristallographique du domaine cytoplasmique de Kir2.1.

B, vue du dessus des 4 sous-unités.

C, vue de côté d'une seule sous-unité.

Enfin, nous avons montré dans notre laboratoire que l'hyperpolarisation via le canal Kir2.1 était primordiale à la différenciation des myoblastes humains. Un autre groupe a également observé chez le poulet l'implication des canaux Kir2.1 dans le déclenchement de la fusion de myoblastes (Shin et al., 1997).

2.2 Mécanismes de modulation de l'expression ou activité du canal Kir2.1

- **Au niveau transcriptionnel**

L'unité de transcription du gène KCNJ2 codant pour la protéine Kir2.1 est composée de 2 exons séparés par un intron de 5 à 6 kpb. Cette unité comprend, en amont, des séquences de contrôle de la spécificité cellulaire et, près du site d'initiation de la transcription, un promoteur minimal. Ce promoteur possède de nombreuses séquences reconnues par des facteurs de transcription : des E-box (liant les protéines bHLH et USF), des Y-box (liant le NF-Y) et des GC-box (liant Sp1/Sp3). Toutefois, alors que le promoteur de la souris ne possède pas de TATA-box ou de CCAAT-box, celui de la poule possède une TATA-box (Redell and Tempel, 1998; Mutai et al., 2004).

Les facteurs de transcription se liant à ces séquences étant ubiquitaires, plusieurs groupes proposent que ce soit via l'activation différentielle des séquences de contrôle de la spécificité cellulaire que les différents types de cellules réguleraient l'expression des canaux Kir2.1. La caractérisation du gène de la poule a mis en évidence plusieurs éléments de régulation cellulaire. Deux éléments en particulier, entre -1115 et -975bp et entre -417 et -286bp, activent l'expression du canal Kir2.1 uniquement dans la lignée cellulaire myogénique Qm7 alors qu'un élément entre -1115 et -727bp semble réprimer l'expression du canal dans une lignée de fibroblastes, la lignée DF1, n'exprimant pas le courant Kir2.1. La caractérisation du gène humain n'a malheureusement pas encore été réalisée mais les résultats chez la souris et la poule suggèrent que la transcription du canal Kir2.1 peut être encore différente chez l'homme.

- **Au niveau traductionnel**

Peu de choses sont connues sur la régulation traductionnelle du canal Kir2.1. Shin et collaborateurs ont cependant montré que la quantité d'ARN messager du canal Kir2.1 était contrôlée par l'état d'innervation du muscle adulte. En effet, la dénervation du muscle soleus chez la souris entraîne rapidement une diminution des ARNm Kir2.1 par un mécanisme dépendant du calcium et de la PKC (Shin et al., 1997). D'autre part, le criblage récent d'une banque d'ADN de rat a permis de cloner un facteur modulant l'expression de plusieurs canaux potassiques dont le canal Kir2.1. Ce facteur, appelé KCRF (K Channel Regulatory Factor), réduit l'expression des canaux Kir2.1 et Kv1.1 lorsqu'il est co-exprimé avec l'un ou

l'autre de ces canaux (Keren-Raifman et al., 2000). Malheureusement, le mécanisme de cette répression n'a pas encore été identifié.

- **Au niveau du transport à la membrane**

De nombreux groupes ont montré que la séquence protéique de Kir2.1 possédait des motifs contrôlant son transport. Deux groupes ont d'abord identifié le motif FCYENE sur la partie C-terminale du canal comme responsable du transport du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Il agirait comme signal de reconnaissance pour l'incorporation de la protéine dans des vésicules de transport dépendant de COP-II (Stockklausner et al., 2001; Ma et al., 2001). Puis, Stockklausner et collaborateurs ont décrit un autre motif dans la partie N-terminale contrôlant cette fois le transport depuis l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Stockklausner and Klocker, 2003). Enfin, Kir2.1 possède des motifs pouvant lier des protéines contenant des domaines PDZ, ces protéines étant connues pour moduler le transport des canaux à la membrane. Le transport et l'ancrage des canaux Kir2.1 à la surface des cellules dépendrait de l'interaction de Kir2.1 avec la PSD-95 (Leonoudakis et al., 2004), la filamin-A (Sampson et al., 2003) et la PSD-93delta (Leyland and Dart, 2004) via ces domaines PDZ. D'autre part, Grishin et collaborateurs ont identifié récemment le facteur GRIF comme facilitateur de transport du canal vers la membrane. Ils montrent que GRIF interagit avec le canal au niveau d'une séquence chevauchant le motif FCYENE et le relie aux protéines de transport telle la kinésine (Grishin et al., 2006). Finalement, le transport de Kir2.1 semble également être sous le contrôle de la voie de signalisation Ras-MAPK qui modulerait le courant Kir2.1 en affectant la localisation subcellulaire du canal (Giovannardi et al., 2002).

- **Au niveau du *gating* du canal**

Le canal Kir2.1 peut être modulé lorsqu'il est à la membrane au niveau de ses propriétés d'ouverture et de fermeture (*gating*).

De nombreux membres de la famille Kir sont activés par liaison avec le phosphatidyl-inositol 4,5-biphosphate (PIP₂). Une étude a montré que la lyse du PIP₂ entraînait une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux Kir2.1 (Soom et al., 2001). Toutefois, une autre étude plus récente montre que les canaux Kir2.1 sont peu sensibles aux variations de concentration du PIP₂ en raison de leur forte affinité pour ce phospholipide (Rohacs et al., 2003). Il n'est donc pas clair si l'activité de Kir2.1 est modulée par des variations endogènes de la concentration du PIP₂. Par contre, il est certain que la liaison du PIP₂ au canal est nécessaire à son activité

car la perte de cette liaison suite à une mutation du gène codant pour le canal entraîne une diminution importante du courant Kir2.1 et le développement d'une maladie, le syndrome d'Andersen-Tawil (Lopes et al., 2002).

D'autres mécanismes de régulation de l'activité de Kir2.1 ont été décrits, en particulier via l'action de kinases. Wischmeyer et Karschin ont démontré que l'activation de la PKA causait une inhibition complète du courant Kir2.1 via la phosphorylation spécifique de la sérine 425 (Wischmeyer and Karschin, 1996). Les travaux de Jones indiquent que les récepteurs muscariniques M1 inhibent les canaux Kir2.1 par un mécanisme dépendant du calcium, de la PKC et de la GTPase Rho (Jones, 1996; Jones, 2003; Rossignol and Jones, 2005). Enfin, Kir2.1 est également régulé par des tyrosine-kinases. Les courants Kir2.1 sont supprimés en présence de perorthovanadate, inhibiteur des tyrosine-phosphatases, et cette inhibition est éliminée par la génistéine, inhibiteur des tyrosine-kinases. Ces modulations du courant disparaissent lorsque la tyrosine 242 est mutée en phénylalanine indiquant que ce site est la cible directe des tyrosine-kinases et phosphatases (Wischmeyer et al., 1998). Malheureusement, les enzymes responsables de cette phosphorylation/déphosphorylation n'ont pas été identifiées. Toutefois, Wischmeyer observe que l'expression des récepteurs NGFR et EGFR (récepteurs à tyrosine-kinase) avec le canal Kir2.1 entraîne la suppression du courant. Enfin, d'autres sites de phosphorylation de tyrosines ont été identifiés sur le canal Kir2.1 mais leurs rôles dans la régulation du canal n'ont pas encore été définis.

But du travail de thèse

Le but de ma thèse a été d'identifier le mécanisme moléculaire responsable de l'augmentation du nombre de canaux Kir2.1 actifs au cours de la différenciation. Cette augmentation est-elle sous la dépendance des facteurs de transcription myogéniques ou d'un signal plus précoce? Est-elle due à une augmentation de la synthèse du canal ou de son transport à la membrane plasmique ? Ou alors à une modulation de son activité à la membrane ?

Pour répondre à ces questions, nous avons d'abord suivi la cinétique d'expression des canaux Kir2.1 et regardé si le canal était toujours actif en l'absence de myogénine ou de MEF2 (Konig et al., 2004). Puis, nous avons inhibé différentes étapes de modulations possibles de l'expression/activation des canaux Kir2.1 grâce à des drogues et mesuré par électrophysiologie si l'activité des canaux Kir2.1 en début de différenciation était affectée (Hinard et al., 2008).

MATERIELS ET METHODES

1. Culture primaire de myoblastes humains

Depuis une dizaine d'années, nous sommes capables d'étudier le processus de différenciation des myoblastes humains in vitro grâce à la mise au point d'une culture clonale de myoblastes dérivés de la purification de cellules satellites de muscle (Baroffio et al., 1996). Cette préparation a de nombreux avantages : (1) en milieu riche en facteurs de croissance, les myoblastes se divisent activement sans se différencier ; (2) dès qu'on les cultive dans un milieu pauvre ou dénué de facteurs de croissance, les myoblastes arrêtent de proliférer, se différencient et fusionnent entre eux pour former des myotubes. Ce système de culture cellulaire nous permet donc d'induire la différenciation des myoblastes de façon synchronisée par un simple changement de milieu.

La procédure de purification des cellules satellites consiste à isoler les cellules satellites des fibres musculaires par dissociation mécanique et enzymatique à partir d'une biopsie musculaire humaine. Les échantillons de muscle sont obtenus lors d'interventions de chirurgie orthopédique sur de jeunes enfants sains, en accord avec les recommandations du comité d'éthique de l'Hôpital Universitaire de Genève. La biopsie est hachée et digérée dans une solution contenant de la trypsine avant d'être centrifugée à plusieurs reprises pour culotter les débris tissulaires et les fibres musculaires résiduelles. La suspension cellulaire restante est composée de fibroblastes, de cellules satellites et de globules rouges. Après avoir éliminé ces derniers par une étape de lyse osmotique, les cellules satellites sont sélectionnées d'après leur petite taille, isolées par aspiration douce avec une micropipette et cultivées individuellement dans des puits de culture (culture clonale).

Ces cellules sont ensuite amplifiées dans un milieu dit de prolifération (*Growth Medium* ou GM) riche en sérum, générant une population de cellules appelées myoblastes. Une fois à confluence, les myoblastes peuvent être soit repiqués et maintenus en prolifération pendant plusieurs mois, soit induits à se différencier en les plaçant dans un milieu dit de différenciation (*Differentiation Medium* ou DM) dépourvu de sérum (figure 9).

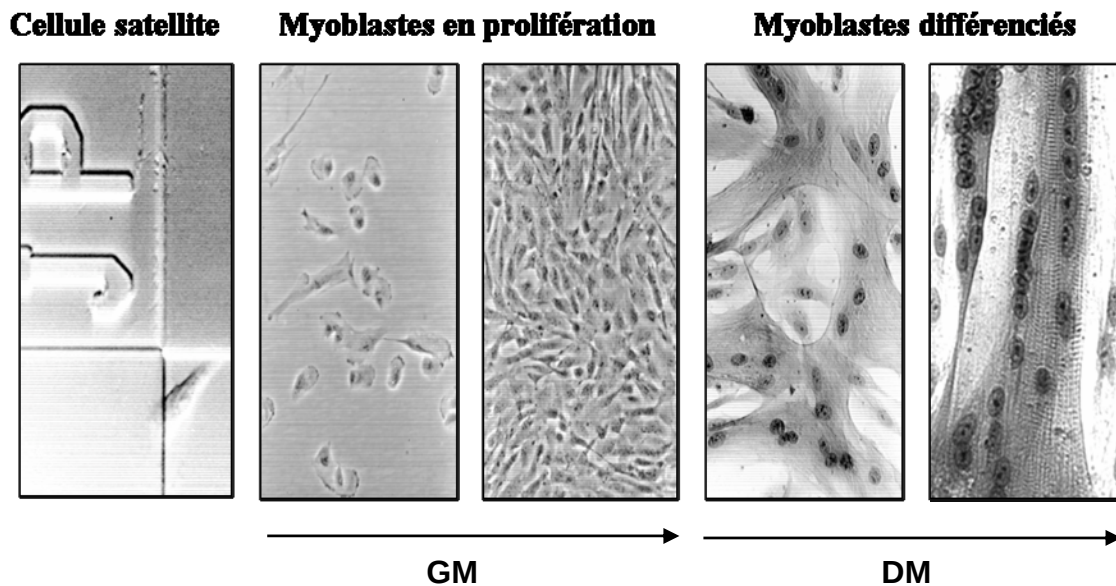


Figure 9 : Les 3 étapes de la culture clonale des myoblastes humains : isolement d'une cellule satellite, prolifération des myoblastes jusqu'à confluence et différenciation des myoblastes en myotubes puis en fibres striées.

2. Mesure électrophysiologique

En 1947, les premières mesures de courant électrique à travers la membrane de l'axone géant de calamar grâce à des microélectrodes permettent à Hodgkin et Huxley de développer le concept de conductances ioniques (Hodgkin and Huxley, 1952). Cependant, la technique utilisée à cette époque ne permettait que l'enregistrement de courant macroscopique. Depuis, l'enregistrement des courants ioniques a considérablement évolué grâce, entre autres, à la technique du patch clamp, développé par Neher et Sakmann (Neher and Sakmann, 1976). Cette technique consiste à isoler électriquement une fraction de membrane (patch de membrane) en plaçant à la surface d'une cellule une pipette en verre ($1\mu\text{m}$ de diamètre) et en appliquant à cette pipette une légère dépression afin de créer une forte résistance de contact entre la pipette et la membrane, *le giga-seal*.

La pipette de patch contient une solution ionique de composition fixée par l'expérience, ainsi qu'une électrode d'argent chloruré qui permet la conduction électrique. Cette électrode convertit les courants ioniques des solutions en flux d'électrons dans le métal. Le courant électrique est ensuite amplifié et filtré. Les données analogiques sont converties en données numériques par un convertisseur analogique-numérique avant d'être stocké et analysé (figure

10). Le tout est contrôlé par un ordinateur via lequel on peut également piloter les fonctions de l'amplificateur, pour programmer par exemple une stimulation. Dans ce cas, la commande numérique est convertie en données analogiques par un convertisseur numérique-analogique et cheminée jusqu'à l'électrode. La particularité du circuit électrique des amplificateurs utilisés de nos jours est qu'il permet la mesure de courants ioniques en imposant simultanément un potentiel à la membrane (*circuit de rétrocontrôle résistif*).

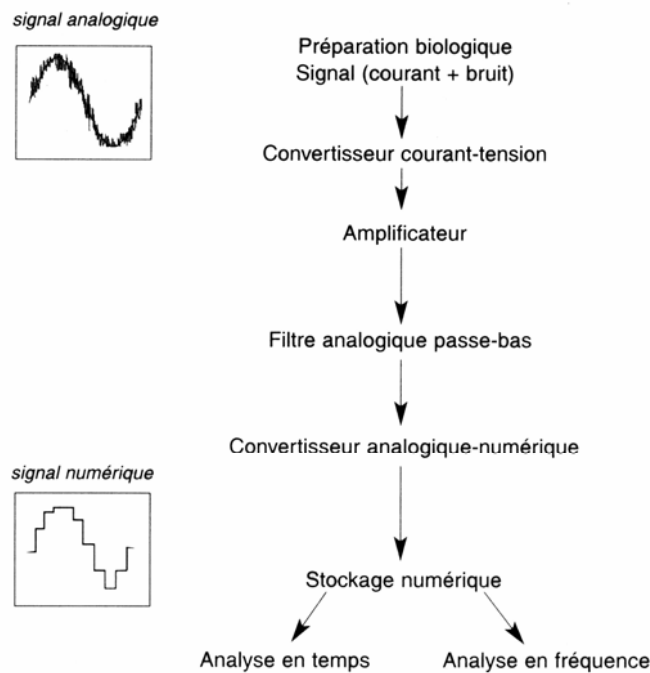


Figure 10 : Etapes d'enregistrement d'un courant (Tiré du livre de Michel Joffre, *Electrophysiologie Moléculaire Tome I*, 2001)

La configuration obtenue en collant la pipette à la surface de la cellule est appelée en "cellule attachée" (*cell-attached* ou *on-cell*) et permet d'imposer un potentiel à la membrane et de mesurer simultanément les variations de courant de l'ordre du pA dans cette fraction de membrane. On peut ainsi mesurer les courants unitaires qui passent à travers un seul canal ionique (*single channel recording*). Si la pression appliquée est augmentée, on entraîne la rupture de la membrane et on peut mesurer, à ce moment là, la somme des courants passant à travers une population de canaux ioniques présents à la surface de toute la cellule. Cette configuration est appelée "cellule entière" (*whole cell*) (figure 11). Deux autres configurations existent, je ne les développerai pas ici.

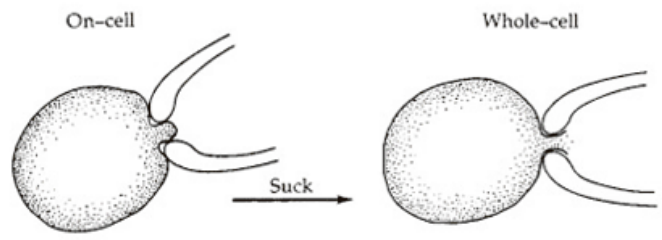


Figure 11 : Configurations en "cellule attachée" et en "cellule entière" (Hamill et al., 1981)

Pour mesurer l'activité des canaux Kir2.1 dans les myoblastes lors de leur différenciation, nous avons utilisé la configuration "cellule entière" et travaillé en voltage imposé selon le protocole détaillé à la figure 12. Les signaux ont été enregistrés grâce à un amplificateur Axopatch 200B (Axon Instruments, Inc.) et filtrés en passe-bas à 1kHz. Les pipettes de patch étaient composées de borosilicate et étirées de façon à obtenir un diamètre idéal d'une résistance variant entre 3 à 6 M Ω . Les myoblastes étaient repiqués entre 30 min à 1 heure avant les expériences pour les rendre plus sphériques ce qui facilitait la formation du *gigaseal*. Le p $\acute$ tri contenant les myoblastes était plac $\acute$ sur la station d'enregistrement entre 20-25°C et reli $\acute$ à un syst $\acute$ me de perfusion permettant de modifier le milieu extracellulaire. La configuration "cellule entière" permet $\acute$ galement de contr $\acute$ ler la solution intracellulaire de la cellule. Cette solution $\acute$ tait $\acute$ tablie afin de pouvoir mesurer les canaux potassiques sans $\acute$ tre g $\acute$ n $\acute$ par les autres types de canaux.

La solution extracellulaire $\acute$ tait compos $\acute$ e de 100mM de chlorure de N-methyl-D-glucamine (NMG), 5mM de KCl, 2mM de MgCl $_2$, 5mM d'HEPES, 50mM de NaOH, 50mM d'acide ac $\acute$ tique et 8mM de glucose. Le pH $\acute$ tait ajust $\acute$ $\acute$ 7.4 avec du NMG.

La solution intracellulaire (pipette) $\acute$ tait compos $\acute$ e de 110mM de KCl, 5mM de NaCl, 2mM de MgCl $_2$, 5mM d'HEPES, 20mM de BAPTA, 5mM de glucose et de 5mM MgATP (ajout $\acute$ peu avant l'exp $\acute$ rience). Le pH $\acute$ tait ajust $\acute$ $\acute$ 7.3 avec du KOH.

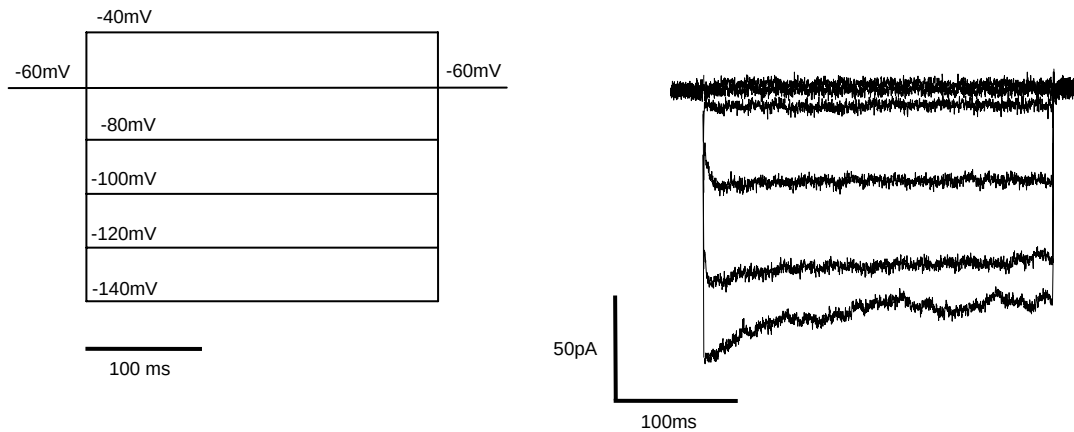


Figure 12 : Protocole de stimulation des canaux Kir2.1 et exemple de courant Kir2.1 mesuré en "cellule entière" (data personnel). L'asymétrie d'amplitude des courants induits par un changement de potentiel de + ou de - 20mV (par rapport à -60mV) et la forte augmentation du courant entre -80mV et -100mV est le reflet de la propriété de "rectification entrante" du canal Kir2.1.

3. Détection de la protéine Kir2.1 endogène

Les canaux Kir2.1 exprimés dans les myoblastes humains ne sont pas nombreux. À partir des courants enregistrés sur cellule entière, nous avons pu déduire que leur nombre était de l'ordre d'une à plusieurs centaines de canaux actifs à la surface d'un myoblaste. Cette quantité de canaux est trop faible pour être détectée par western-blot. Nous avons donc dû enrichir la fraction membranaire où se trouvent ces canaux avant de les purifier par immunoprécipitation avec un anticorps spécifique.

Enrichissement membranaire

Afin de nous donner toutes les chances de détecter les protéines Kir2.1, nous avons cultivé 300 millions de cellules par condition dans des plaques de culture de 20cm² (6 plaques de 50 millions chacune). Nous avons ensuite détaché les cellules de leur support grâce à un tampon de dissociation sans calcium (GIBCO®) et les avons récupérées par centrifugation à 200g pendant 5min. Les cellules ont ensuite été resuspendues et lysées dans un tampon hypotonique (20mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 1% NP-40 et 1mM Na₃VO₄, pH 7.5) pendant 15 min à 4°C. Les cellules gonflées ont été passées à maintes reprises dans une seringue de 25 gauges et les noyaux, seule structure restant entière, éliminés par centrifugation à 1000g pendant 5 min. Le surnageant représentant l'extrait cellulaire total a ensuite été

ultra-centrifugé pendant 1 heure à 100 000g à 4°C afin de "culoter" toutes les membranes cellulaires (plasmique, réticulaire et du golgi). Cette fraction membranaire a alors été utilisée pour l'immunoprécipitation des canaux Kir2.1 endogènes.

Immunoprécipitation

Nous avons isolés les canaux Kir2.1 par immunoprécipitation. Cette technique consiste à cibler la protéine d'intérêt grâce à un anticorps spécifique puis à lier le complexe antigène-anticorps sur des billes de sépharose (ou d'agarose) au moyen de protéines A ou G. Les protéines A et G ont la particularité de lier la fraction Fc des immunoglobulines avec des affinités variables pour les différentes classes d'immunoglobulines. Enfin, par centrifugation, le complexe protéine-anticorps-protéineA/G-sépharose est précipité et isolé du reste des protéines cellulaires (figure 13). La protéine d'intérêt est alors détachée du complexe par une solution de dissociation, type SDS- β mercapto-éthanol.

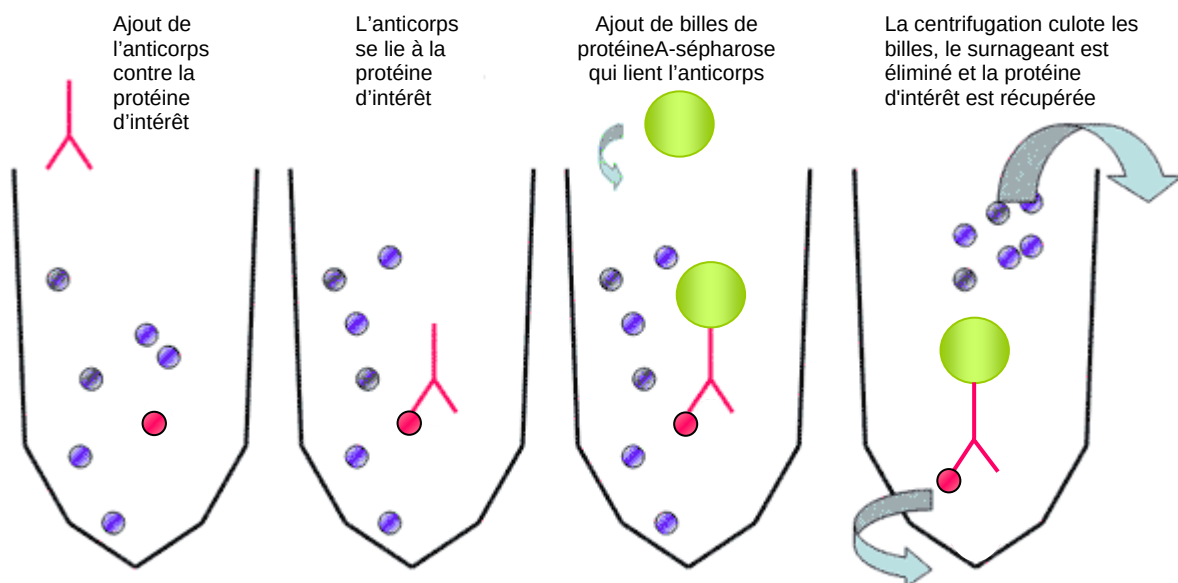


Figure 13 : Immunoprécipitation d'une protéine d'intérêt par un anticorps et billes de protéineA-sépharose (tiré de Molecular Station).

Remarque : la dernière fraction récupérée, enrichie en canaux Kir2.1, contient également les anticorps de lapin anti-Kir2.1, les protéines A et les billes de sépharose. Les protéines A et la sépharose ne posaient pas de problèmes majeurs. Par contre, les anticorps de lapin nous empêchaient de visualiser les protéines Kir2.1 endogènes sur western-blot car les sous-unités

Kir2.1 et la chaîne lourde de l'anticorps de lapin, obtenus après action de la solution de dissociation, sont de même taille et donc révélées au même endroit sur l'immunoblot par l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin. Afin de contourner ce problème, nous avons dû produire un autre anticorps spécifique contre les canaux Kir2.1 dans une autre espèce (chez la poule).

4. Surexpression de canaux Kir2.1-GFP sauvages et mutants

La préparation de lysat enrichi en canaux Kir2.1 endogènes étant longue et coûteuse, nous avons effectué de nombreuses analyses biochimiques à partir de myoblastes surexprimants des canaux Kir2.1 liés à la GFP. Pour cela, nous avons transfecté le plasmide pcEGFP-Kir2.1 (procuré par le Dr E. Marban) dans les myoblastes en prolifération grâce à la technique de l'électroporation. Cette technique a été mise au point pour les myoblastes humains dans notre laboratoire (Espinosa et al., 2001). Une fois électroporés, les myoblastes étaient maintenus 24 heures en GM avant d'être utilisés pour des analyses biochimiques ou électrophysiologiques.

Nous avons également créé des plasmides pcEGFP-Kir2.1 mutés sur différentes tyrosines (Tyr 242, 336 et 366) pour analyser le rôle de ces tyrosines sur l'activité du canal. Ces mutations ont pu être réalisées grâce au Kit QuickChange® de Stratagene. Ce kit permet, entre autres, la modification dirigée d'un acide-aminé par un autre (*point mutation*) selon la procédure suivante : le plasmide double-brin contenant la séquence de la protéine à muter est incubé avec 2 amorces oligonucléotidiques de synthèse contenant la mutation désirée. Chaque amorce, chacune complémentaire d'un des brins du plasmide, est allongée grâce à la polymérase à ADN, *PfuTurbo*, durant plusieurs cycles successifs de variation de température. Des brins circulaires d'oligonucléotides avec la mutation sont donc créés. Les brins parentaux méthylés ne contenant pas la mutation sont digérés grâce à l'endonucléase Dpn I qui lyse spécifiquement les brins méthylés. Enfin, une dernière étape de transformation de bactéries avec les nouveaux brins mutés permet de produire des plasmides mutés transfectables dans les cellules humaines (figure 14).

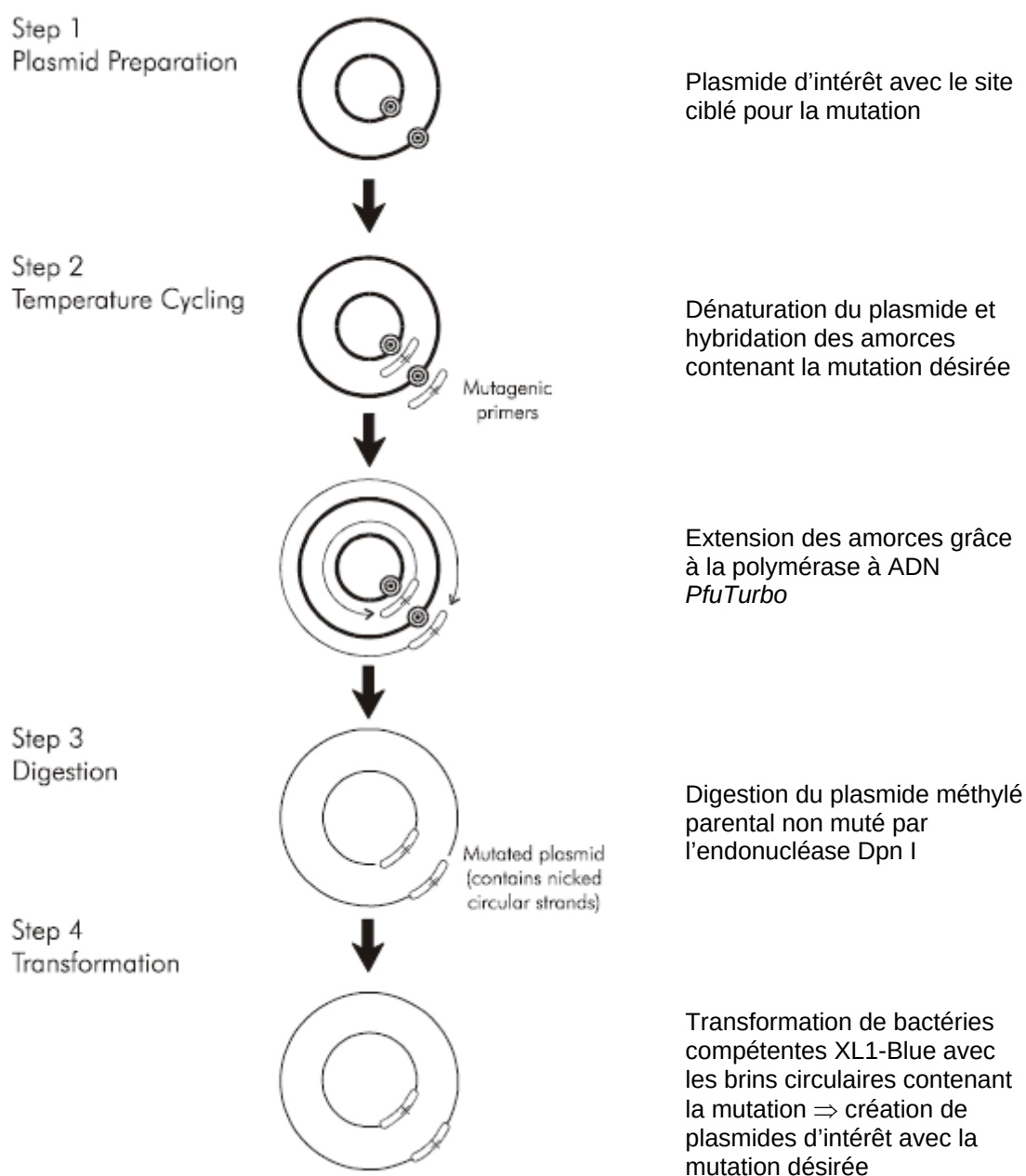


Figure 14 : Méthode de mutation dirigée par le kit Quickchange® de Stratagene (tiré du site www.stratagene.com)

ARTICLE I

A. Introduction à l'article I

Le muscle squelettique adulte est un tissu capable de se régénérer grâce à la présence de cellules satellites. Ces cellules satellites, activées lors de lésions, prolifèrent sous forme de myoblastes, se différencient et finalement fusionnent pour reformer des fibres musculaires fonctionnelles. Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, le processus de différenciation comprend une succession d'étapes qui doivent se dérouler dans un ordre bien défini. Les myoblastes doivent, par exemple, d'abord arrêter de se diviser avant de pouvoir s'aligner et fusionner entre eux. Le contrôle du processus de différenciation se fait, entre autres, grâce à l'expression de facteurs de transcription, les MRFs et les MEF2s, régulant l'expression des gènes myogéniques selon une séquence temporelle très précise.

Mis à part les facteurs de transcription myogéniques, nous avons observé que certains événements clés permettaient également de contrôler le déroulement de la différenciation. En effet, notre travail montre (1) que les myoblastes humains doivent s'hyperpolariser via l'activation des canaux potassiques pour pouvoir fusionner, et (2) que cette hyperpolarisation permet un influx calcique essentiel à la différenciation des myoblastes humains (Liu et al., 1998). Si les canaux potassiques ou calciques sont bloqués avec des oligonucléotides antisens ou pharmacologiquement, la différenciation et la fusion des myoblastes sont inhibées (Fischer-Lougheed et al., 2001; Bijlenga et al., 2000).

Sachant que les facteurs de transcription myogéniques, telle la myogénine et MEF2, sont activés par des voies dépendantes du calcium, nous nous sommes demandé s'il existait une relation de cause à effet entre l'activation des canaux Kir2.1 générant l'hyperpolarisation et l'activation de ces facteurs de transcription. Est-ce que ces facteurs de transcription sont nécessaires à l'activation des canaux Kir2.1 ou est-ce l'activation des canaux Kir2.1 qui entraîne l'expression et l'activité de la myogénine et de MEF2 ?

Nos résultats montrent que l'activation des canaux Kir2.1 initie la différenciation en induisant la myogénine et MEF2 via une voie dépendante du calcium (Konig et al., 2004). Toutefois, je ne discuterai ici que des résultats auxquels j'ai directement contribué (page 55, section "Résultats et Discussion", après la reproduction de l'article).

B. Article König et al. publié en 2004 dans le *Journal of Biological Chemistry*

**Membrane hyperpolarisation triggers
myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression
during human myoblast differentiation**

by

König Stéphane, Hinard Valérie, Arnaudeau Serge, Holzer Nicolas,
Potter Gaël, Bader Charles R. and Bernheim Laurent

Corp.) was used alone at 1:50. Anti-myogenin (1:10; clone F5D from Dr. W. E. Wright) and anti-MEF2 (1:100; sc-313, Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used together. The secondary antibodies used were FITC-labeled anti-mouse IgG (1:100; Dako Corp.) and TRITC-labeled anti-rabbit Ig (1:100; Sigma) together with DAPI (100 ng/ml; Sigma).

Western Blotting—Total proteins were separated on an SDS-polyacrylamide gel and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were incubated in Tween/Tris-buffered saline (0.1% Tween 20, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 137 mM NaCl) and nonfat milk. Blots were incubated with the primary antibodies diluted in Tween/Tris-buffered saline and nonfat milk as follows: mouse monoclonal antibody against myogenin, 1:10; rabbit polyclonal antibody against MEF2, 1:300; mouse monoclonal antibody against desmin, 1:100; and mouse monoclonal antibody against α -tubulin (clone DM1A, Sigma), 1:5000. Blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies diluted 1:3000. Antibodies were revealed using ECL reagents and Hyperfilm MP (Amersham Biosciences).

Transfection and Reporter Assay—Transfections were performed by electroporation of 2×10^6 cells with 2 pmol of firefly luciferase plasmid (3MEF2-luc, 4RE-luc, or MCK-luc from Dr. P. L. Puri) together with 1 pmol of the control *Renilla* plasmid (phRL-TK-luc, Promega) as described previously (13). Cells were maintained under proliferation conditions for 3 days and then split into 24-well plates. When cells reached confluency, GM was replaced with DM for 4 days. (After electroporation, myotube formation is delayed with respect to untreated myoblasts and occurs only after ~3 days in DM (2).) For antisense inhibition of Kir2.1, cells were cotransfected with the 3MEF2-luc plasmid (2 pmol), the phRL-TK-luc plasmid (1 pmol), and either the AS-Kir2.1 plasmid or the empty plasmid pEF-IE (3 pmol). Cells were then processed with the Dual-Luciferase reporter assay kit (Promega). We set to 100% the ratio between the firefly and *Renilla* luciferase activities obtained with cells maintained in DM in each set of experiments.

Confocal Monitoring of Membrane Potential—Confocal image acquisition of the fluorescent membrane potential dye bis(1,3-dibenzyl-4-methyl-5-norbornyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylic acid)-trimethine oxonol (DiBAC₄(3); 1 μ M; Molecular Probes, Inc.) was performed using a Nipkow spinning disc confocal microscope. The incident laser (Coherent, Inc.) beam (488 nm) was coupled with a Yokogawa spinning disc confocal scan head (Visitech International QLC100) mounted on an inverted microscope (Zeiss Axiovert 200M). Fluorescence images (520-nm long-pass filter) were captured with a cooled 12-bit TE/CCD interlined Coolsnap HQ Photometrics camera (Roper Scientific). Images were acquired with Metafluor Version 5.0r6 software (Universal Imaging Corp.). Cells were plated on glass coverslips and continuously superfused with DM. Calibration was made by adding gramicidin to isotonic DM containing 5.36 mM K⁺ and varying ratios of Na⁺ and *N*-methyl-D-glucamine to maintain [Na⁺] + [*N*-methyl-D-glucamine] = 136.3 mM. The membrane potential (E_m) was then calculated as shown in Equation 1,

$$E_m = (RT/zF) \ln([Na^+]_o + [K^+]_o)/([Na^+]_i + [K^+]_i) \quad (\text{Eq. 1})$$

with [Na⁺]_i and [K⁺]_i assumed to be 150 mM and $T = 298$ K.

Electrophysiological Recordings—Kir2.1 currents ($I_{\text{Kir2.1}}$) were measured in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Signals were recorded at 20–25 °C, low pass-filtered at 1 kHz with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Inc.), and sampled at 2.5 kHz. The pipette resistances were 4–7 megaohms, and the compensation was 30–70%. The cell capacitance was obtained from direct reading of the whole-cell capacitance potentiometer of the Axopatch 200B amplifier. To improve the patching procedure, myoblasts were replated 30–60 min before recordings. An $I_{\text{Kir2.1}}$ of 0 pA/pF was assigned to myoblasts with a whole-cell $I_{\text{Kir2.1}}$ of <5 pA (4).

The extracellular solution contained 100 mM *N*-methyl-D-glucamine chloride, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM Hepes, 50 mM NaOH, 50 mM acetic acid, and 8 mM glucose. The pH was adjusted to 7.4 with *N*-methyl-D-glucamine. The intracellular (pipette) solution contained 110 mM KCl, 5 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM Hepes, 20 mM BAPTA, 5 mM glucose, and 5 mM MgATP. The pH was adjusted to 7.2 with KOH.

RESULTS

Kinetics of Expression of Myogenic Regulatory Factors in Human Primary Myoblasts—Among the muscle-specific transcription factors that may act in the induction of myoblast fusion, it is generally accepted that myogenin and MEF2 are leading participants (5). Immunocytochemistry was performed

on cultured myogenic cells at different times after addition of serum-free DM to observe the kinetics of expression of these transcription factors at the cellular level. A very low level of MEF2 expression was seen in nuclei of proliferating myoblasts (Fig. 1A, GM panels), whereas myogenin was not detected at this stage. After 6 h in DM, expression of myogenin and MEF2 was noticeable in only a few nuclei. Induction of myogenin was apparent in 14% of the nuclei after 12 h in DM and in 42% of the nuclei after 24 h (Fig. 1B). The maximum percentage of myogenin-positive nuclei (57%) was reached after 30 h in DM and remained at this level at 48 h. Significant MEF2 expression, with respect to that noticed in the proliferating stage, was first observed after 24 h in DM (15% of the nuclei) and, as for myogenin, reached a plateau after 30 h in DM (51% of the nuclei). An increase in expression of myogenin and MEF2 was not expected to occur in all myoblasts since only 60–80% of them will eventually fuse (14). It is important to note that human myoblasts began to fuse into myotubes after 24 h in DM (Fig. 1A, arrowheads). The results from examination of protein expression by immunoblotting correlated well with the culture immunostaining results (Fig. 1C). Myogenin protein was detected after 12 h in DM, whereas MEF2 was already present at a low level in myoblasts maintained under proliferation conditions. Basal expression of MEF2 was expected under proliferation conditions, as the antibody we used recognizes several MEF2 isoforms (MEF2A, MEF2C, and MEF2D), and previous studies have shown that some MEF2 isoforms are already present in proliferating myoblasts (15, 16). The increase in MEF2 expression appeared after 24 h under differentiation conditions. Expression of the muscle-specific protein troponin T, which depends upon myogenic bHLH and MEF2 factors, indicates that late steps of differentiation were achieved after 2 days in DM. These results confirm that, in primary human myoblast cultures, myogenin expression is the earliest marker of induction of the myogenic differentiation program and that the developmental increase in MEF2 expression is induced later, yet still before the initiation of cell fusion.

Kir2.1 Channel Activity Precedes Expression of Myogenic Regulatory Factors—We previously demonstrated that, in myoblasts triggered to differentiate, Kir2.1 channel activity induces membrane hyperpolarization to -70 mV, which, in turn, causes intracellular Ca²⁺ to rise (2, 3). As Ca²⁺ plays a key role in the activation of the muscle differentiation program (5), we compared the timing of expression of functional Kir2.1 channels with that of the myogenic regulatory factors implicated in the initiation of muscle differentiation.

Previous results have indicated that a low level of mRNA encoding Kir2.1 is present in undifferentiated myoblasts and that increasing levels can be detected throughout differentiation (2). Kir2.1 channel protein was not detectable by Western blotting (presumably due to Kir2.1 low level expression) (data not shown); therefore, we used whole-cell current recordings to evaluate Kir2.1 channel expression and activity in proliferating and differentiating myoblasts (Fig. 2). A very low level of Kir2.1 current density ($I_{\text{Kir2.1}}$) was detected in proliferating myoblasts ($I_{\text{Kir2.1}} = -0.16 \pm 0.09$ pA/pF, $n = 35$) and in myoblasts after 2 h in fusion-inducing medium ($I_{\text{Kir2.1}} = -0.20 \pm 0.10$ pA/pF, $n = 27$), and these levels were not statistically different ($p = 0.73$). In proliferating cells as well as in myoblasts in DM for 2 h, only few cells expressing $I_{\text{Kir2.1}}$ were detected (11% in GM). Interestingly, in these few positive cells, the density of $I_{\text{Kir2.1}}$ was similar to that measured in the positive cells after 6 h in DM. After 6 h in DM, the mean $I_{\text{Kir2.1}}$ increased drastically ($I_{\text{Kir2.1}} = -0.79 \pm 0.19$ pA/pF, $n = 44$; with 41% of the myoblasts expressing measurable $I_{\text{Kir2.1}}$), reaching a level statistically identical to that measured in cells

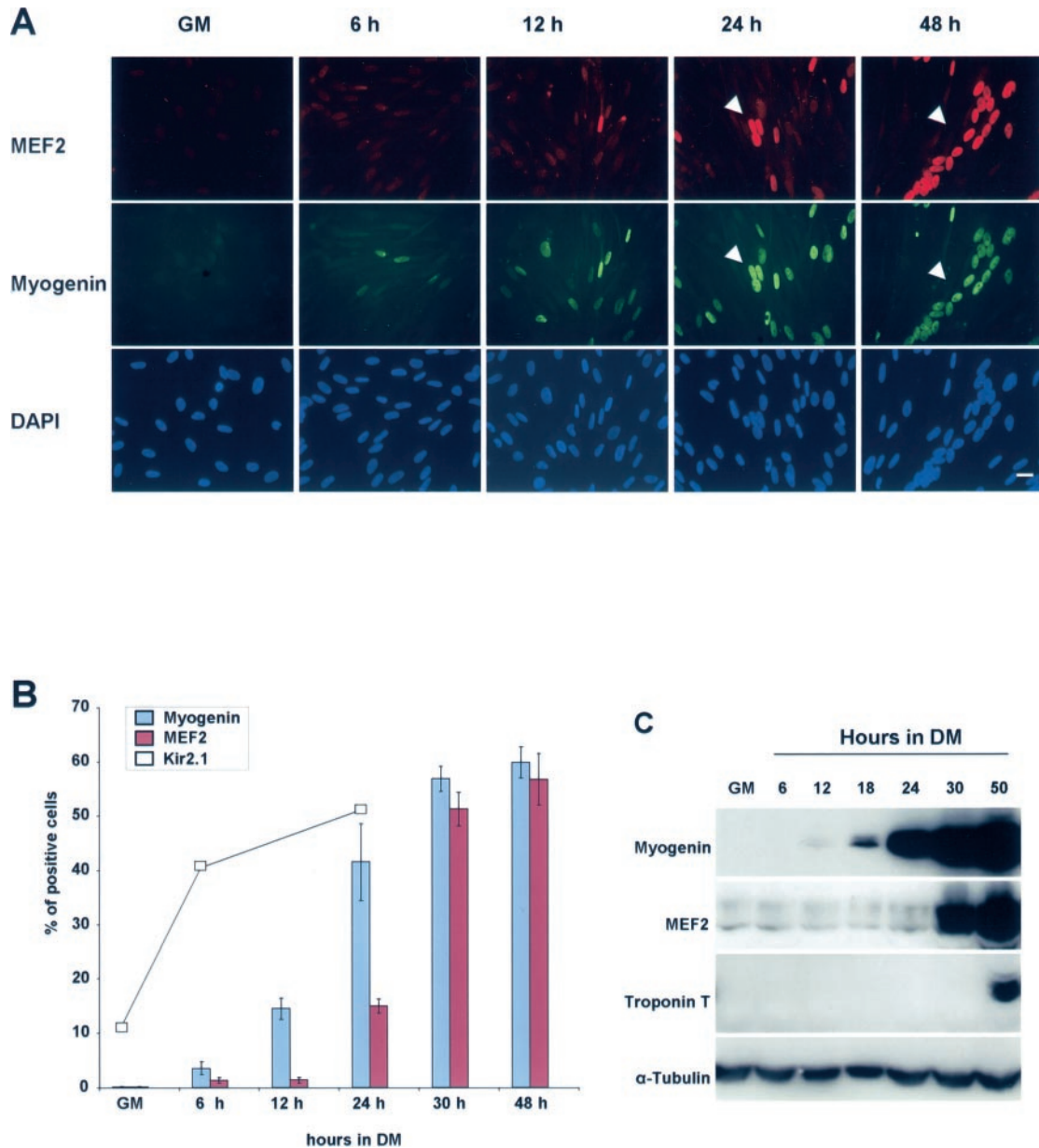


FIG. 1. Myogenin and MEF2 expression in differentiating human primary myoblasts. Subconfluent myoblasts were maintained in GM or induced to differentiate for the indicated times. *A*, nuclear expression of muscle differentiation markers. Myogenin was revealed with FITC, MEF2 with TRITC, and nuclei with DAPI. Similar results were obtained in two independent experiments. *Scale bar* = 20 μ m. *Arrowheads* point to grouped nuclei in myotubes. *B*, quantification of kinetics of expression of myogenin and MEF2. Five randomly selected fields ($\times 20$ objective) of two independent experiments were analyzed. *Error bars* correspond to S.E. The percentage of myoblasts expressing measurable $I_{Kir2.1}$ (whole-cell current > 5 pA) is shown ($\square$). *C*, expression of muscle differentiation markers. Total proteins (5 μ g) were analyzed for expression of myogenin, MEF2, and troponin T. Troponin T was used as a marker of late differentiation. An antibody against α -tubulin was used to assess that equal amounts of proteins were loaded in each lane.

maintained for 15 h in DM ($I_{Kir2.1} = -0.82 \pm 0.21$ pA/pF, $n = 22$, $p = 0.91$; with 45% of the myoblasts expressing measurable $I_{Kir2.1}$) or for 24 h in DM ($I_{Kir2.1} = -0.81 \pm 0.15$ pA/pF, $n = 55$, $p = 0.92$; with 51% of the myoblasts expressing measurable $I_{Kir2.1}$). For direct comparison of the kinetics of expression of Kir2.1 channels with those of myogenin and MEF2 factors, the percentage of myoblasts expressing measurable $I_{Kir2.1}$ is represented in Fig. 1*B*.

These results demonstrate that the main pool of Kir2.1 channels is already present and active at the plasma membrane 6 h after the induction of differentiation and suggest that Kir2.1 channel activity precedes myogenin and MEF2 expression. Kir2.1 channel activity in human myoblasts therefore appears to be one of the earliest steps in the establishment of the muscle differentiation program.

Membrane Depolarization through Pharmacological Blockade of Kir2.1 Reduces Myogenin and MEF2 Expression—In previous work, we have shown that Cs^+ and mibefradil inhibit Kir2.1 channels in human primary myoblasts (1, 17). To further investigate the role of the Kir2.1-associated hyperpolarization in the initiation of myoblast fusion, we examined the consequences of graded pharmacological blockade of Kir2.1 activity on the differentiation process. In this study, we used 20 mM Cs^+ to totally inhibit Kir2.1 channels and 10 mM Cs^+ or 5 μ M mibefradil to partially suppress Kir2.1 activity. Higher mibefradil concentrations could not be used because of toxic effects on human myoblasts.

We first established a protocol using confocal imaging with the potentiometric fluorescent probe DiBAC₄(3) (18) to confirm that the blockade of Kir2.1 channels results in membrane de-

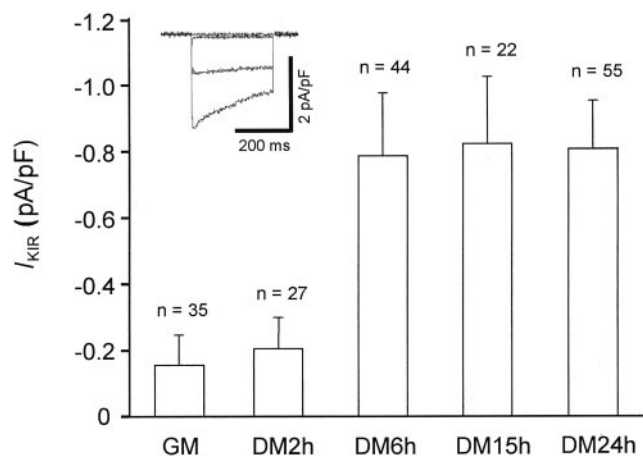


FIG. 2. Expression of $I_{Kir2.1}$ during human myoblast differentiation. Myoblasts induced to differentiate for different times (0, 2, 6, 15, and 24 h) were assayed for $I_{Kir2.1}$ during a step to -120 mV from a holding potential at -60 mV. Leak current was estimated either by linear extrapolation from the currents at -40 and -60 mV or by addition of $500 \mu\text{M}$ Ba^{2+} to the external solution and subtracted. Cell capacitances were as follows: GM, 26 ± 4 pF; DM for 2 h, 29 ± 3 pF; DM for 6 h, 28 ± 2 pF; DM for 15 h, 28 ± 3 pF; and DM for 24 h, 32 ± 3 pF. An example of $I_{Kir2.1}$ is shown in the inset. Currents were recorded in myoblasts cultured for 15 h in DM during steps to -60 , -80 , -100 , and -120 mV.

polarization of the differentiating myoblast population. This noninvasive method allowed us to monitor the membrane potential of cells in their culture environment without changing the internal concentration of ions, which occurs necessarily during whole-cell recording. To increase the accuracy of DiBAC₄(3) measurements, we monitored fluorescence changes with a spinning disc confocal microscope. This system is much less aggressive for living cells than a laser scanning confocal microscope, as exposure to the beam is much shorter. Also, it allowed us to make confocal acquisition of DiBAC₄(3) fluorescence, which is more accurate than whole-cell fluorescence measurement for a single emission dye, as it permits normalization of the fluorescence to a defined cell thickness of that optical slice. Measurements in different optical slices in a given cell indicated isopotentiality (data not shown).

Fig. 3A shows confocal images of the equatorial plane of the same myoblast population under different conditions affecting the membrane potential. Fluorescence was measured in control DM (Fig. 3A, basal panel) and during the calibration procedure with different $[\text{Na}^+]_o$ -containing solutions in the presence of $20 \mu\text{g/ml}$ gramicidin (Fig. 3A, 0 Na^+ , 25 Na^+ , and 136.3 Na^+ panels). These images show that the focus plane and cell morphology were stable throughout the calibration procedure. In addition, it can be seen that the intracellular distribution of the probe was not altered in the different $[\text{Na}^+]_o$ -containing solutions.

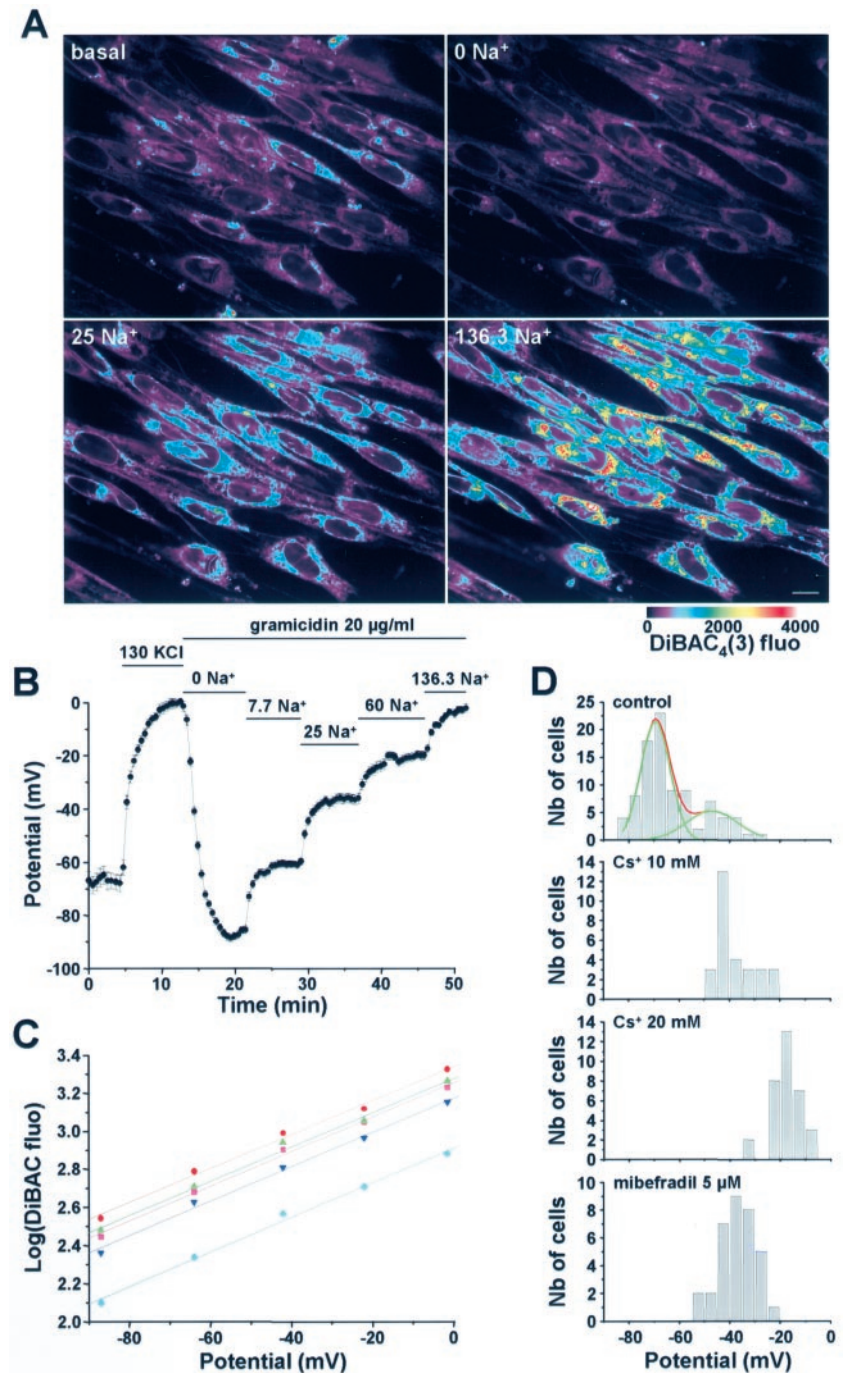
Calibration of DiBAC₄(3) fluorescence *versus* membrane potential was performed at the end of each experiment with different $[\text{Na}^+]_o$ -containing solutions in the presence of gramicidin (Fig. 3B). A calibration curve was calculated for each cell by linear regression of the logarithms of fluorescence measurements *versus* membrane potential calculated from Equation 1 (see "Experimental Procedures") for each level of $[\text{Na}^+]_o$ (Fig. 3C). The fact that each cell had its own calibration curve increased the accuracy of the measurements: in the experiment shown in Fig. 3B, the mean potential value obtained for the myoblasts cultured for 20 h in DM was -67 ± 3 mV ($n = 17$). In each case, a solution containing 130 mM KCl was applied before the calibration with gramicidin to depolarize the myoblasts and to bring the membrane potential in the vicinity of

mV. This was used as an internal control for the calibration procedure quality: two procedures (130 mM KCl or gramicidin + 136.3 mM Na^+) that should theoretically shift the membrane potential to 0 mV actually do so.

Confocal imaging of DiBAC₄(3) fluorescence was then applied to measure the difference in membrane potential between myoblasts cultured for 20–24 h in control DM and in DM containing different Kir2.1 inhibitors (Fig. 3D). In control DM, the majority of myoblasts (70%) showed a gaussian distribution centered at -70 mV, whereas 30% of the myoblasts were more depolarized, with a gaussian fit centered at -47 mV. Note that the percentage of hyperpolarized cells matches that of the fusion index (60–80%) (14). In the presence of Kir2.1 inhibitors, as expected, the distribution of membrane potentials was shifted to more depolarized levels with respect to control myoblasts. In the perspective of experiments discussed below, it is important to mention that 10 mM Cs^+ and $5 \mu\text{M}$ mibefradil depolarized the cells to similar levels (-37 ± 1 mV, $n = 29$; and -36 ± 1 mV, $n = 34$, respectively), whereas 20 mM Cs^+ produced a stronger effect on membrane depolarization (-17 ± 1 mV, $n = 34$).

Myogenin and MEF2 expression was then evaluated in the presence of Kir2.1 channel inhibitors (Fig. 4A), *i.e.* in depolarized myoblasts. Under control conditions after 24 h in DM, obvious myoblast fusions and a strong induction of myogenin and MEF2 were observed. In the presence of Kir2.1 inhibitors, fusion was markedly impeded, and myogenin and MEF2 expression dropped accordingly. Fig. 4B shows that the percentage of MEF2-positive nuclei was reduced by 10 mM Cs^+ and $5 \mu\text{M}$ mibefradil and that 20 mM Cs^+ had a robust inhibiting effect. The number of positive nuclei dropped by 82% in presence of 20 mM Cs^+ . On the other hand, the proportion of myogenin-positive nuclei seemed to be less affected by Kir2.1 inhibitors. Although myogenin expression was still significantly ($p < 0.005$) reduced by 20 mM Cs^+ ($\sim 35\%$ fewer positive nuclei), 10 mM Cs^+ or $5 \mu\text{M}$ mibefradil had no significant effect on myogenin expression ($p = 0.18$ and 0.06 , respectively). The effect of 20 mM Cs^+ was confirmed by immunoblotting. As shown in Fig. 4C, differentiation was characterized by induction of expression of both myogenin and MEF2. Basal expression of MEF2 factors in proliferating myoblasts was confirmed by Western blotting, and a strong induction of MEF2 expression was observed after 48 h in DM. At this time, expression of a late marker of muscle differentiation (troponin T) confirmed the differentiation of myoblasts into myotubes. In the presence of 20 mM Cs^+ , the induction of myogenin expression was reduced compared with that under control conditions. Furthermore, in the presence of 20 mM Cs^+ , the MEF2 level of expression was maintained at its basal level observed in proliferating myoblasts, and expression of troponin T was not induced. To confirm the importance played by the hyperpolarization in the differentiation process, we maintained the membrane resting potential in the vicinity of 0 mV by raising the extracellular $[\text{K}^+]$ to 130 mM and evaluated myogenin, MEF2, and troponin T expression during the induction of differentiation. As shown in Fig. 4C, treatment with high external $[\text{K}^+]$ totally inhibited the induction of myogenin, MEF2, and troponin T. It is worth mentioning that the effect of both 20 mM Cs^+ and high external $[\text{K}^+]$ was maintained over time in culture (with $>95\%$ of the myoblasts still mononucleated under these conditions after 4 days in DM). Fig. 4C also shows that, as already demonstrated in muscle cell lines (19), inhibition of muscle differentiation could be obtained with the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 (Cell Signaling Technology). This compound was used in later experiments to evaluate myogenin and MEF2 requirements in the regulation of Kir2.1 channel expression

FIG. 3. Depolarization induced by Kir2.1 inhibitors. Human myoblasts were induced to differentiate for 20–24 h in control DM or in the presence of Kir2.1 inhibitors, and their individual membrane potentials were monitored by confocal microscopy ($\times 63$ objective). **A**, confocal visualization of membrane potential changes using the fluorescent probe DiBAC₄(3). The images are representative of the different measurements presented in **B**. The basal image was obtained 30 min after loading with 1 μ M DiBAC₄(3). Scale bar = 10 μ m. **B**, mean resting potential of differentiated myoblasts after 20 h in DM ($n = 10$), followed by depolarization to 0 mV obtained with 130 mM KCl and calibration in the presence of 20 μ g/ml gramicidin. **C**, logarithm of the fluorescence (*flu*) intensity (measured in five cells) plotted against the membrane potential calculated with Equation 1 (see “Experimental Procedures”). Each line represents the best linear regression fit to the data of a single cell. **D**, distribution of myoblasts with respect to their membrane potential in control DM and in the presence of Kir2.1 inhibitors. These data were obtained from at least three independent experiments on different clones. In the *upper graph*, the *continuous line* is a fit to a double gaussian equation. *Nb*, number.



(see Fig. 6). These results show that membrane depolarization resulting from Kir2.1 blockade interferes with expression of myogenin and strongly inhibits later steps controlling the muscle-specific induction of MEF2 and troponin T expression.

Kir2.1 Blockade Strongly Inhibits Activation of the Myogenic Differentiation Program—To confirm that Kir2.1 channel activity and the associated hyperpolarization play a primary role in induction of the myogenic program, we tested Kir2.1 inhibitors on the activity of the muscle creatine kinase (MCK) promoter. Due to its regulation by a synergistic activity of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors, the MCK promoter is known to be highly up-regulated during the late stages of muscle differentiation (20). Activation of the MCK promoter was revealed by a luciferase activity assay. Fig. 5A shows that, in human myoblasts undergoing differentiation, the activity of the MCK promoter increased 23-fold. This in-

creased activity of the MCK promoter dropped markedly when myoblasts were induced to differentiate in the presence of Kir2.1 inhibitors. In the presence of 10 mM Cs⁺ or 5 μ M mibefradil, MCK activity was reduced to 32 and 40% of the control level, respectively. In the presence of 20 mM Cs⁺, MCK promoter activity was reduced to 10% of its control level and thus was nearly completely inhibited when Kir2.1 activity was blocked. To test whether this inhibition was a consequence of reduced myogenic bHLH and MEF2 activities, we measured the effect of Kir2.1 blockade on myogenic bHLH and MEF2 activities.

The results presented in Fig. 5 (B and C) reveal a very low activity of both bHLH and MEF2 families in undifferentiated myoblasts and a strong activation of these transcription factor activities upon myotube formation (16- and 43-fold, respectively). Exposure to either Cs⁺ or mibefradil under differenti-

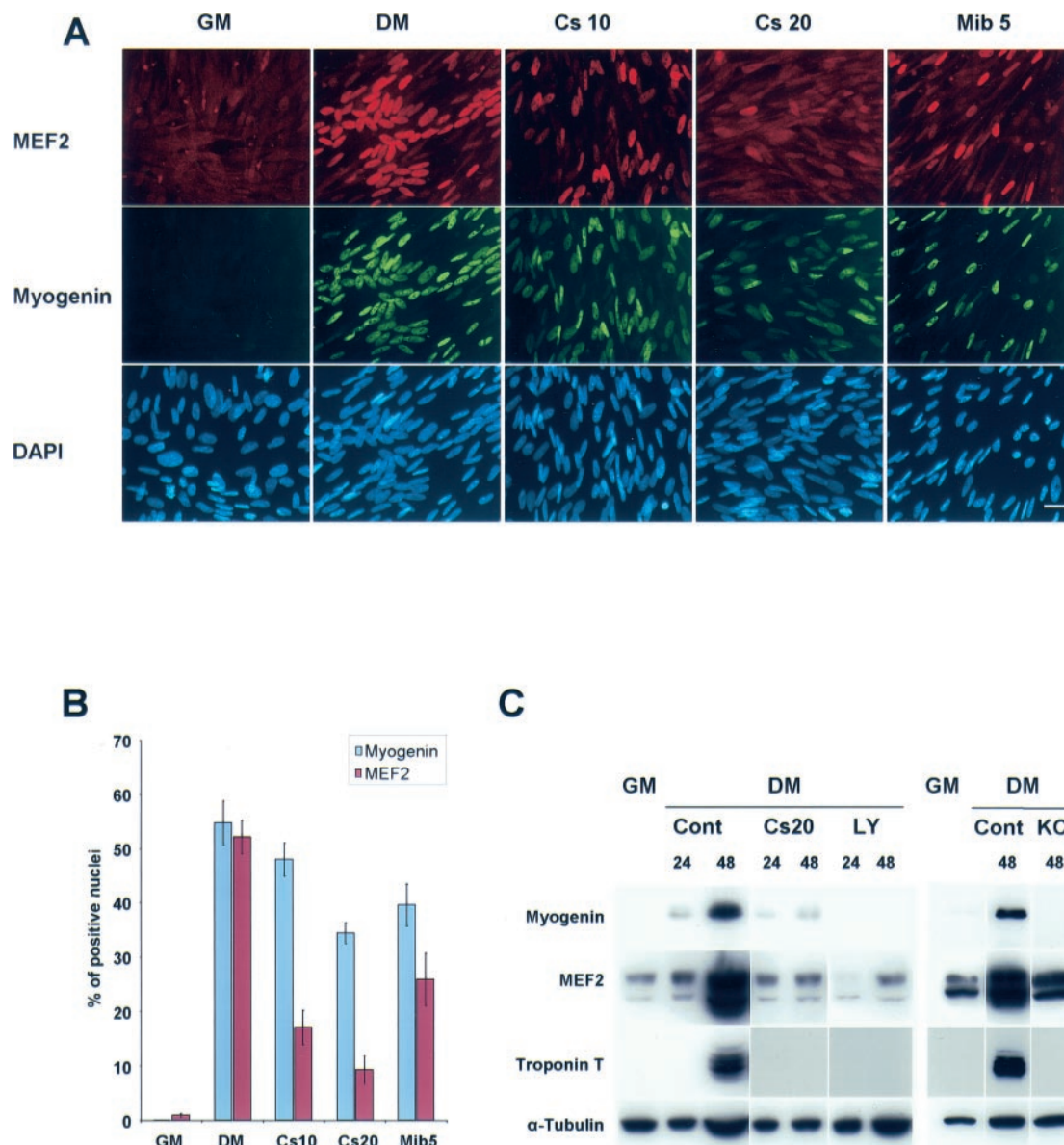


FIG. 4. Blockade of Kir2.1 channel activity inhibits myoblast differentiation. Shown are the results from immunocytochemical analysis of cells maintained in GM, in DM for 26, or in DM 26 h with the indicated drugs: 10 mM Cs^+ (*Cs 10*), 20 mM Cs^+ (*Cs 20*), and 5 μM mibefradil (*Mib 5*). **A**, cells stained for myogenin (FITC) and MEF2 (TRITC) and with DAPI to visualize the nuclei. Scale bars = 20 μm . **B**, decrease in the number of myogenin- and MEF2-positive nuclei by inhibitors of Kir2.1. Five randomly selected fields were analyzed in two independent experiments. Error bars correspond to S.E. **C**, Western blot of equal amounts of total proteins from cells maintained in DM in the absence or presence of either 20 mM Cs^+ (Kir2.1 inhibitor) or 50 μM LY294002 (*LY*; phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor). After 24 or 48 h, cells were lysed, and protein expression was analyzed for myogenin, MEF2, and troponin T (a marker of late differentiation). An antibody against α -tubulin was used to show the amount of protein applied to gel. The last three lanes represent an experiment with high external $[\text{K}^+]$. Myoblasts treated with 130 mM KCl (and control (*Cont*) myoblasts in 5 mM external K^+) were induced to differentiate for 48 h. To maintain the osmolarity constant, 125 mM NaCl usually present in DM was replaced with 125 mM KCl.

ation conditions decreased both myogenic bHLH and MEF2 activities. Treatment with 10 mM Cs^+ and 5 μM mibefradil reduced myogenic bHLH activity to 46 and 44% of its control activity, respectively, and 20 mM Cs^+ reduced the activity of myogenic bHLH by 76% (Fig. 5B). The activity associated with MEF2 dropped by 84 and 95% compared with the control cells in the presence of 10 and 20 mM Cs^+ , respectively, and 5 μM mibefradil reduced the activity by 83% (Fig. 5C). We thus observed a decrease in myogenic bHLH activity that was less important than that observed for MEF2 activity in the presence of Cs^+ or mibefradil. This is consistent with the well described Ca^{2+} -dependent activity of the MEF2 transcription factor and our previous observation that hyperpolarization of myoblasts allows $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to increase (3, 4).

To confirm these pharmacological results, we evaluated the

effect on MEF2 activity of an antisense against the human Kir2.1 mRNA (AS-Kir2.1). We used a bicistronic vector allowing enhanced green fluorescent protein expression together with expression of the full-length cDNA encoding Kir2.1 in an antisense orientation. This plasmid was previously described to be able to reduce both Kir2.1 current and myoblast fusion (2). Myoblasts were transfected with the AS-Kir2.1 vector, and MEF2 activity was assessed. Transfection with the bicistronic vector without the first cistron (expressing enhanced green fluorescent protein alone) did not modify the MEF2 activity and was used as control. Fig. 5D shows that the specific blockade of Kir2.1 channel expression decreased MEF2 activity by 50%. It was not surprising that the antisense inhibition was not as impressive as that shown for 20 mM Cs^+ , as about one-third of the Kir2.1 current is still present after antisense

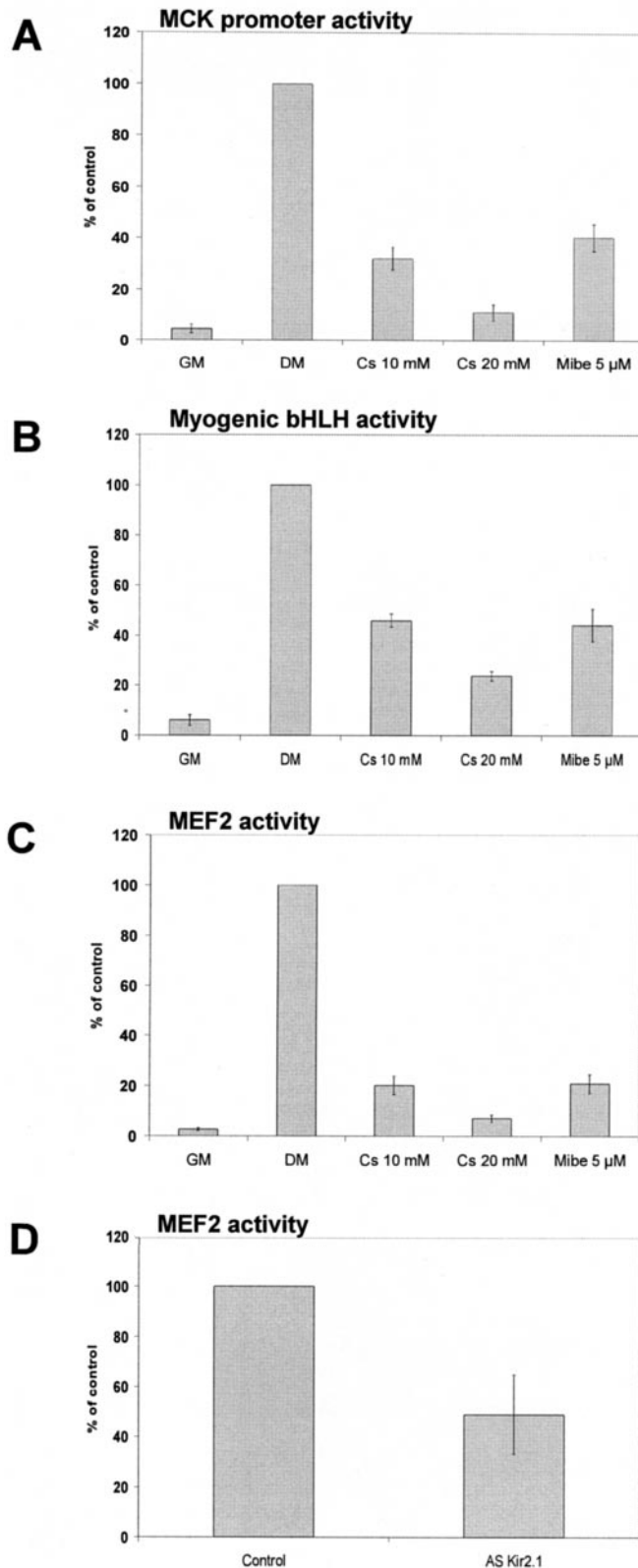


FIG. 5. Kir2.1 blockade affects transcription factor activities. Human primary myoblasts were transiently transfected with plasmid MCK-luc, 4RE-luc, or 3MEF2-luc. Luciferase activity was determined as described under "Experimental Procedures." The MCK promoter (A), myogenic bHLH transcription factors (B), and MEF2 transcription factors (C) were activated during differentiation, and this activation was sensitive to Kir2.1 blockade. Cells were maintained for 4 days in DM or in DM supplemented with 10 mM Cs⁺, 20 mM Cs⁺, or 5 μ M mibefradil (Mibe 5). Results are expressed as the mean of at least seven independent experiments. Error bars correspond to S.E. Differences in luciferase activities were statistically significant: control compared with 10 mM

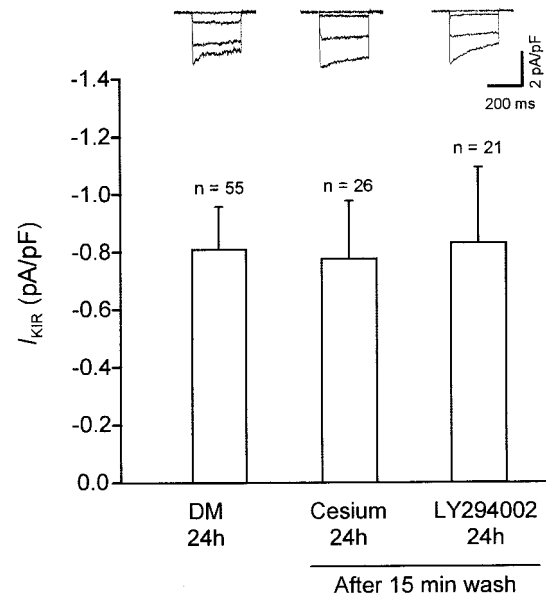


FIG. 6. Developmental induction of Kir2.1 channel activity is not affected by the absence of myogenin and MEF2 expression/activity. $I_{Kir2.1}$ density was evaluated after 24 h in DM or in DM supplemented with either 20 mM Cs⁺ or 50 μ M LY294002. $I_{Kir2.1}$ was activated during a step to -120 mV from a holding potential at -60 mV. As LY294002 is prepared in Me₂SO, expression of $I_{Kir2.1}$ was compared in DM and in DM supplemented with Me₂SO. The results showed no significant difference and were pooled. To measure currents in the cultures with cesium, the cells were washed with DM before recording. Leak currents were estimated either by linear extrapolation from the currents at -40 and -60 mV or by addition of 500 μ M Ba²⁺ to the external bath solution and subtracted. It should be noted that a few small myotubes appeared under control conditions, but that the mean cell size of each cell population was not statistically different on the basis of membrane capacitance (control, 32 $\pm$ 3 pF; Cs⁺, 28 $\pm$ 3 pF; and LY294002, 30 $\pm$ 4 pF).

treatment (2), whereas 20 mM Cs⁺ reduces Kir2.1 current by >95% (1). The results obtained using AS-Kir2.1 are thus consistent with those obtained with pharmacological inhibition of Kir2.1 activity and confirm that Kir2.1 channels contribute to the control of transcription factor activity.

Increase in Kir2.1 Channel Activity during Myoblast Differentiation Is Independent of Myogenin and MEF2 Activities—Given our hypothesis that Kir2.1 channel activity is a crucial step acting upstream of myogenin and MEF2 in triggering myoblast differentiation, we would expect expression of Kir2.1 to occur independently of myogenin and MEF2 expression and activity, even when expression and activity of these factors are blocked. In other words, we expect Kir2.1 channel proteins to be expressed in the presence of two muscle differentiation inhibitors, Cs⁺ and the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 (Fig. 4C). Fig. 6 illustrates the presence of functional Kir2.1 channels in myoblasts 24 h after transfer of the cells into DM (i) under control conditions, (ii) when myogenin and MEF2 activities were blocked by a 24-h exposure to 20 mM Cs⁺, and (iii) when myogenin and MEF2 muscle-specific expression was blocked by 50 μ M LY294002. To measure Kir2.1 channel activity after the Cs⁺ treatment, cells were washed with DM for 15 min prior to recording. We found that $I_{Kir2.1}$ density in myoblasts treated either with 20 mM Cs⁺ ($I_{Kir2.1}$ = -0.78 $\pm$ 0.21 pA/pF, p = 0.90) or with 50 μ M LY294002 ($I_{Kir2.1}$ = -0.83 $\pm$ 0.27 pA/pF, p = 0.95) was not different from the density meas-

Cs⁺ or 5 μ M mibefradil, p < 0.0001; and 10 mM Cs⁺ compared 20 mM Cs⁺, p < 0.005. Antisense inhibition of Kir2.1 channel expression decreased MEF2 activity (D). Results represent the mean of at least five independent experiments. Error bars correspond to S.E.

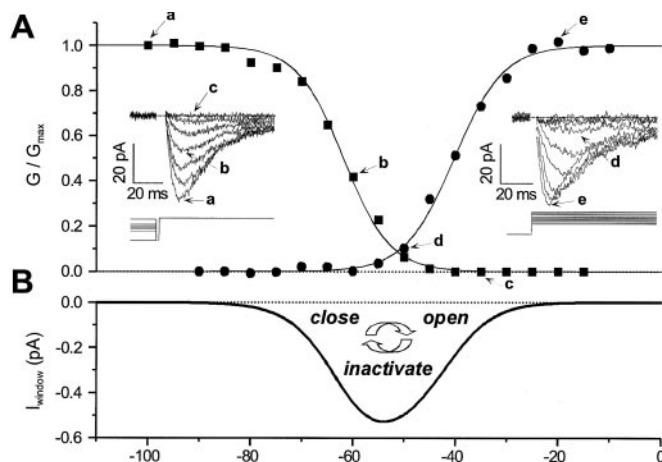


FIG. 7. Whole-cell properties of the T-current in fusion-competent myoblasts (from Ref. 3). A, activation (●) and inactivation (■) conductance curves. Left inset, current traces recorded during steady-state inactivation voltage protocol; right inset, current traces recorded during depolarizing steps (activation protocol). B, computed T-channel window current from the curves shown in A. In the window domain, T-channels cycle permanently between the closed, open, and inactivated states; and thus, statistically, a tiny fraction of the T-channels is always in the open state.

ured in myoblasts induced to differentiate without drugs ($I_{\text{Kir}2.1} = -0.81 \pm 0.15$ pA/pF). From these results, we conclude that the absence of myogenin and MEF2 myogenic regulatory factor activity or expression does not affect the developmental induction of Kir2.1 activity.

DISCUSSION

This work has demonstrated that Kir2.1 channel activity and its associated hyperpolarization (i) modulate the bHLH and MEF2 myogenic transcription factor families, two of the most important protagonists in the control of the myogenic differentiation program (7), and (ii) do not depend upon the activity of these transcription factor families. This suggests that, in human myoblasts, Kir2.1 channel activation is an early trigger event in the differentiation process. We have explained the position of Kir2.1 upstream of transcription factors by the fact that it creates the permissive conditions allowing the Ca^{2+} influx known to be critical for myoblast differentiation and fusion.

Our current understanding of a major mechanism controlling this Ca^{2+} influx is as follows. Human myoblasts must hyperpolarize to approximately -70 mV (*i.e.* their membrane potential must become more negative inside the cell) before they can proceed through the differentiation process (2). Hyperpolarization occurs through expression of Kir2.1 K^+ currents. (Under physiological conditions, open K^+ channels allow an efflux of positively charged potassium ions when the potential of the cell is more positive than E_{K} ; this efflux of K^+ leaves negative charges inside the cell.) We propose that the purpose of the hyperpolarization is to increase the driving force for Ca^{2+} and to set the myoblast resting potential in a voltage range where the necessary inward Ca^{2+} flux can take place.

It may seem surprising that hyperpolarization increases Ca^{2+} influx, as in many familiar situations (such as neurotransmitter release), Ca^{2+} influx is associated with a depolarization that opens voltage-gated calcium channels. In our model, the Ca^{2+} influx is generated by a “window current” through T-type Ca^{2+} channels (T-channels) (3), which are expressed at about the same time as Kir2.1. The mechanism underlying the window current is explained in Fig. 7. T-channels are known to activate rapidly from a closed to an open state upon depolarization (Fig. 7A, traces *d* and *e* during in-

creasing step depolarizations from a holding voltage of -100 mV). However, T-channels rapidly switch off and remain in an inactivated state as depolarization persists. (See the drop in current size at a fixed depolarized voltage to -30 mV following previous voltage holdings at progressively more depolarized levels; traces *a–c* in Fig. 7A were recorded after holding the myoblast for 10 s at -100 , -60 , and -35 mV, respectively.) To move T-channels out of the inactivated state, the cell membrane has to rehyperpolarize, which resets the T-channels to the closed state. How then would T-channels be activated by hyperpolarization? A careful analysis of the T-channel characteristics of myoblasts showed that a steady-state Ca^{2+} current through T-channels exists in the voltage domain where the activation and inactivation current-voltage relationships overlap. In this domain, the equilibrium between the closed, open, and inactivated states is such that T-channels cycle continuously between the three states and that a tiny fraction of the T-channels is always open (Fig. 7B). The magnitude of the T-channel window current (I_{window}) at various membrane resting potentials can be computed from the product of the two curves in Fig. 7A multiplied by the driving force on K^+ ($V_m - E_{\text{K}}$) at each membrane potential V_m . The amplitude of the window current in myoblasts is small (<0.6 pA), but is sufficient to induce a measurable change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ over time (3).

Detection of Functional Kir2.1 Channels and Myogenin Expression—To evaluate the position of Kir2.1 channels in the hierarchy of the myoblast differentiation program, we compared the kinetics of expression of myogenin with those of Kir2.1 current density. Myogenin expression is believed to be one of the earliest steps in the process of differentiation, occurring even before expression of p21 and cell cycle arrest (6). In human myoblasts, myogenin proteins were detected after 12 h in DM and, as expected, preceded the developmental boost in expression of MEF2. We have shown that functional Kir2.1 channels could be detected several hours before expression of myogenin and MEF2. This result suggests that the activation of Kir2.1 channels not only is independent of myogenin expression, but also could act as a key event in the initiation of the myoblast differentiation process.

Mechanisms of Modulation of MEF2 and Myogenic bHLH by Kir2.1 Channels—The fine control of myoblast differentiation is associated with a precise control of the activities of transcription factors. In this work, we have shown that Kir2.1-associated hyperpolarization plays a key role in the activation of the MEF2 and myogenic bHLH families, as Kir2.1 inhibitors reduce the activities of both families of transcription factors. There is increasing evidence demonstrating that Ca^{2+} regulates MEF2 activation mainly through activation of CaM-dependent protein kinase and by calcineurin (9, 10, 22–25). As expected, MEF2 activity could be reduced by Kir2.1 inhibitors to levels close to those observed in undifferentiated myoblasts. MEF2 activity has been shown to be turned on when class II histone deacetylases are translocated from the nucleus to the cytoplasm after phosphorylation by CaM-dependent protein kinase (9). The high sensitivity of MEF2 activity to Kir2.1 inhibition is consistent with our model linking the hyperpolarization induced by Kir2.1 channel activation to intracellular Ca^{2+} regulation, as it would predict a reduction in CaM-dependent protein kinase activity. In fact, we have shown recently that an experimental setting of the membrane potential that accelerates myoblast differentiation increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (4). In this work, we have demonstrated that inhibition of Kir2.1 currents during myoblast differentiation results in a strong inhibition not only of MEF2 activity, but also of MEF2 expression.

MEF2 transcription factors have already been detected at

low levels in human proliferating myoblasts. Previous studies have shown that MEF2 factors pre-exist in myoblasts (16) and that the MEF2D isoform is present in proliferating myoblasts (15). During differentiation *in vitro*, the proportion of cells that show an induction of MEF2 expression increases to reach 55%. When Kir2.1 channels are blocked, this number is strongly reduced. This result suggests that functional Kir2.1 channels control, in some way, MEF2 expression. The skeletal MEF2C promoter contains binding sites for MyoD and MEF2 factors. Expression of MEF2 is thus strongly regulated by synergistic action of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors (26). The reduced expression of MEF2 in the presence of inhibitors of Kir2.1 channels could thus reflect the decrease in the activities of both myogenic bHLH and MEF2 transcription factors.

Expression of the myogenin protein preceded the increase in MEF2 expression and was found to be less sensitive to Kir2.1 current blockade. This result confirms that myogenin and MEF2 expression is not regulated in the same way throughout the process of myoblast differentiation. Expression of myogenin has been recently described to be under the combined influences of p38 MAPK and the Ca^{2+} -dependent regulating pathways associated with calcineurin and CaM-dependent protein kinase (22, 27). The differential sensitivity of myogenin and MEF2 expression to Kir2.1 inhibition suggests that the p38 MAPK pathway may be sufficient to induce myogenin expression in human myoblasts. It is interesting to note that inhibition of Kir2.1 led to a stronger decrease in expression of a late marker of muscle differentiation (troponin T) compared with expression of myogenin, which is considered to be an early marker of muscle differentiation. This shows that troponin T expression depends on both myogenin and MEF2 factors. The MCK promoter/enhancer is primarily regulated during muscle differentiation by two E boxes and two MEF2-binding sites (8, 28, 29). Reduced MCK promoter activity by Kir2.1 blockade could thus reflect the loss of activity of either the MEF2 or myogenic bHLH family or both. It is important to note that, for each promoter tested, there was a perfect correlation between the activity of the promoter and the resting membrane potential. According to our model, the hyperpolarization induced by Kir2.1 activation, at the onset of myoblast differentiation, will lead to an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration. This suggests that the Kir2.1-induced hyperpolarization and subsequent changes in membrane potential modulate the Ca^{2+} -dependent mechanism involving the CaM-dependent protein kinase/class II histone deacetylase pathway.

Relationship between Membrane Depolarization and Differentiation—The use of the potentiometric fluorescent probe DiBAC₄(3) coupled with spinning disc confocal microscopy allowed us to get a precise measurement of the membrane potential of myoblast populations over long periods. Using this noninvasive technique, we were able to evaluate the membrane potential of myoblasts submitted to chronic exposure to Kir2.1 inhibitors. We found that a large proportion of cells induced to differentiate for 20–24 h in control DM hyperpolarized to approximately -70 mV, a result that is comparable with that obtained with patch-clamp recordings (4). This population of myoblasts with a membrane potential at -70 mV (70% of the cells) is in relative agreement with patch-clamp measurements done at the same time and showing that 50% of the tested myoblasts expressed Kir2.1 channels. The difference in the percentage of myoblasts expressing Kir2.1 channels compared with those that were hyperpolarized to -70 mV can be explained by the experimental procedure used in our patch-clamp experiments.

Using confocal imaging with the fluorescent probe DiBAC₄(3), we also found that populations of differentiating

myoblasts treated with 10 mM Cs^+ or 5 μM mibefradil were depolarized by ~ 30 mV to -37 ± 1 and -36 ± 1 mV, respectively. The similarity of the final potentials reached under these two conditions indicates that, although mibefradil at 5 μM can inhibit many channels (T-type Ca^{2+} channels, L-type Ca^{2+} channels, delayed rectifier K^+ channels, and ether-à-go-go K^+ channels) (17), its main effect on the membrane potential of differentiating myoblasts is best explained by inhibition of Kir2.1 channels (also described in Ref. 17).

The effects of 10 mM Cs^+ and 5 μM mibefradil on membrane potential showed the crucial contribution of Kir2.1 channels to myoblast hyperpolarization. However, we also found that Cs^+ at a higher concentration (20 mM), which is more effective in inhibiting myoblast differentiation and fusion, had a more pronounced effect on membrane depolarization than expected (-17 ± 1 mV, $n = 34$). If the potential reached with 10 mM Cs^+ was very close to the value obtained by current-clamp experiments during acute exposure to this concentration (-46 ± 4 mV) (1), the even more depolarized potential reached with 20 mM Cs^+ contrasts with our previous data of patch-clamp recording, in which acute exposures to 30 mM Cs^+ depolarized the cells to -40 ± 1 mV (1). We attribute the additional depolarization observed here to the effect of long-term exposure to Cs^+ . Indeed, as myoblasts depolarize near -40 mV, the human ether-à-go-go channels present in myoblasts are activated (21), and this could lead to an intracellular accumulation of Cs^+ , as this ion can permeate ether-à-go-go channels (30). There is also a possibility that Cs^+ could enter the cells via nicotinic acetylcholine receptors (12, 31). This chronic accumulation of Cs^+ could affect the resting potential of myoblasts by blocking pumps or others K^+ channels, including the human ether-à-go-go channel. These mechanisms could explain the additional depolarization to -17 mV during chronic exposure to Cs^+ .

It is important to mention that the inhibition by 20 mM Cs^+ of the fusion process, of activation of the MCK promoter, and of the activities of the myogenic bHLH and MEF2 factors was consistently more efficient than the blockade by 10 mM Cs^+ . This indicates that mechanisms other than T-channels must contribute to Ca^{2+} entry in differentiating myoblasts when the membrane potential of myoblasts is outside the T-channel window domain (more depolarized than -30 mV) (3).

Hierarchy in the Differentiation Program—We have shown that the presence of functional Kir2.1 channels precedes the activation of the myogenic program of differentiation. This early expression of Kir2.1 at the onset of myoblast differentiation is in agreement with the key role we proposed for Kir2.1-induced hyperpolarization in this developmental process. In this context, it was important to verify that activation of Kir2.1 channels did not require the induction of myogenin and MEF2 expression. We showed that the specific inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by LY294002 totally blocked the expression of myogenin and MEF2 that is normally observed upon induction of myoblast differentiation. We measured Kir2.1 currents in myoblasts induced to differentiate for 24 h in the presence of LY294003 and found that Kir2.1 activity was not modified under these conditions. This result clearly indicates that activation of Kir2.1 current is independent of the activation of MEF2 and myogenic bHLH transcription factors and that it must precede activation of the differentiation program leading to fusion. Furthermore, the observation that the density of $I_{\text{Kir2.1}}$ in myoblasts induced to differentiate remained nearly constant over a period characterized by changes in transcription factor expression and activity confirms that these myogenic regulating pathways do not affect the activation of Kir2.1 channels. Also, exposure to 20 mM Cs^+ , which blocked differentiation and fusion, did not prevent Kir2.1 protein ex-

pression. Together, these observations point to Kir2.1 activation as being an early and Cs^+ -insensitive step in the process of differentiation leading to myoblast fusion.

The mechanism controlling the activation of Kir2.1 current during myoblast differentiation is still an open question. Since Kir2.1 mRNA is detected in proliferating myoblasts (2), a regulatory post-transcriptional mechanism is most likely involved. In neuronal cells, export of K^+ channels from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane has been proposed to control the surface density of K^+ channels (reviewed in Ref. 32). On the other hand, the activation of Kir channels at the membrane may be modulated. Kir2.1 channels, in particular, have been reported to be regulated by tyrosine kinases (33) and, interestingly, by phospholipids, especially phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (34). The precise pathways implicated in the regulation of Kir2.1 channel activation at the onset of myoblast differentiation remain to be explored.

Acknowledgments—We thank M. Berti, C. Viglino, and P. Brawand for excellent technical assistance with cell cultures, Dr. A. Kaelin for providing the muscle biopsies, Drs. W. E. Wright and V. Mouly for the anti-myogenin antibody, Dr. P. L. Puri for providing the luciferase plasmids, and Dr. J. Fischer-Lougheed for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Liu, J.-H., Bijlenga, P., Fischer-Lougheed, J., Occhiodoro, T., Kaelin, A., Bader, C. R., and Bernheim, L. (1998) *J. Physiol. (Lond.)* **510**, 467–476
- Fischer-Lougheed, J., Liu, J.-H., Espinos, E., Mordasini, D., Bader, C. R., Belin, D., and Bernheim, L. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 677–686
- Bijlenga, P., Liu, J.-H., Espinos, E., Haeggeli, C. A., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R., and Bernheim, L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7627–7632
- Liu, J.-H., Konig, S., Michel, M., Arnaudeau, S., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R., and Bernheim, L. (2003) *Development* **130**, 3437–3446
- Black, B. L., and Olson, E. N. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 167–196
- Andres, V., and Walsh, K. (1996) *J. Cell Biol.* **132**, 657–666
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., and Olson, E. N. (1995) *Cell* **83**, 1125–1136
- Gossett, L. A., Kelvin, D. J., Sternberg, E. A., and Olson, E. N. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5022–5033
- Lu, J., McKinsey, T. A., Zhang, C. L., and Olson, E. N. (2000) *Mol. Cell* **6**, 233–244
- Friday, B. B., Mitchell, P. O., Kegley, K. M., and Pavlath, G. K. (2003) *Differentiation* **71**, 217–227
- Baroffio, A., Aubry, J. P., Kaelin, A., Krause, R. M., Hamann, M., and Bader, C. R. (1993) *Muscle Nerve* **16**, 498–505
- Hamann, M., Chamoin, M. C., Portalier, P., Bernheim, L., Baroffio, A., Widmer, H., Bader, C. R., and Ternaux, J. P. (1995) *J. Physiol. (Lond.)* **489**, 791–803
- Espinos, E., Liu, J.-H., Bader, C. R., and Bernheim, L. (2001) *Neuromuscul. Disord.* **11**, 341–349
- Baroffio, A., Hamann, M., Bernheim, L., Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G., and Bader, C. R. (1996) *Differentiation* **60**, 47–57
- Breitbart, R. E., Liang, C. S., Smoot, L. B., Laheru, D. A., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993) *Development* **118**, 1095–1106
- Buchberger, A., Ragge, K., and Arnold, H. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17289–17296
- Liu, J.-H., Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R., and Bernheim, L. (1999) *Br. J. Pharmacol.* **126**, 245–250
- Dall'Asta, V., Gatti, R., Orlandini, G., Rossi, P. A., Rotoli, B. M., Sala, R., Bussolati, O., and Gazzola, G. C. (1997) *Exp. Cell Res.* **231**, 260–268
- Kaliman, P., Vinals, F., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19146–19151
- Donoviel, D. B., Shield, M. A., Buskin, J. N., Haugen, H. S., Clegg, C. H., and Hauschka, S. D. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1649–1658
- Bijlenga, P., Occhiodoro, T., Liu, J.-H., Bader, C. R., Bernheim, L., and Fischer-Lougheed, J. (1998) *J. Physiol. (Lond.)* **512**, 317–323
- Friday, B. B., Horsley, V., and Pavlath, G. K. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 657–666
- Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F. J., Nicol, R. L., McKinsey, T. A., Overbeek, P., Richardson, J. A., Grant, S. R., and Olson, E. N. (2000) *J. Clin. Invest.* **105**, 1395–1406
- Wu, H., Naya, F. J., McKinsey, T. A., Mercer, B., Shelton, J. M., Chin, E. R., Simard, A. R., Michel, R. N., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., and Williams, R. S. (2000) *EMBO J.* **19**, 1963–1973
- Wu, H., Rothermel, B., Kanatous, S., Rosenberg, P., Naya, F. J., Shelton, J. M., Hutcheson, K. A., DiMaio, J. M., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2001) *EMBO J.* **20**, 6414–6423
- Wang, D. Z., Valdez, M. R., McAnally, J., Richardson, J., and Olson, E. N. (2001) *Development* **128**, 4623–4633
- Xu, Q., Yu, L., Liu, L., Cheung, C. F., Li, X., Yee, S. P., Yang, X. J., and Wu, Z. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1940–1952
- Lassar, A. B., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D., and Weintraub, H. (1989) *Cell* **58**, 823–831
- Amacher, S. L., Buskin, J. N., and Hauschka, S. D. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2753–2764
- Pardo, L. A., Bruggemann, A., Camacho, J., and Stuhmer, W. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 767–775
- Adams, D. J., Dwyer, T. M., and Hille, B. (1980) *J. Gen. Physiol.* **75**, 493–510
- Ma, D., and Jan, L. Y. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 287–292
- Wischmeyer, E., Doring, F., and Karschin, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34063–34068
- Soom, M., Schonherr, R., Kubo, Y., Kirsch, C., Klinger, R., and Heinemann, S. H. (2001) *FEBS Lett.* **490**, 49–53

C. Résultats et discussion

1. Résultats

Dans cet article, j'ai analysé par des mesures électrophysiologiques l'activité des canaux Kir2.1 exprimés par des myoblastes humains durant leur différenciation.

- **Cinétique d'expression des canaux Kir2.1 au cours de la différenciation (figure 2 de l'article)**

Nos travaux précédents ont montré qu'une activité des canaux Kir2.1 induisait une hyperpolarisation des myoblastes humains qui était nécessaire à leur fusion (Liu et al., 1998; Fischer-Lougheed et al., 2001). Cette hyperpolarisation était détectée dans des petits myotubes mais également dans des myoblastes induits à se différencier mais repiqués à trop basse densité pour pouvoir fusionner (*fusion-competent myoblast*). Il restait cependant à établir à quel moment les canaux Kir2.1 s'activaient au cours de la différenciation.

Dans ce but, j'ai mesuré la densité de courant à travers les canaux Kir2.1 en configuration "cellule entière" dans des populations de myoblastes exposées au milieu de différenciation (DM) pendant des durées variables. Les myoblastes en prolifération (GM) et les myoblastes mis en DM 2h présentent une très faible densité de courant d'environ -0.2pA/pF. En fait, seul 10% d'entre eux ont une activité Kir2.1 mesurable (courant total >-5pA). Par opposition, les myoblastes exposés au DM pendant 6h, 15h et 24h ont une densité de courant moyenne autour de -0.85pA/pF, due au fait qu'environ la moitié des myoblastes exprime un courant de l'ordre de -2pA/pF.

Deux observations peuvent être faites à partir de ces résultats. Premièrement, les canaux Kir2.1 s'activent de façon maximale dès la 6^{ème} heure en différenciation (la densité de courant à 24h en DM n'est pas plus élevée). Deuxièmement, la comparaison de la cinétique d'expression des canaux Kir2.1 avec celles de la myogénine et de MEF2 (figure 1) montre que l'expression des canaux et donc l'hyperpolarisation précèdent l'expression de ces facteurs de

transcription. L'hyperpolarisation apparaît donc comme l'un des événements les plus précoces nécessaires à l'induction du programme myogénique dans les myoblastes humains.

- **L'activation du courant Kir2.1 n'est pas affectée par l'absence de myogénine et de MEF2 (figure 4 et 6 de l'article)**

Ma seconde contribution a été d'évaluer les conséquences de l'absence des facteurs de transcription myogénine et MEF2 sur l'activation des canaux Kir2.1 afin de déterminer si cette activation était dépendante de la myogénine et/ou de MEF2.

J'ai donc mesuré l'activité des canaux Kir2.1 en configuration "cellule entière" sur des myoblastes se différenciant depuis 24h en présence de césium à 20mM ou de LY294002 à 50μM (inhibiteur de la PI3K), deux substances qui bloquent respectivement l'activité et l'expression de la myogénine et de MEF2 (figure 4 de l'article). Les résultats obtenus montrent que l'activité des canaux Kir2.1 en absence de myogénine et de MEF2 est identique au contrôle (figure 6 de l'article).

Sur la base de ces observations, nous avons conclu que l'hyperpolarisation induite par l'activation des canaux Kir2.1 n'était pas dépendante des facteurs myogénine et MEF2. Ce résultat confirme les expériences réalisées par le Dr Stéphane König et publiées dans cet article sur le rôle de l'hyperpolarisation dans l'induction des facteurs bHLH et MEF2. Ainsi, l'activation des canaux Kir2.1 est un événement inducteur de la différenciation, il crée les conditions permissives à une entrée de calcium capable d'activer la différenciation.

2. Discussion

J'ai mis en évidence, dans cet article, que les canaux Kir2.1 étaient activés très tôt après l'induction de la différenciation (après 6 heures en DM) et que leur activité n'était pas affectée par l'absence de myogénine ou de MEF2, deux des acteurs les plus importants dans le contrôle de la différenciation myogénique. Dans l'ensemble, cet article démontre que l'hyperpolarisation induite par l'activation des canaux Kir2.1 est indispensable à l'activation et l'expression de la myogénine et de MEF2.

Environ deux ans plus tard, notre groupe a pu montrer que l'hyperpolarisation contrôlait l'induction de la différenciation via l'activation de la voie de signalisation calcineurine, et ceci de manière sélective. Les autres voies connues, la p38-MAPK, la PI3K et la CaMK sont également indispensables à l'expression complète de la myogénine et de MEF2, mais leur activation ne dépend pas de l'hyperpolarisation. La p38-MAPK et la PI3K sont actives pendant la phase de prolifération des myoblastes et la CaMK peut être activée durant la phase de prolifération par un mécanisme dépendant du calcium sans lien avec l'hyperpolarisation (Konig et al., 2006).

Ainsi, l'hyperpolarisation induite par les canaux Kir2.1 et l'activation de la voie de signalisation calcineurine qui en résulte constituent un tournant moléculaire irréversible qui force les myoblastes à se différencier et à fusionner pour former des fibres musculaires (figure 7).

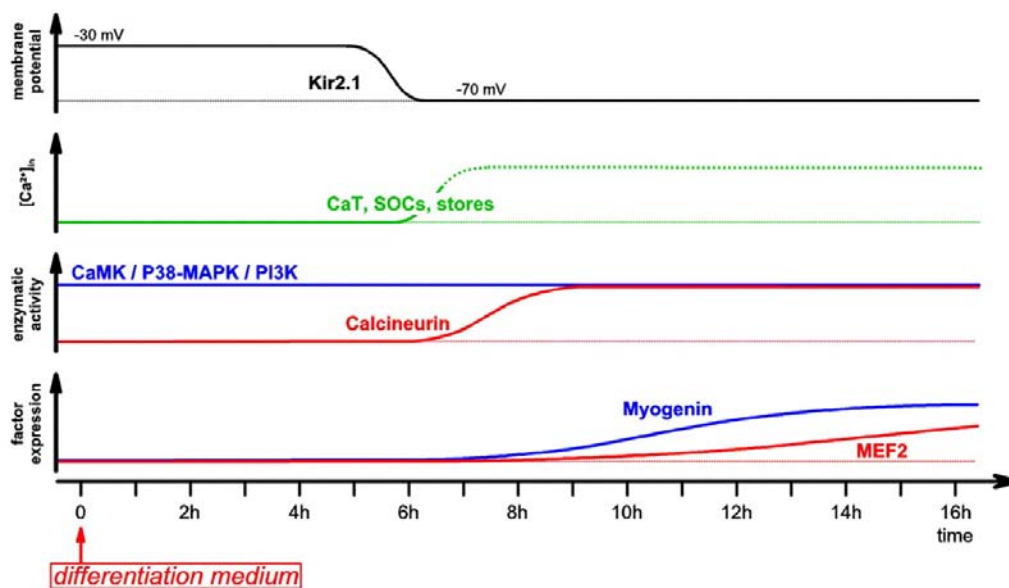


Figure 7 : Modèle chronologique du rôle de l'hyperpolarisation sur la différenciation des myoblastes humains (Konig et al., 2006). Alors que les voies de la CaMK, p38-MAPK et PI3K sont (ou peuvent être) activées durant la prolifération, la calcineurine est strictement associée à l'activité des canaux Kir2.1 en début de différenciation, ceci probablement grâce à l'influx calcique généré par l'hyperpolarisation membranaire.

ARTICLE II

A. Introduction à l'article II

L'activation des canaux Kir2.1 dans les myoblastes humains a lieu après 6h en DM, ce qui est très précoce dans le processus de différenciation (Konig et al., 2004). Les premiers myotubes, par exemple, apparaissent seulement après 24h de différenciation. De plus, l'hyperpolarisation précède et est nécessaire à l'expression et à l'activation de la myogénine et de MEF2, ceci via l'induction de la voie de signalisation calcineurine (Konig et al., 2006). L'activation des canaux Kir2.1 étant donc l'un des événements initiaux de la différenciation, nous nous sommes demandé par quel mécanisme moléculaire les canaux Kir2.1 étaient activés.

Nous avons vu, dans le chapitre d'introduction, que l'expression du canal pouvait être modulée à plusieurs niveaux : au niveau transcriptionnel, traductionnel, au niveau de son transport à la surface ou au niveau de ses propriétés d'ouverture (*gating*). Dans cet article, nous avons donc regardé successivement si l'activation des canaux Kir2.1 en début de différenciation était due:

- 1) à une nouvelle synthèse de canaux,
- 2) à un transport accru à la membrane de canaux stockés dans les organelles,
- 3) ou à une modulation de l'activité des canaux à la membrane.

Nos résultats montrent que l'activation des canaux Kir2.1 en début de différenciation est due à une modulation de leur activité par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation de leur tyrosine 242 (Hinard et al., 2008).

On trouvera en page 69 à 72 des résultats complémentaires aux figures publiées dans l'article II, puis en page 73 à 76 une discussion additionnelle en français résumant les conclusions de l'article.

B. Article Hinard et al. publié en 2008 dans le journal *Development*

**Initiation of human myoblast differentiation via
dephosphorylation of Kir2.1 potassium channels
at tyrosine 242**

by

Hinard Valérie, Belin Dominique, König Stéphane,
Bader Charles Roland, and Bernheim Laurent

Initiation of human myoblast differentiation via dephosphorylation of Kir2.1 K⁺ channels at tyrosine 242

Valérie Hinard¹, Dominique Belin², Stéphane König¹, Charles Roland Bader³ and Laurent Bernheim^{1,*}

Myoblast differentiation is essential to skeletal muscle formation and repair. The earliest detectable event leading to human myoblast differentiation is an upregulation of Kir2.1 channel activity, which causes a negative shift (hyperpolarization) of the resting potential of myoblasts. After exploring various mechanisms, we found that this upregulation of Kir2.1 was due to dephosphorylation of the channel itself. Application of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, increased Kir2.1 activity and triggered the differentiation process, whereas application of bpV(Phen), a tyrosine phosphatase inhibitor, had the opposite effects. We could show that increased Kir2.1 activity requires dephosphorylation of tyrosine 242; replacing this tyrosine in Kir2.1 by a phenylalanine abolished inhibition by bpV(Phen). Finally, we found that the level of tyrosine phosphorylation in endogenous Kir2.1 channels is considerably reduced during differentiation when compared with proliferation. We propose that Kir2.1 channels are already present at the membrane of proliferating, undifferentiated human myoblasts but in a silent state, and that Kir2.1 tyrosine 242 dephosphorylation triggers differentiation.

KEY WORDS: Human myoblasts, Hyperpolarization, Myoblast differentiation, Potassium channel, Tyrosine phosphorylation

INTRODUCTION

Myoblast differentiation is a multi-step process involving withdrawal from the cell cycle, transcriptional activation of muscle-specific genes, and eventually cell fusion into multinucleated myotubes. Little is known about the signals that control the induction of the differentiation process and our goal was to uncover the molecular mechanism that initiates this induction in human myoblasts.

We have previously shown that human myoblasts must hyperpolarize before they can differentiate (Liu et al., 1998), and that this hyperpolarization occurs via an increased activity of Kir2.1 K⁺ channels (Fischer-Lougheed et al., 2001). Hyperpolarization of myoblasts induces a Ca²⁺ influx that is an essential early step of the differentiation process (Bijlenga et al., 2000). We have also established that Kir2.1 channel activation precedes and triggers the expression of myogenin and MEF2, two key transcription factors of the myogenic differentiation program. Kir2.1 channels are upregulated within the first 6 hours of the differentiation process, i.e. several hours before myogenin and MEF2 expression (König et al., 2004). To our knowledge, Kir2.1 activation is, so far, the earliest detectable event during human myoblast differentiation.

In the present study, we evaluated on primary cultures of human myoblasts various potential molecular mechanisms that could control Kir2.1 channel expression and/or activity at the onset of the differentiation process. We tested whether Kir2.1 channels were regulated at the level of protein synthesis, vesicular trafficking (from the endoplasmic reticulum via the Golgi apparatus to the plasma membrane), or whether the activity of the channel at the membrane was modulated.

Several types of ionic channels are known to be expressed or repressed during developmental programs, and this is also the case of Kir2.1 channels. For example, several domains in the chicken Kir2.1 promoter regulate the tissue-specific expression of this

channel (Mutai et al., 2004). It has also been shown that electrical activity is required for the stability of Kir2.1 mRNA into skeletal muscle cells (Shin et al., 1997). Furthermore, growth factors can regulate the transcription rate of several muscle channels (for example T-type Ca²⁺ channel) (Avila et al., 2006).

With respect to trafficking, Kir2.1 protein contains ER-export motifs that control the targeting of channels to the plasma membrane. These motifs are likely to act as recognition signals for its incorporation into COP-II coated transport vesicles. They were described to be necessary and sufficient for channel export without need for additional interacting partners (Ma et al., 2001; Stockklausner et al., 2001) (but see Grishin et al., 2006). Signaling pathways like the Ras-MAPK pathway also appear to act on Kir2.1 channels trafficking (Giovannardi et al., 2002). In addition, binding sites for anchoring proteins such as the filamin A (Sampson et al., 2003), PSD93δ (Leyland and Dart, 2004) or SAP97 (Leonoudakis et al., 2004) are thought to stabilize Kir2.1 channels at the plasma membrane.

Alternatively, the gating properties of ionic channels at the plasma membrane can be modulated by various intra- and extracellular signaling pathways. Members of the inward rectifying K⁺ channel family possess multiple PIP₂-binding sites that are known to be key regulators of their gating properties (Rohacs et al., 2003; Soom et al., 2001). Furthermore, Kir2.1 can be modulated by PKA (Wischmeyer and Karschin, 1996), PKC (Fakler et al., 1994; Jones, 2003) and receptor-activated tyrosine kinases (Hoger et al., 2002; Ruppertsberg, 2000; Ruppertsberg and Fakler, 1996; Wischmeyer et al., 1998). Recently, it has been suggested that kinases and phosphatases can be intimately associated to channels in a single regulatory protein complex that modulates channel activity (Levitan, 2006).

Using whole-cell patch-clamp recording, we found that Kir2.1 channels activated at the onset of the differentiation process are already present at the plasma membrane during proliferation, but that they are silent. Their activity is induced by dephosphorylation of Kir2.1 tyrosine 242.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Genistein and bpV(Phen) were from Calbiochem (San Diego, California), Brefeldin A (from *Penicillium brefeldianum*) and cycloheximide from Sigma. Rabbit polyclonal Kir2.1 antibodies were from Alomone Labs

¹Département de Neurosciences Fondamentales, ²Département de Pathologie et Immunologie and ³Département des Neurosciences Cliniques, University of Geneva, Centre Médical Universitaire, CH-1211 Geneva 4, Switzerland.

*Author for correspondence (e-mail: laurent.bernheim@medecine.unige.ch)

(Jerusalem, Israel), and chicken polyclonal anti-Kir2.1 IgY were produced by Covalab (Lyon, France). Peroxidase-conjugated donkey anti-chicken IgY were from Jackson Immunoresearch Labs, and mouse monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (clone PT-66) from Sigma.

Cell cultures

Clonal cultures of human myoblasts were prepared from single satellite cells and expanded as described by Liu et al. (Liu et al., 1998).

Electrophysiological recordings

Kir2.1 currents were measured in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique as in König et al. (König et al., 2004). During intracellular application of bpV(Phen) through the patch pipette, we decreased the amount of BAPTA in the intracellular solution to 0.2 mM because vanadates are sensitive to Ca^{2+} chelators and Ca^{2+} concentration (Huyer et al., 1997). In these experiments, CaCl_2 was added to reach a final concentration of 200 nM, and KCl was increased to maintain osmolarity.

Metabolic labeling

Myoblasts were kept in methionine-free medium for 15 minutes with or without cycloheximide (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). [^{35}S]-methionine (12.5 μCi / well containing 10^5 myoblasts) was then added for 30 minutes. Cells were lysed in triton buffer (PBS, Triton X-100 0.5%, 5 mM EDTA) and proteins were precipitated by TCA before to be mixed with liquid scintillation cocktail (Ready Value). Radioactivity was measured on scintillation counter (Beckman Coulter).

DNA construct and transfection

Mutations of the human pcEGFP-Kir2.1 tyrosines 242, 336 and 366 into phenylalanine residues were carried out with the QuickChange Kit (Stratagene). Mutations were verified by sequencing. Transfections were performed as described by Espinos et al. (Espinos et al., 2001). Proliferating myoblasts were electroporated with pcEGFP-Kir2.1, with the mutants pcEGFP-Kir2.1_{Y242F}, pcEGFP-Kir2.1_{Y336F} or pcEGFP-Kir2.1_{Y366F}, or, for control experiments, with pcEGFP, and maintained 24 hours in growth medium before electrophysiological recording or other treatments.

Membrane enrichment

Cultured myoblasts were lysed with a hypotonic buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1% NP-40) with protease inhibitors and 1 mM Na_3VO_4 . Nuclei were removed and cell extracts were then ultracentrifuged for 1 hour at 100,000 g at 4°C . Crude membranes pellets were resuspended in hypotonic buffer and used for immunoprecipitation. Protein content was calculated using a Bradford assay (BioRad).

Immunoprecipitation

Crude membrane proteins (10 mg) from non-transfected cells or total lysates (100 μg) from transfected cells were precleared on proteinA-sepharose (Sigma) before incubation with 3.6 μg rabbit anti-Kir2.1 for 2 hours at 4°C . ProteinA-sepharose beads (50 μl) were used to immunoprecipitate Kir2.1 proteins (overnight at 4°C). The beads were pelleted by centrifugation (10,000 g for 1 minute), and SDS- β -mercaptoethanol sample buffer was used to separate immunoprecipitated proteins from the beads (3 minutes at 100°C).

Biotinylation of cell surface proteins

Myoblasts were incubated for 20 minutes with 0.25 mg/ml NHS-Biotin diluted in PBS at 4°C . NHS-Biotin was then quenched for 15 minutes with 40 mM $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{PBS}$ at 4°C . For the separation of biotinylated proteins, the same amount of proteins from the different lysates was incubated for 1 hour at 4°C with 50 μl of streptavidin magnetic beads (Roche). Non-biotinylated proteins were separated from the beads with a magnetic particle separator. The beads were then washed three times with hypotonic buffer. Biotinylated proteins were recovered in 50 μl of SDS- β -mercaptoethanol sample buffer. After 3 minutes at 100°C , beads were removed with the magnetic separator.

Western blotting

Aliquots were analyzed by western blot as in König et al. (König et al., 2004). Membranes were incubated with rabbit polyclonal anti-Kir2.1 (1:200), mouse monoclonal anti-phosphotyrosine (clone PT-66, 1:3000) or

chicken polyclonal anti-Kir2.1 antibodies (1:250). Primary antibodies were then exposed to horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse, goat anti-rabbit or donkey anti-chicken antibodies (1:6000).

TIRF measurement

Tracking of membrane-inserted Kir2.1-GFP channels was obtained from total internal reflection fluorescence (TIRF) images as in Marthinet et al. (Marthinet et al., 2005). Image analysis was performed using MetaMorph software.

Statistics

Results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. Statistical analyses were performed using Student's *t*-test (asterisk in figures indicates $P < 0.05$).

RESULTS

Early Kir2.1 channel activity during initial differentiation is neither due to channel synthesis nor to channel incorporation into the plasma membrane

In human myoblasts, Kir2.1 current density reaches its maximum already after an exposure of 6 hours to differentiation medium (König et al., 2004). Fig. 1A illustrates a Kir2.1 current elicited at various potentials and its inhibition by 500 μM BaCl_2 . The current-to-voltage relationships show the typical inward rectification of the Kir2.1 channels ($E_K = -84$ mV in our recording conditions). In order to determine whether Kir2.1 channel activation at the beginning of the differentiation process was due to new channel synthesis, we inhibited *de novo* protein synthesis with cycloheximide and evaluated the Kir2.1 channel activity after 6 hours of differentiation (Fig. 1B). Efficiency of the drug was established by measuring [^{35}S]-methionine incorporation. Application of 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide for 3 hours blocked $81 \pm 6\%$ of total new protein synthesis. Kir2.1 channel activity was measured in myoblasts maintained in differentiation medium supplemented with 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide for 6 hours and compared with the Kir2.1 activity measured in myoblasts kept in control differentiating conditions for the same time. The fraction of myoblasts maintained in cycloheximide and expressing a Kir2.1 current was not statistically different from that of myoblasts maintained in control conditions (control = $53 \pm 9\%$, $n = 28$, cycloheximide = $34 \pm 6\%$, $n = 46$, $P = 0.117$). The Kir2.1 current density of myoblasts kept 6 hours with cycloheximide was, however, smaller than that of myoblasts in control conditions (control = -1.1 ± 0.3 pA/pF, $n = 28$, cycloheximide = -0.4 ± 0.1 pA/pF, $n = 46$, $P = 0.002$, but see below).

In parallel experiments, we assessed Kir2.1 channel activity in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A, an inhibitor of endoplasmic reticulum (ER) to Golgi transport (Fig. 1C). This was done to evaluate whether the Kir2.1 channel activation during the 6 first hours of differentiation could be due to a translocation of channels from the ER to the plasma membrane. No statistical difference was observed in the presence of the drug when compared with control. The fraction of myoblasts presenting Kir2.1 current (control = $42 \pm 6\%$, $n = 19$, Brefeldin A = $40 \pm 7\%$, $n = 46$, $P = 0.862$), as well as the Kir2.1 current density, was similar in both conditions (control = -0.7 ± 0.2 pA/pF, $n = 19$, Brefeldin A = -0.5 ± 0.1 pA/pF, $n = 46$, $P = 0.558$). To verify that Brefeldin A at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was efficiently inhibiting the ER-to-Golgi transport, myoblasts were transfected with the fusion proteins Kir2.1-GFP, and newly synthesized GFP-channels visualized by confocal microscopy. Unlike what was observed in the control conditions, in the presence of the Brefeldin A most fluorescence was located around the nucleus, demonstrating the efficiency of the drug at blocking the transport from the ER to the plasma membrane.

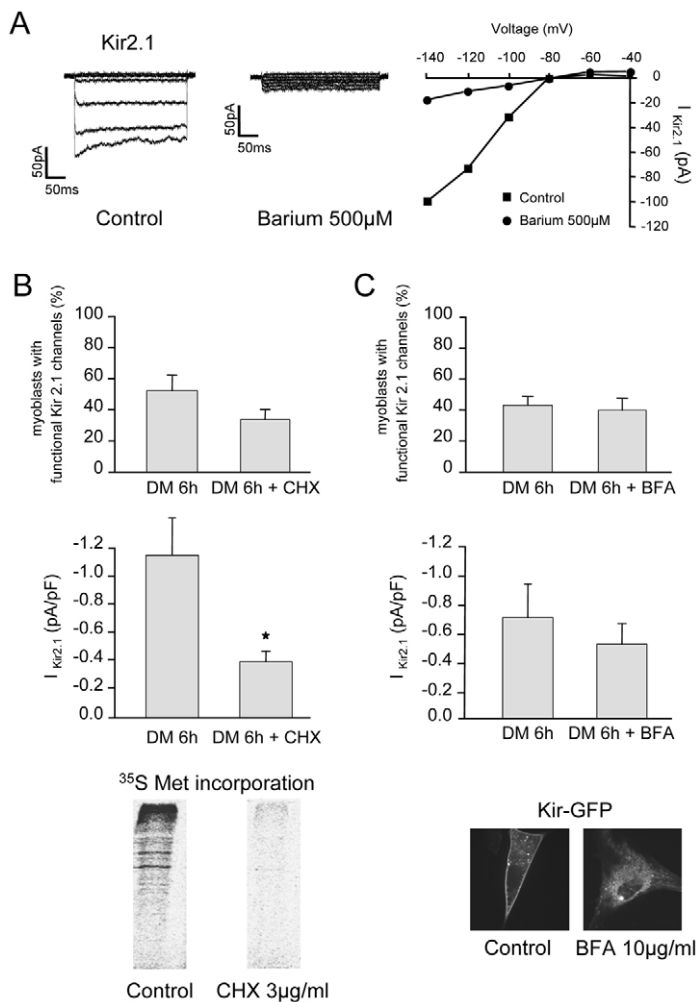


Fig. 1. Kir2.1 channels are neither newly synthesized nor transported to the plasma membrane during the first 6 hours of differentiation. (A) Typical Kir2.1 current recorded from one myoblast cultured for 6 hours in differentiation medium (DM). Ba²⁺ (500 μM), as expected, inhibited the current. Voltage-steps were to -40, -60, -80, -100, -120 and -140 mV from a holding potential at -60 mV. Current-to-voltage relationships are shown in control condition and in the presence of 500 μM Ba²⁺. (B) Myoblasts were cultured in DM for 6 hours with or without 3 μg/ml cycloheximide (CHX). Kir2.1 current amplitude was assessed during a 300 ms step to -120 mV from a holding potential at -60 mV. The upper histogram represents the fraction of myoblasts expressing Kir2.1 current (≥5 pA) and the lower histogram the current density of the total population of myoblasts (including myoblasts with no current, i.e. <5 pA) in control and in cycloheximide conditions. Both histograms are from the same recordings. Leak currents were estimated either by linear extrapolation from the currents recorded at -40 and -60 mV or by addition of 500 μM Ba²⁺ to the external bath solution, and subtracted to the total current. Twenty-eight myoblasts (out of three different clones) with a mean cell capacitances of 32±3 pF were recorded under control conditions, and 46 myoblasts (out of three different clones) with a mean cell capacitances of 27±2 pF in the presence of cycloheximide. Asterisk indicates *P* < 0.05 (and in subsequent figures). [³⁵S]-methionine incorporation was performed in the absence or presence of cycloheximide 3 μg/ml during 3 hours to evaluate protein synthesis. (C) Myoblasts were cultured in DM for 6 hours with or without 10 μg/ml Brefeldin A (BFA). Histograms represent the fraction of myoblasts with Kir2.1 current and the Kir2.1 current density as in B. Both histograms are from the same recordings. Nineteen myoblasts (out of four different clones) with a mean cell capacitances of 34±3 pF were recorded in control conditions, and 46 myoblasts (out of three different clones) with a mean cell capacitances of 23±2 pF in the presence of Brefeldin A. Representative pictures (confocal microscopy) of myoblasts transfected with Kir2.1-GFP and incubated immediately after transfection in the presence or absence of 10 μg/ml Brefeldin A for 12 hours. In the presence of Brefeldin A, Kir2.1-GFP channels do not reach the plasma membrane.

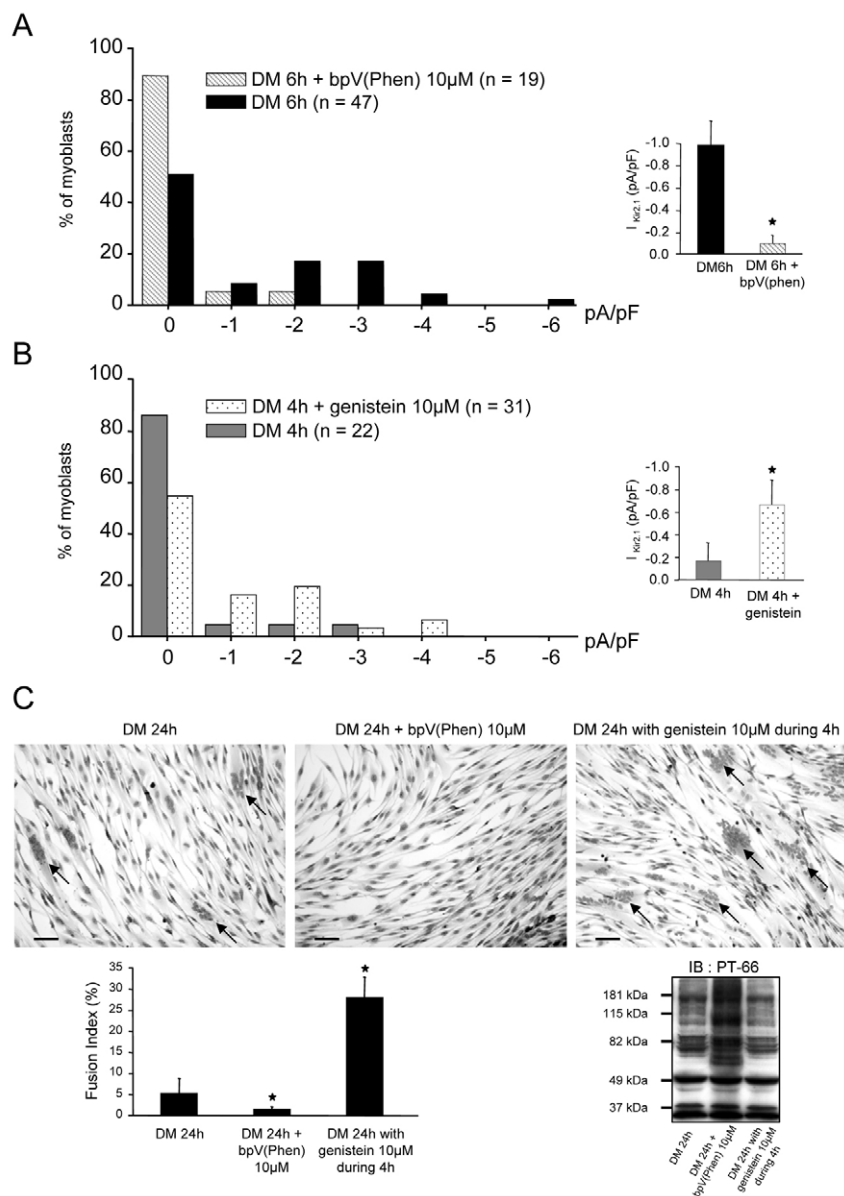
These data strongly suggest that Kir2.1 channel activation at the onset of differentiation is not due to protein synthesis or trafficking regulations, the two sets of experiments complementing and strengthening each other. Indeed, if a new synthesis of Kir2.1 channels would have taken place during the first 6 hours of differentiation, we should have observed a diminution of the Kir2.1 current after treatment with Brefeldin A. As we did not detect any reduction of the current in the presence of Brefeldin A, we conclude that Kir2.1 activation is not due to a new synthesis followed by transport to the plasma membrane. The diminution of Kir2.1 current density observed in myoblasts kept 6 hours with cycloheximide could be due to either an effect of the drug on channel activity or to an intrinsic instability of the required phosphatase (see below), but not on the inhibition of Kir2.1 protein synthesis.

Kir2.1 channel activation and the fusion process are modulated by a tyrosine phosphorylation

Translational or trafficking regulations being unlikely mechanisms to explain the increase of Kir2.1 channel activity, we then postulated that a pool of Kir2.1 channels could be maintained inactivated at the plasma membrane during proliferation, and that Kir2.1 activation would be the consequence of a functional modulation. It is known that Kir2.1 channels possess a phosphorylation site on the tyrosine 242, and that its phosphorylation inhibits Kir2.1 channel activity

(Wischmeyer et al., 1998). To investigate whether such a mechanism could be involved during myoblast differentiation, we tested Kir2.1 current activation in the presence of either bpV(Phen), a tyrosine phosphatase inhibitor, or genistein, a tyrosine kinase inhibitor. As shown in Fig. 2A, the proportion of myoblasts expressing a Kir2.1 current is strongly reduced in the presence of the tyrosine phosphatase inhibitor bpV(Phen). A Kir2.1 current could be recorded in only 10% (2 out of 19) of the myoblasts placed for 6 hours in differentiation medium supplemented with 10 μM bpV(Phen). By contrast, in the control differentiation conditions, 49% of the tested myoblasts had Kir2.1 current (23 out of 47). We should point out that, in the presence of bpV(Phen), the percent of myoblasts with Kir2.1 current is similar to that observed during normal proliferation (Konig et al., 2004). The current density of bpV(Phen)-treated myoblasts was reduced to one tenth of that of non-treated myoblasts (*P* = 0.005, Fig. 2A, inset).

We then added genistein, a tyrosine kinase inhibitor, to the differentiation medium; application of 10 μM genistein during 4 hours drastically increased the number of Kir2.1-positive cells. It is important to mention that Kir2.1 channels are not yet activated after 4 hours in differentiation conditions (Konig et al., 2004). Indeed, whereas 45% of the myoblasts (14 out of 31) presented a Kir2.1 current in the presence of the drug, only 14% of the myoblasts (3 out of 22) had measurable Kir2.1 current in the control conditions (Fig. 2B). Consistently, the current density of genistein-treated myoblasts



was fourfold greater than non-treated myoblasts ($P=0.036$, Fig. 2B, inset). From these observations, we conclude that bpV(Phen) slows down Kir2.1 activation, whereas genistein accelerates it.

As we know that the differentiation process is closely linked to Kir2.1 channel activity (Konig et al., 2006), we examined whether the inhibition of tyrosine kinases and phosphatases also affects the differentiation and fusion process. Experiments were carried out after 24 hours in differentiating conditions, as we wanted to evaluate the beginning of the fusion process. Fig. 2C shows that application of bpV(Phen) slowed down myoblast fusion (down to 2% of fusion, $P=0.02$), whereas genistein accelerated it (up to 28% of fusion, $P<0.001$), in comparison to the control conditions (5% of fusion). The early myotubes (24 hours) that are observed after genistein treatment do not differ morphologically from the early myotubes that appear at a later time (28 hours) in control cultures, when the differentiation is more advanced (data not shown). The immunoblot of Fig. 2C confirms that 10 μM bpV(Phen) enhanced the overall myoblast protein phosphorylation level and that 10 μM genistein reduced it.

Fig. 2. Kir2.1 channel activation and myoblast differentiation are linked to a tyrosine dephosphorylation.

(A) Myoblasts were induced to differentiate for 6 hours in the absence or presence of 10 μM bpV(Phen). Kir2.1 current was recorded during a 300 ms step to -120 mV from a holding potential at -60 mV. The histogram represents the fraction of myoblasts with Kir2.1 current density of increasing amplitudes (from 0 pA/pF to -6 pA/pF). Leak currents were estimated as in Fig. 1A. Cell capacitances were 33 ± 3 pF ($n=47$) in DM 6 hours and 20 ± 2 pF ($n=19$) in DM supplemented with bpV(Phen). (Right) Kir2.1 current density in control conditions and when bpV(Phen) is added. This histogram is an alternative representation of the data on the left. (B) Myoblasts were induced to differentiate for 4 hours in the absence or presence of 10 μM genistein. Kir2.1 current was measured and results presented as in A. Cell capacitances were 24 ± 3 pF ($n=22$) in DM 4 hours and 24 ± 3 pF ($n=31$) in DM supplemented with genistein. (Right) Kir2.1 current density in control conditions and when genistein is added. This histogram is an alternative representation of the data on the left. (C) Fusion index of myoblasts kept for 24 hours in DM (control conditions), or in DM supplemented with 10 μM bpV(Phen) or with 10 μM genistein during the first 4 hours. Fusion index represents the fraction of nuclei within myotubes. As genistein is prepared in DMSO, we verified that the final DMSO concentration (0.1%) had no effect on the fusion index ($n=6$; $P=0.59$, data not shown). Myoblasts were fixed with ice-cold methanol, and stained with Hematoxylin-Eosin. Two different clones were evaluated. Nuclei were counted in three randomly chosen microscope fields for each condition. One microscope field usually contains between 400 and 500 nuclei. A representative picture in each condition is shown. Arrows indicate clusters of nuclei in myotubes. Scale bars: 50 μm. An anti-phosphotyrosine immunoblot on myoblast protein extract shows that 10 μM genistein and 10 μM bpV(Phen) affect overall tyrosine phosphorylation.

Altogether, these results show that activation of Kir2.1 channels and the fusion process are induced by a reduction of tyrosine kinase activity and blocked by an inhibition of tyrosine phosphatase activity.

Kir2.1 current activity is reduced by a tyrosine phosphatase inhibitor

The next step was to determine whether the amplitude of the Kir2.1 current could be modulated by genistein or bpV(Phen) during recording. For that purpose, either bpV(Phen) or genistein was included in the intracellular pipette solution during whole-cell patch-clamp recordings. Fig. 3A (top) illustrates the stability of the Kir2.1 current under control conditions during a 25 minutes recording (left traces are after 1 minute recording and right traces after 25 minutes). When 100 μM bpV(Phen) was added to the pipette solution, Kir2.1 current was reduced by 50% of its initial value after 10 minutes recording, and by 90% after 25 minutes (Fig. 3A, middle traces and Fig. 3B). Finally, co-application of 100 μM bpV(Phen) and 100 μM genistein through the patch pipette (to slow-down a tyrosine re-

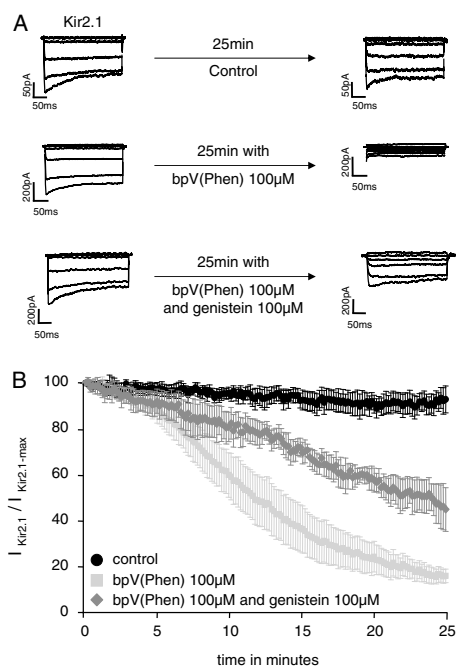


Fig. 3. Kir2.1 current is inhibited by a tyrosine phosphatase inhibitor. Kir2.1 currents were recorded by whole-cell patch-clamp technique in myoblasts induced to differentiate for 24 hours with a patch pipette containing or not (control) 100 μ M bpV(Phen). (A) Kir2.1 currents recorded from myoblasts cultured for 24 hours in DM, in the absence (top) or in the presence (middle) of 100 μ M bpV(Phen), or in the presence of both 100 μ M bpV(Phen) and 100 μ M genistein (bottom). Left traces represent currents recorded after 1 minute and right traces after 25 minutes. Voltage-steps were to -40 , -60 , -80 , -100 , -120 and -140 mV from a holding potential at -60 mV. (B) Mean Kir2.1 current amplitude assessed every 10 seconds during a 300 ms step to -120 mV from a holding potential at -60 mV in the absence ($n=3$) or in the presence ($n=5$) of 100 μ M bpV(Phen), or in the presence of both 100 μ M bpV(Phen) and 100 μ M genistein ($n=3$) in the pipette solution. Currents are normalized to the initial current measured 1 minute after breaking the patch. Even though 10 μ M genistein was added to the culture medium 2 hours before performing the recordings with both bpV(Phen) and genistein in the pipette, a complete maintenance of channel activity was not achieved.

phosphorylation of the Kir2.1 channels) halved the bpV(Phen)-induced inactivation of the Kir2.1 current (Fig. 3A, bottom traces; Fig. 3B).

These results confirm that Kir2.1 currents recorded in human myoblasts at the onset of differentiation are continuously modulated by tyrosine phosphatase and kinase activities.

Kir2.1 channels are inhibited by a phosphorylation of tyrosine 242

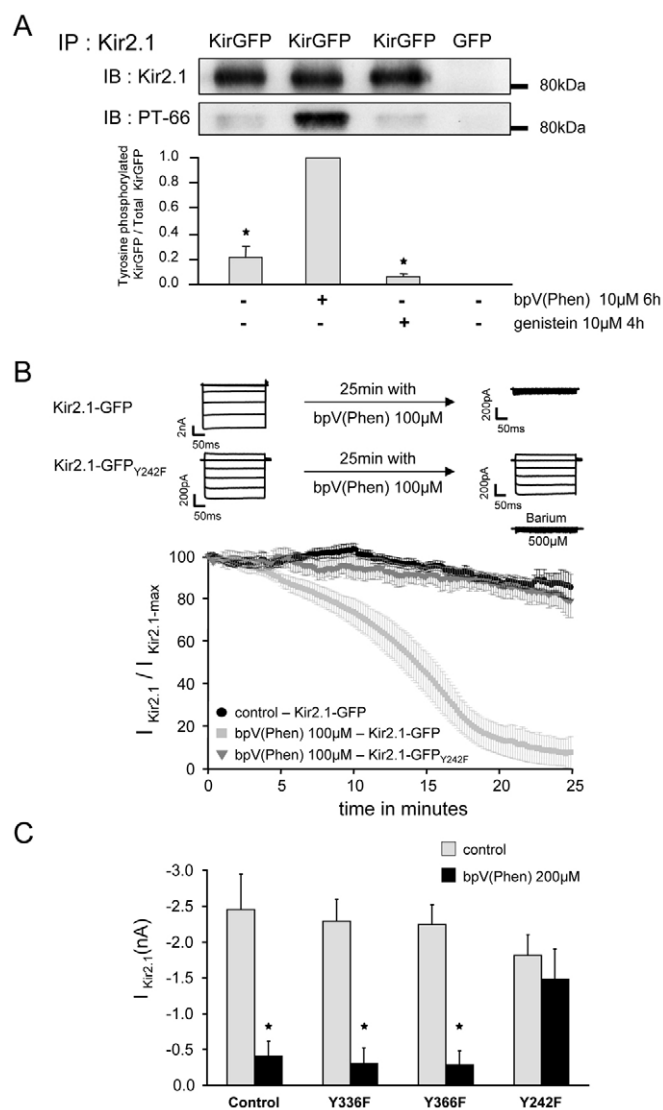
The modulation of Kir2.1 currents by tyrosine phosphatase and kinase activities could be the consequence of the phosphorylation of one of the tyrosines of the Kir2.1 channels itself or it could be linked to a more complex mechanism involving phosphorylation of co-regulators. To evaluate the first possibility, we immunoprecipitated Kir2.1-GFP channels with an anti-Kir2.1 antibody and revealed the tyrosine phosphorylation with an anti-phosphotyrosine antibody (PT-66). Fig. 4A shows that Kir2.1-GFP channels were tyrosine-phosphorylated, and that the channel phosphorylation were halved when tyrosine kinases were blocked by genistein and enhanced fivefold when tyrosine phosphatases were inhibited by bpV(Phen).

We then replaced the tyrosine 242 of the Kir2.1-GFP channel by a phenylalanine (Kir2.1-GFP_{Y242F}) and tested the effect of bpV(Phen) on the channel activity. This point mutation was chosen as the tyrosine 242 has been shown to regulate the activity of Kir2.1 channels through its phosphorylation (Wischmeyer et al., 1998). We verified that the Kir2.1-GFP and the Kir2.1-GFP_{Y242F} currents behaved electrophysiologically as the native Kir2.1 current, and that Kir2.1-GFP responded in the same way to bpV(Phen) treatment. Myoblasts transfected with Kir2.1-GFP and Kir2.1-GFP_{Y242F} displayed typical Kir2.1 currents, except that the amplitude of the currents was much larger than the endogenous Kir2.1 current (Kir2.1-GFP = -189 ± 16 pA/pF, $n=29$; Kir2.1-GFP_{Y242F} = -162 ± 16 pA/pF, $n=29$). Fig. 4B shows that, as the endogenous Kir2.1 current, Kir2.1-GFP current was reduced by at least 90% after 25 minutes when 100 μ M bpV(Phen) was added to the intra-pipette solution. However, unlike the Kir2.1 channels, the mutant Kir2.1-GFP_{Y242F} did not inactivate in the presence of 100 μ M of bpV(Phen). After 25 minutes bpV(Phen) treatment, the Kir2.1-GFP_{Y242F} current was only slightly decreased ($22 \pm 8\%$, $n=3$), a reduction that is similar to that observed for Kir2.1-GFP currents recorded for 25 minutes without bpV(Phen) ($17 \pm 6\%$, $n=5$). Thus, Kir2.1 channels lacking the tyrosine 242 phosphorylation site are unaffected by the tyrosine phosphatase inhibitor bpV(Phen). However, an experiment similar to that illustrated in Fig. 4A revealed that the Kir2.1-GFP_{Y242F} channel was still tyrosine phosphorylated, suggesting that other tyrosines were available for phosphorylation (data not shown). The Kir2.1 primary sequence contains five to seven tyrosine phosphorylation consensus sites. Therefore, we wondered whether the phosphorylation of one or several other tyrosines would have an effect on Kir2.1 activity. We decided to replace two tyrosine residues, Y336 and Y366, by phenylalanine residues. These tyrosine are the most susceptible to phosphorylation, as predicted by the NetPhos programme (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>); Y242, Y336 and Y366 have phosphorylation scores of 0.976, 0.917 and 0.910, respectively. Using the Prosit program (<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>), only Y242 and Y366 are potential tyrosine kinase phosphorylation sites. We also verified that these tyrosines are at the surface of the protein, using the available structure of the Kir2.1 cytoplasmic part (Pegan et al., 2005). Kir2.1 current were measured in myoblasts expressing the wild-type Kir2.1-GFP or the mutated channels, Kir2.1-GFP_{Y242F}, Kir2.1-GFP_{Y336F} and Kir2.1-GFP_{Y366F}, 1 hour after the addition of 200 μ M bpV(Phen) to the culture medium. Fig. 4C shows that only the Kir2.1-GFP_{Y242F} current was resistant to bpV(Phen) ($P=0.3$). By contrast, the wild-type Kir2.1-GFP and the two mutants, Y336F and Y366F, were strongly inhibited by the bpV(Phen) treatment ($P<0.001$).

From these experiments, we conclude that a tyrosine phosphatase inhibition inactivates Kir2.1-GFP current via the phosphorylation of the tyrosine 242 residue of the Kir2.1-GFP channels.

Kir2.1-GFP channels are not internalized during bpV(Phen)-treatment

Phosphorylation of the tyrosine 242 of Kir2.1-GFP channels reduces the whole-cell Kir2.1-GFP current. This could be the consequence either of a change in gating properties of the Kir2.1 channel itself (reduction of the probability of opening) (Wischmeyer et al., 1998) or of an internalization of the Kir2.1 channels (Tong et al., 2001). We evaluated a possible internalization of the channels by bpV(Phen) using the technique of cell-surface protein biotinylation at 4°C, followed by a separation of the biotinylated proteins from the non-biotinylated with streptavidin magnetic beads. The biotinylated



fraction of Kir2.1-GFP channels was evaluated before and after bpV(Phen) treatment (10 μM for 6 hours since this protocol massively reduced Kir2.1 current; Fig. 2A, inset). Fig. 5A shows that the fraction of Kir2.1-GFP at the plasma membrane was not significantly different after the 6 hours treatment by bpV(Phen) ($P=0.91$, $n=4$). Controls were carried out with non-biotinylated myoblasts and with GFP-transfected myoblasts.

To confirm this result, we addressed the same issue using TIRF microscopy (total internal reflection fluorescence microscopy). This method is a powerful optical technique that allows the study of cellular membrane activities, such as secretion or internalization of fluorescent molecules. As TIRF measurements could not exceed 1 or 2 hours because of cell migration, we applied 200 μM bpV(Phen) to have a rapid inhibition of the Kir2.1-GFP current. Fig. 5B showed that Kir2.1 current is largely inhibited by a 60 minutes bath application of 200 μM bpV(Phen). Kir2.1 current density was -188 pA/pF and -35 pA/pF before and after 60 minutes bpV(Phen) treatment ($n=3$ and $n=5$ respectively; $P=0.02$). The variation of fluorescence intensity due to Kir2.1-GFP channels at the plasma membrane in the presence of 200 μM of bpV(Phen) was followed by TIRF microscopy in sister cultures. If internalization of Kir2.1-GFP channels occurs, the fluorescence intensity seen by TIRF microscopy should decrease. It can be seen in Fig. 5B that a 60-

Fig. 4. Kir2.1 channels are modulated through the phosphorylation of the tyrosine 242. (A) Myoblasts expressing Kir2.1-GFP were incubated either with 10 μM bpV(Phen) for 6 hours or with 10 μM genistein for 4 hours. Myoblasts transfected with a vector containing only GFP was included in these experiments as a control. In all conditions, myoblasts were treated for 30 minutes before lysis with 10 μM bpV(Phen) to avoid unspecific dephosphorylation (this does not affect Kir2.1 current, data not shown). Kir2.1-GFP channels were immunoprecipitated from cell lysates with an anti-Kir2.1 antibody. Immunoprecipitated proteins were separated on SDS-PAGE, and revealed first with an anti-phosphotyrosine antibody (lower lane) and then reblotted with an anti-Kir2.1 antibody (upper lane). IP is for immunoprecipitation and IB for immunoblot. Bands were quantified by Optiquant software and represented as a histogram. The fraction of Kir2.1-GFP channels that are tyrosine-phosphorylated was normalized to the maximum tyrosine-phosphorylated Kir2.1-GFP channels obtained in the presence of 10 μM bpV(Phen). Results were obtained from three independent experiments. (B) Kir2.1-GFP and Kir2.1-GFP_{Y242F} currents were recorded in transfected proliferating myoblasts with a patch pipette containing or not (control) 100 μM bpV(Phen). Top: examples of Kir2.1-GFP and Kir2.1-GFP_{Y242F} currents recorded in the presence of 100 μM bpV(Phen) during voltage-steps as in Fig. 3A. Addition of Ba²⁺ (500 μM) blocked the Kir2.1-GFP_{Y242F} current at the end of the 25 minute recording. Bottom: Kir2.1 current amplitude was assessed as in Fig. 3B. The graph represents the mean Kir2.1 current of Kir2.1-GFP transfected cells for 25 minutes recording in the absence ($n=5$) or in the presence ($n=3$) of 100 μM of bpV(Phen), and of Kir2.1-GFP_{Y242F} transfected cells recording in the presence of 100 μM of bpV(Phen) ($n=3$). (C) Myoblasts expressing Kir2.1-GFP (control), Kir2.1-GFP_{Y336F} (Y336F), Kir2.1-GFP_{Y366F} (Y366F) and Kir2.1-GFP_{Y242F} (Y242F) channels were incubated with 200 μM bpV(Phen) for 1 hour. The Kir2.1 current density was evaluated before (gray) and after bpV(Phen) treatment by whole-cell patch-clamp. Nine to 16 cells were recorded in each condition; capacitances of each group of cells vary between 10±2 and 14±2 pF (not significantly different).

minute treatment with 200 μM bpV(Phen) did not affect the fluorescence intensity ($n=4$; $P=0.59$). As a control, we verified that, in the absence of bpV(Phen), the fluorescence of Kir2.1-GFP channels was constant during the 60-minute recording ($n=3$, data not shown).

Altogether, these results strongly suggest that Kir2.1-GFP current inactivation is not due to an endocytosis of the channels but that it is linked to a direct tyrosine phosphorylation of the Kir2.1 channels.

Differentiation of human myoblasts is linked to a tyrosine dephosphorylation of endogenous Kir2.1 channels

A key experiment of this study was to evaluate endogenous Kir2.1 channels tyrosine phosphorylation, and also to assess whether this tyrosine phosphorylation was modulated during differentiation. This experiment was difficult to perform, as there are only a few hundreds Kir2.1 channels at the plasma membrane of each myoblasts. Therefore, 300×10⁶ proliferating myoblasts and the same number of myoblast kept for 6 hours in differentiation medium were harvested. Total lysates were ultracentrifuged to enrich the membrane fraction. Kir2.1 channels of the enriched membrane fraction of the two populations were immunoprecipitated using a rabbit IgG anti-Kir2.1 antibody and revealed on SDS-PAGE with a

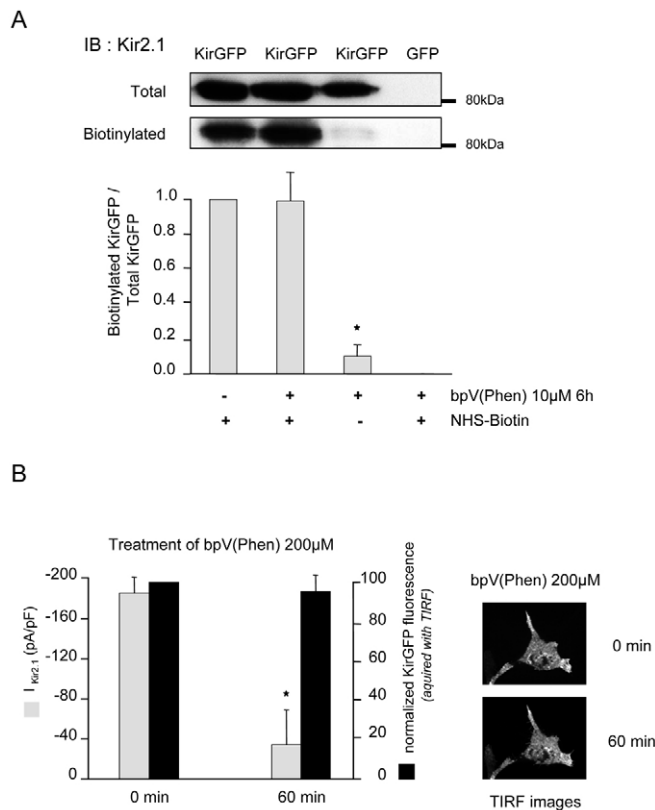


Fig. 5. Kir2.1-GFP channels are not internalized by the bpV(Phen)-treatment. (A) Myoblasts expressing Kir2.1-GFP channels were incubated with or without 10 μM bpV(Phen) for 6 hours. After cell surface protein biotinylation, myoblasts were lysed and an equal amount of proteins from each condition was precipitated using streptavidin magnetic particles. Myoblasts expressing Kir2.1-GFP channels on which no biotinylation was performed and myoblasts transfected with a vector containing only GFP were included as controls. Total proteins and biotinylated proteins were separated on SDS-PAGE and revealed with an anti-Kir2.1 antibody. Bands were quantified by Optiquant software. The histogram represents the fraction of biotinylated Kir2.1-GFP channels normalized to the fraction of biotinylated Kir2.1-GFP channels observed in the absence of bpV(Phen). Results were obtained from four independent experiments. (B) Myoblasts expressing Kir2.1-GFP channels were incubated with 200 μM bpV(Phen) for 1 hour. The Kir2.1-GFP current density (gray) was evaluated before ($n=3$) and after ($n=5$) bpV(Phen) treatment by whole-cell patch-clamp technique. In parallel experiments, Kir2.1-GFP channels fluorescence (black) was followed by TIRF microscopy for the 1 hour bpV(Phen) treatment. The histogram represents Kir2.1-GFP current density before and after bpV(Phen) treatment and the average fluorescence from four myoblasts (mean of 7-8 regions per cell) measured during the first 3 and the final 3 minutes of the 1 hour bpV(Phen) treatment. The fluorescence was normalized to the fluorescence measured during the first 3 minutes of the bpV(Phen) treatment. TIRF pictures of a myoblast at the beginning and at the end of the 1 hour bpV(Phen) treatment are shown on the right.

chicken IgY anti-Kir2.1 antibody. We employed a chicken IgY antibody because the heavy-chain of the rabbit IgG has the same molecular weight as Kir2.1 channels. Fig. 6A (upper lane) shows that endogenous Kir2.1 channels were detectable, and equally present in proliferation and differentiation conditions. We then reblotted the same membrane with an antibody against phosphotyrosine residue, which showed that endogenous Kir2.1 channels of

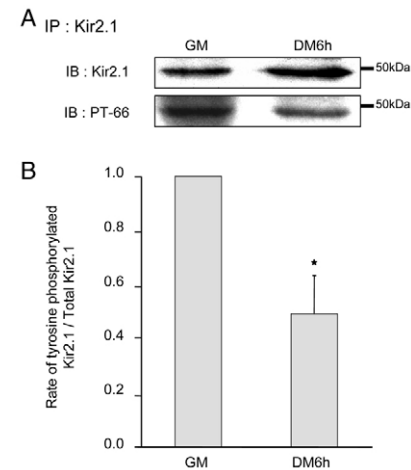


Fig. 6. Tyrosine dephosphorylation of endogenous Kir2.1 channels at the onset of differentiation. (A) Myoblasts (300×10^6) were cultured in growth medium (GM) or in differentiation medium for 6 hours (DM 6h). Both populations of myoblasts were treated for 30 minutes preceding lysis with 10 μM bpV(Phen) to avoid unspecific dephosphorylation. An equal amount of proteins (10 mg) from each population was immunoprecipitated with a rabbit anti-Kir2.1 antibody. Immunoprecipitated proteins were separated on SDS-PAGE, and revealed with chicken anti-Kir2.1 antibody (upper lane) and then reblotted with an anti-phosphotyrosine antibody (PT-66, lower lane). Bands were quantified by Optiquant software. (B) The histogram represents the fraction of endogenous Kir2.1 channels that are tyrosine-phosphorylated normalized to the tyrosine-phosphorylated Kir2.1 channels in proliferating conditions. Results were obtained from three independent experiments.

proliferating myoblasts were tyrosine-phosphorylated, and that this tyrosine phosphorylation was reduced by 50% after 6 hours in differentiation condition (Fig. 6B).

These final results confirm that endogenous Kir2.1 channels of proliferating myoblasts are tyrosine phosphorylated, and that the induction of differentiation is linked to a tyrosine dephosphorylation of the endogenous Kir2.1 channels.

DISCUSSION

Our study demonstrates that the increase of Kir2.1 channel activity, which is tightly linked to the induction of human myoblast differentiation, is due to the dephosphorylation of tyrosine 242 of the channel itself. By activating Kir2.1 channels, this dephosphorylation is responsible for the early hyperpolarization that, via a Ca²⁺ signal, turns on the calcineurin pathway and triggers the differentiation process (Arnaudeau et al., 2006; König et al., 2006; König et al., 2004). To our knowledge, the Kir2.1 tyrosine 242 dephosphorylation is thus the earliest molecular mechanism described yet in the cascade of events that leads to the irreversible induction of myoblast differentiation and fusion.

We have previously shown that Kir2.1 mRNA was present in proliferating myoblasts (Fischer-Lougheed et al., 2001). We could exclude in the present work that the induction of Kir2.1 channel activity is due to new channel synthesis or transport of Kir2.1 channels from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. We propose that, in human proliferating myoblasts, Kir2.1 channels are kept silent at the plasma membrane by phosphorylation of tyrosine 242, and that these channels are ready to turn on the differentiation process in response to extracellular stimuli that induce their dephosphorylation.

Silent Kir2.1 channels are already present at the plasma membrane of proliferating myoblasts

Our results show that upregulation of Kir2.1 channels is not the consequence of gene expression or trafficking regulation. Neither cycloheximide nor Brefeldin A had major effects on the activation of Kir2.1 channels during the first 6 hours of differentiation. In addition, biotinylation and TIRF experiments showed that Kir2.1-GFP channels are still present at the plasma membrane even after the complete inhibition of Kir2.1 current by bpV(Phen). Together, these observations suggest that Kir2.1 channels are localized at the cell surface of proliferating myoblasts but in a silent state.

In agreement with this hypothesis, a recent study reported that the active Kir2.1 channels could represent only a small fraction of the total channels present at the plasma membrane. Using the FRAC technique (function recovery after chemobleaching), Sun et al. (Sun et al., 2004) showed that many 'Kir2.1 sleeping molecules' were present on plasma membrane of HEK293 cells stably overexpressing Kir2.1 channels, and concluded that only a small fraction of channels at the plasma membrane contributed to the overall channel activity.

Myoblast differentiation is modulated by a tyrosine phosphorylation

Kir2.1 channel increased activity and the fusion process are induced by a tyrosine kinase inhibitor, genistein, and reduced by a tyrosine phosphatase inhibitor, bpV(Phen). The interpretation of these pharmacological studies is, however, complicated by the fact that such inhibitors will affect all intracellular pathways in which a tyrosine phosphorylation is involved. For example, genistein inhibits cell proliferation in prostate and breast cancer cells (Kousidou et al., 2006; Ouchi et al., 2005). We did not specifically look at the effect of genistein or bpV(Phen) on human myoblast proliferation as the drugs were added to cells only under differentiation conditions. Indeed, our goal was to analyze the early effect of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on Kir2.1 channel activity and on the induction of the differentiation process. Although genistein and bpV(Phen) probably affect many proteins of human myoblasts, these inhibitors directly target Kir2.1 channels, and modulate the differentiation and fusion process in a way closely related to the level of Kir2.1 channel phosphorylation and activity. From these results, we conclude (1) that during proliferation, a tyrosine kinase activity phosphorylates Kir2.1 channels and blocks the entry of myoblasts in the differentiation process and (2) that, although the kinase is still active in the early phase of differentiation, an increase in tyrosine phosphatase activity targeting Kir2.1 channels is required to trigger differentiation.

Kir2.1 current is directly modulated by the tyrosine 242 phosphorylation

Evidences for a possible regulation of ionic channels by a direct tyrosine phosphorylation and dephosphorylation has substantially increased over the last years (Davis et al., 2001). Concerning Kir2.1 channels, Wischmeyer et al. (Wischmeyer et al., 1998) showed that Kir2.1 channels overexpressed in HEK293 cells were suppressed by perorthovanadate, and that this inhibition was reversed by genistein. Our observations in primary cultures of human myoblasts are in good agreement with these results, the only difference is that the Kir2.1 inhibition by bpV(Phen) in human myoblasts requires a longer application of the drug to be completed. Kir2.1 current is inhibited by bpV(Phen) within 10 minutes in HEK293 cells overexpressing Kir2.1 channels (we confirmed these results ourselves, data not shown), whereas it required about 25 minutes in

human myoblasts. This difference could be explained either by a lower level of tyrosine kinase activity in human myoblasts or by a localization of the enzyme that makes it less accessible to the drug.

The effect of genistein on Kir2.1 current is less striking than that of bpV(Phen). Application of genistein alone did not result in Kir2.1 currents activation in proliferating myoblasts. A possible explanation is that the tyrosine phosphatase that dephosphorylates Kir2.1 channels is lacking or not activated in proliferating myoblasts. However, co-application of genistein with bpV(Phen) in differentiated myoblasts expressing Kir2.1 channels reduces the bpV(Phen)-induced Kir2.1 inhibition. Recently, it has been shown that a genistein pretreatment blocks the EGF-induced inhibition of Kir2.1 channels in urothelial cells (Sun et al., 2007). This observation supports the hypothesis that Kir2.1 channels activity can be directly modulated by a tyrosine phosphorylation. Finally, we showed that bpV(Phen) did not inactivate the current through Kir2.1 channels when these channels were mutated on the tyrosine 242. The mutant mimics a dephosphorylated channel that is constitutively active. This experiment strongly suggests that the modulation of Kir2.1 channel activity occurs via the phosphorylation and dephosphorylation of its tyrosine 242.

Differentiation is triggered by the dephosphorylation of endogenous Kir2.1 channels

A major finding of this work is that endogenous Kir2.1 channels are tyrosine phosphorylated in proliferating myoblasts, and that phosphorylation is reduced at the onset of differentiation. We therefore propose that Kir2.1 channels are kept silent during proliferation by a tyrosine phosphorylation due to activated kinase receptors. Several ionic channels have been described to be inhibited by such mechanism. For example, when Kv1.3 is co-expressed in HEK293 cells with EGFR, the channel becomes tyrosine-phosphorylated and the current inhibited, mimicking the regulation of Kv1.3 by Fas in T lymphocytes (Bowlby et al., 1997). Similarly, when Kir2.1 channel is co-expressed with EGFR and NGFR in oocytes, its activity decreases after EGF and NGF exposure (Wischmeyer et al., 1998). Recently, it has been shown in bladder urothelial cells that Kir2.1 channel activity is strongly inhibited by EGF (Sun et al., 2007). In our human myoblast cultures, one of the main differences between proliferating and differentiating conditions is a reduction of growth factors in the differentiation medium. This difference could, on its own, explain a reduction of tyrosine kinase activity in differentiating conditions. However, the efficiency of the Kir2.1 channel dephosphorylation at the onset of differentiation may also depend on the induction of a tyrosine phosphatase activity. Indeed, recent literature underscores the major role of tyrosine phosphatases in signal transduction pathways (Tiganis and Bennett, 2007). The control of the Kir2.1 channel activation throughout differentiation is thus likely to be dependent on the fine tuning of both kinase and phosphatase activities. A possible candidate for this dephosphorylation event could be SHP-2, a tyrosine phosphatase required for myogenesis (Kontaridis et al., 2004). SHP-2 has also been proposed to promote slow skeletal muscle fiber growth by coordinating signals from the extracellular matrix to the NFAT pathway (Fornaro et al., 2006).

In conclusion, we propose that during proliferation, endogenous Kir2.1 channels are maintained silent at the plasma membrane by a tyrosine phosphorylation. Then, during the first hours of differentiation, a fine balance between tyrosine kinase and tyrosine phosphatase activities dephosphorylates Kir2.1 channels at tyrosine 242, and thereby triggers the activation of the channels. These

results provide the basis for further investigation into the link between extracellular signaling and the induction of a differentiation process through the modulation of ionic channels.

We thank P. Brawand, C. Pomponio and P. Teta for their excellent technical assistance; Dr S. Arnaudeau for assistance with bioimaging instrumentation; Dr A. Kaelin for providing the human muscle biopsies; and Dr E. Marban for the pcEGFP-Kir2.1 plasmid. This work was supported by the Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (3100A0-105331), the Fondation Suisse pour la Recherche sur les Maladies Musculaires, the Fondation Marcel Levaillant and the Association Française contre les Myopathies.

References

- Arnaudeau, S., Holzer, N., König, S., Bader, C. R. and Bernheim, L. (2006). Calcium sources used by post-natal human myoblasts during initial differentiation. *J. Cell. Physiol.* **208**, 435-445.
- Avila, T., Andrade, A. and Felix, R. (2006). Transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-2 downregulate Cav3.1 channel expression in mouse C2C12 myoblasts. *J. Cell. Physiol.* **209**, 448-456.
- Bijlenga, P., Liu, J. H., Espinos, E., Haenggeli, C. A., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R. and Bernheim, L. (2000). T-type alpha 1H Ca²⁺ channels are involved in Ca²⁺ signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7627-7632.
- Bowlby, M. R., Fadool, D. A., Holmes, T. C. and Levitan, I. B. (1997). Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J. Gen. Physiol.* **110**, 601-610.
- Davis, M. J., Wu, X., Nurkiewicz, T. R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M. A. and Wilson, E. (2001). Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**, H1835-H1862.
- Espinos, E., Liu, J. H., Bader, C. R. and Bernheim, L. (2001). Efficient non-viral DNA-mediated gene transfer to human primary myoblasts using electroporation. *Neuromuscul. Disord.* **11**, 341-349.
- Fakler, B., Brandt, U., Glowatzki, E., Zenner, H. P. and Ruppersberg, J. P. (1994). Kir2.1 inward rectifier K⁺ channels are regulated independently by protein kinases and ATP hydrolysis. *Neuron* **13**, 1413-1420.
- Fischer-Lougheed, J., Liu, J. H., Espinos, E., Mordasini, D., Bader, C. R., Belin, D. and Bernheim, L. (2001). Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. *J. Cell Biol.* **153**, 677-686.
- Fornaro, M., Burch, P. M., Yang, W., Zhang, L., Hamilton, C. E., Kim, J. H., Neel, B. G. and Bennett, A. M. (2006). SHP-2 activates signaling of the nuclear factor of activated T cells to promote skeletal muscle growth. *J. Cell Biol.* **175**, 87-97.
- Giovannardi, S., Forlani, G., Balestrini, M., Bossi, E., Tonini, R., Sturani, E., Peres, A. and Zippel, R. (2002). Modulation of the inward rectifier potassium channel IRK1 by the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 12158-12163.
- Grishin, A., Li, H., Levitan, E. S. and Zaks-Makhina, E. (2006). Identification of gamma-aminobutyric acid receptor-interacting factor 1 (TRAK2) as a trafficking factor for the K(+) channel Kir2.1. *J. Biol. Chem.* **281**, 30104-30111.
- Hoger, J. H., Ilyin, V. I., Forsyth, S. and Hoger, A. (2002). Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7780-7785.
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsapralis, G., Gresser, M. J. and Ramachandran, C. (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* **272**, 843-851.
- Jones, S. V. (2003). Role of the small GTPase Rho in modulation of the inwardly rectifying potassium channel Kir2.1. *Mol. Pharmacol.* **64**, 987-993.
- König, S., Hinard, V., Arnaudeau, S., Holzer, N., Potter, G., Bader, C. R. and Bernheim, L. (2004). Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 28187-28196.
- König, S., Beguet, A., Bader, C. R. and Bernheim, L. (2006). The calcineurin pathway links hyperpolarization (Kir2.1)-induced Ca²⁺ signals to human myoblast differentiation and fusion. *Development* **133**, 3107-3114.
- Kontaridis, M. I., Eminaga, S., Fornaro, M., Zito, C. I., Sordella, R., Settlemán, J. and Bennett, A. M. (2004). SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5340-5352.
- Kousidou, O., Tzanakakis, G. N. and Karamanos, N. K. (2006). Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells. *Mini Rev. Med. Chem.* **6**, 331-337.
- Leonoudakis, D., Conti, L. R., Radeke, C. M., McGuire, L. M. and Vandenberg, C. A. (2004). A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 19051-19063.
- Levitan, I. B. (2006). Signaling protein complexes associated with neuronal ion channels. *Nat. Neurosci.* **9**, 305-310.
- Leyland, M. L. and Dart, C. (2004). An alternatively spliced isoform of PSD-93/chapsyn 110 binds to the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J. Biol. Chem.* **279**, 43427-43436.
- Liu, J. H., Bijlenga, P., Fischer-Lougheed, J., Occhiodoro, T., Kaelin, A., Bader, C. R. and Bernheim, L. (1998). Role of an inward rectifier K⁺ current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J. Physiol.* **510**, 467-476.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-319.
- Marthinet, E., Bloc, A., Oka, Y., Tanizawa, Y., Wehrle-Haller, B., Bancila, V., Dubuis, J. M., Philippe, J. and Schwitzgebel, V. M. (2005). Severe congenital hyperinsulinism caused by a mutation in the Kir6.2 subunit of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel impairing trafficking and function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 5401-5406.
- Mutai, H., Kenyon, L. C., Locke, E., Kikuchi, N. and Oberholtzer, J. C. (2004). Characterization of the chicken inward rectifier K⁺ channel IRK1/Kir2.1 gene. *BMC Genomics* **5**, 90.
- Ouchi, H., Ishiguro, H., Ikeda, N., Hori, M., Kubota, Y. and Uemura, H. (2005). Genistein induces cell growth inhibition in prostate cancer through the suppression of telomerase activity. *Int. J. Urol.* **12**, 73-80.
- Pegan, S., Arrabit, C., Zhou, W., Kwiatkowski, W., Collins, A., Slesinger, P. A. and Choe, S. (2005). Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat. Neurosci.* **8**, 279-287.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Jin, T., Ramdya, P. P., Molnar, Z. and Logothetis, D. E. (2003). Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 745-750.
- Ruppersberg, J. P. (2000). Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Arch.* **441**, 1-11.
- Ruppersberg, J. P. and Fakler, B. (1996). Complexity of the regulation of Kir2.1 K⁺ channels. *Neuropharmacology* **35**, 887-893.
- Sampson, L. J., Leyland, M. L. and Dart, C. (2003). Direct interaction between the actin-binding protein filamin-A and the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J. Biol. Chem.* **278**, 41988-41997.
- Shin, K. S., Park, J. Y., Kwon, H., Chung, C. H. and Kang, M. S. (1997). A possible role of inwardly rectifying K⁺ channels in chick myoblast differentiation. *Am. J. Physiol.* **272**, C894-C900.
- Soom, M., Schonherr, R., Kubo, Y., Kirsch, C., Klinger, R. and Heinemann, S. H. (2001). Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett.* **490**, 49-53.
- Stockklauser, C., Ludwig, J., Ruppersberg, J. P. and Klocker, N. (2001). A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. *FEBS Lett.* **493**, 129-133.
- Sun, H., Shikano, S., Xiong, Q. and Li, M. (2004). Function recovery after chemobleaching (FRAC): evidence for activity silent membrane receptors on cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16964-16969.
- Sun, Y., Chen, M., Lowentritt, B. H., Van Zijl, P. S., Koch, K. R., Keay, S., Simard, J. M. and Chai, T. C. (2007). EGF and HB-EGF modulate inward potassium current in human bladder urothelial cells from normal and interstitial cystitis patients. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C106-C114.
- Tiganis, T. and Bennett, A. M. (2007). Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.* **402**, 1-15.
- Tong, Y., Brandt, G. S., Li, M., Shapovalov, G., Slimko, E., Karschin, A., Dougherty, D. A. and Lester, H. A. (2001). Tyrosine decaging leads to substantial membrane trafficking during modulation of an inward rectifier potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **117**, 103-118.
- Wischmeyer, E. and Karschin, A. (1996). Receptor stimulation causes slow inhibition of IRK1 inwardly rectifying K⁺ channels by direct protein kinase A-mediated phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5819-5823.
- Wischmeyer, E., Döring, F. and Karschin, A. (1998). Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **273**, 34063-34068.

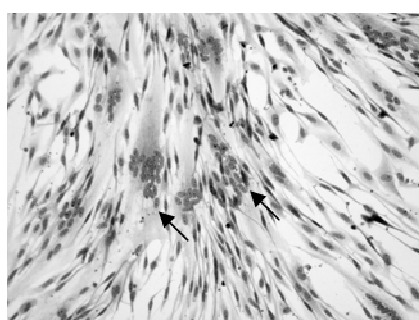
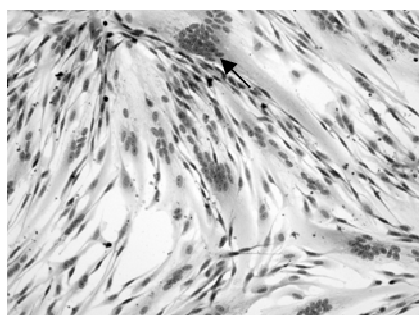
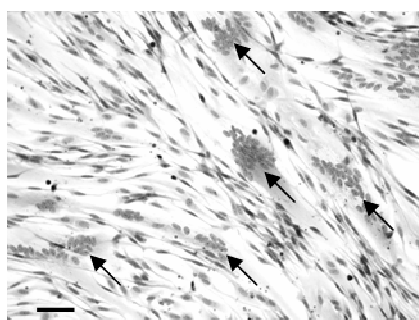
C. Résultats et discussion

1. Résultats additionnels

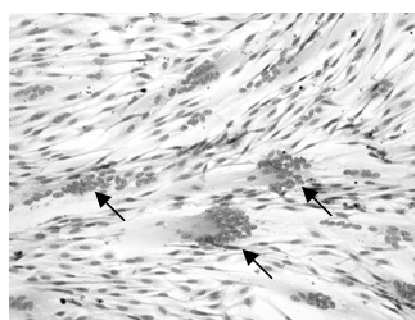
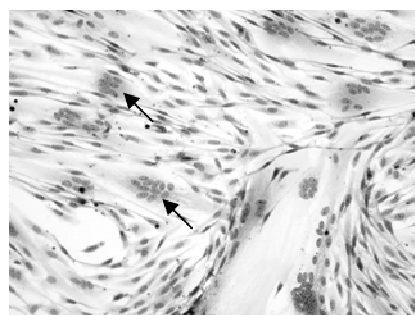
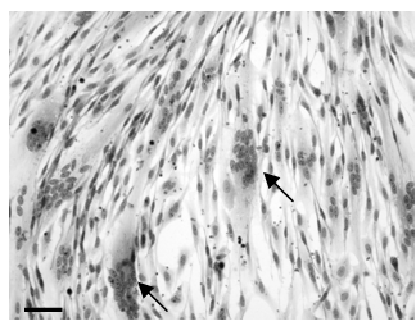
Les résultats présentés ici sont les "*datas not shown*" de l'article II à l'attention des "*reviewers*" en réponse à leurs remarques.

- Aspect morphologique des myoblastes traités à la génistéine

DM 24h with genistein 10 μ M during 4h



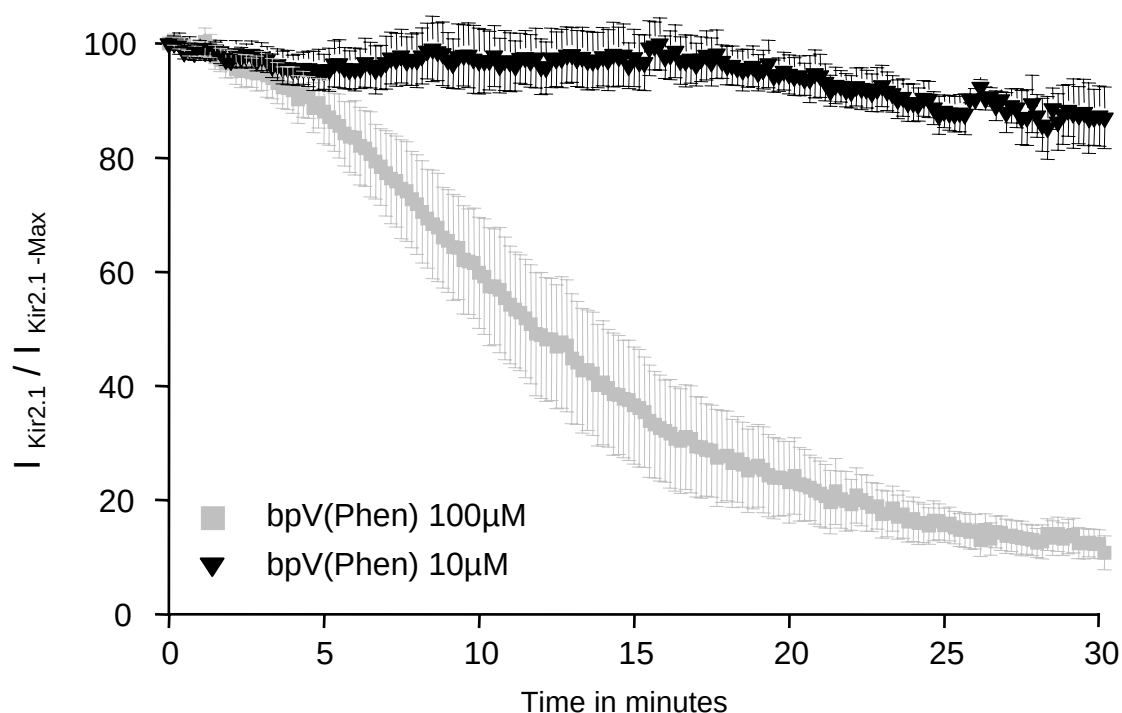
DM 28h



Les photos représentent 3 champs de myoblastes mis en DM 24h avec la génistéine pendant les 4 premières heures (remise en DM normal les 20h restantes) et 3 champs de myoblastes laissés en DM 28h.

⇒ Les myoblastes traités à la génistéine ont une morphologie identique aux myoblastes non traités ayant un index de fusion similaire.

- Effet du bpV(Phen) à 10 μ M sur le courant Kir2.1

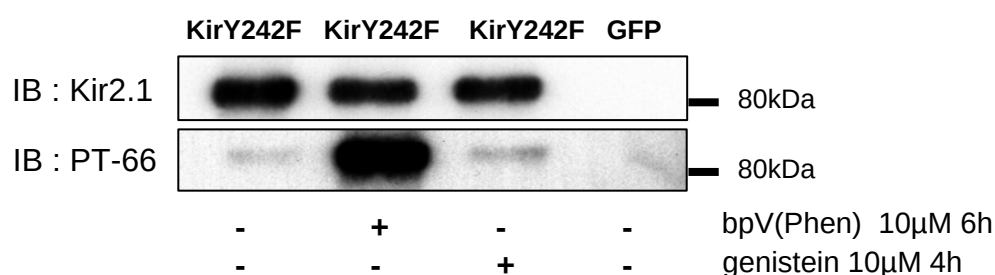


Application intracellulaire par la pipette de patch de 10 μ M ou 100 μ M de bpV(Phen) sur les canaux Kir2.1, et mesure électrophysiologique en configuration "cellule entière" du courant Kir2.1 toutes les 10 secondes pendant 30min.

⇒ Contrairement à 100 μ M de bpV(Phen), la présence de 10 μ M de bpV(Phen) ne diminue pas le courant Kir2.1. Ainsi lorsqu'on ajoute 10 μ M de bpV(Phen) sur des myoblastes en culture pendant 30min avant de les lyser (dans le but de mieux détecter l'état de phosphorylation des protéines), le courant Kir2.1 n'est pas lui-même affecté.

- **Taux de phosphorylation des canaux Kir2.1-GFP_{Y242F} après traitements.**

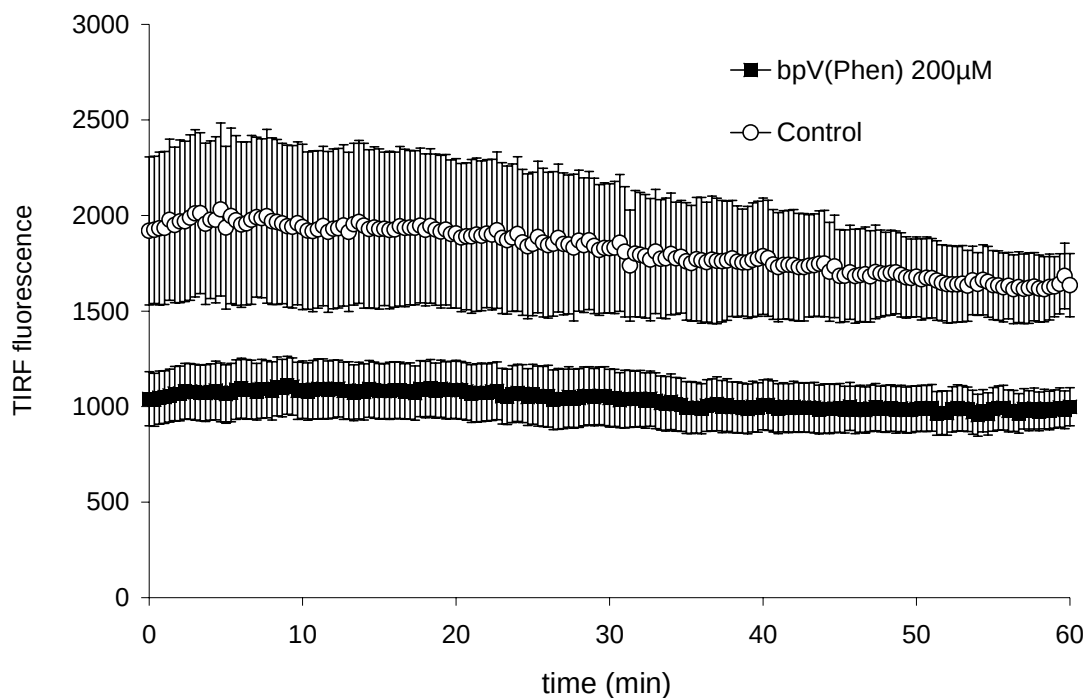
IP : Kir2.1



Des myoblastes exprimant les canaux Kir2.1-GFP_{Y242F} sont traités par 10µM de bpV(Phen) pendant 6h ou par 10µM de génistéine pendant 4h (contrôles : absence de drogues ou de canaux mutés). Les canaux Kir2.1-GFP_{Y242F} sont ensuite immunoprécipités avant d'être chargés sur un gel de SDS-PAGE et révélés par l'anticorps anti-Kir2.1 et l'anticorps anti-phosphotyrosine (PT-66).

⇒ Les canaux Kir2.1-GFP_{Y242F} sont toujours phosphorylés après traitements au bpV(Phen) malgré l'absence du site de phosphorylation en position 242. Ces résultats suggèrent que d'autres tyrosines du canal peuvent être phosphorylées.

- **Non-internalisation des canaux Kir2.1-GFP en conditions contrôles**



Des myoblastes exprimant les canaux Kir2.1-GFP sont observés par microscopie TIRF pendant 60min avec ou sans traitement de bpV(Phen).

⇒ La fluorescence des canaux Kir2.1-GFP ne diminue pas pendant l'enregistrement. L'évolution de la fluorescence en présence ou non de bpV(Phen) est comparable.

2. Discussion additionnelle

Les canaux Kir2.1 sont présents à la membrane des myoblastes en prolifération mais silencieux

Notre travail montre que l'activation des canaux Kir2.1 n'est pas due à une synthèse de canaux ni à leur transport du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. Cependant, faute d'inhibiteurs efficaces, nous n'avons pas pu évaluer directement si des canaux Kir2.1 étaient stockés dans des vésicules sous-membranaires prêtes à fusionner avec la membrane durant les premières heures de différenciation. Les seules substances connues pour bloquer ce type de processus sont des toxines, les toxines tétaniques et botuliques. Ces toxines inhibent la libération de neurotransmetteurs dans les neurones par leur action de protéolyse des molécules impliquées dans la fusion des vésicules à la membrane. Or, des tests préliminaires ont montré que ces toxines n'étaient pas internalisées dans nos cellules musculaires (résultats non publiés). C'est donc la prise en compte de tous nos résultats (pas de synthèse de canaux, ni de modulation de leur transport à la membrane, mais mise en évidence d'une inhibition directe du courant par le bpV(Phen) via la tyrosine 242 sans entraîner d'internalisation du canal) qui nous permettent d'étayer l'hypothèse de la présence des canaux à la membrane avant l'induction de la différenciation.

L'activation des canaux Kir2.1 et la fusion des myoblastes sont modulées par une activité tyrosine-kinase et tyrosine-phosphatase

L'inhibition des tyrosines phosphatases par le bpV(Phen) empêche l'activation du courant Kir2.1 et la fusion des myoblastes alors que l'inhibition des tyrosines kinases par la génistéine accélère l'activation du courant et la fusion des myoblastes. Si l'on se réfère à nos travaux précédents (Konig et al., 2004; König et al., 2006), il est logique qu'une modulation de l'activité des canaux Kir2.1 ait un effet sur la fusion des myoblastes, puisque l'hyperpolarisation due aux canaux Kir2.1 est nécessaire au processus de différenciation. Toutefois, comme toutes les substances pharmacologiques, la génistéine et le bpV(Phen) ont des effets non-spécifiques (Akiyama and Ogawara, 1991). La génistéine, par exemple, peut interagir directement avec les canaux (Niisato et al., 1999; Kusaka and Sperelakis, 1996) ou inhiber la PKC et la PKA à hautes doses (Akiyama et al., 1987). Le bpV(Phen), quant à lui, est décrit comme un activateur puissant du récepteur à l'insuline (Posner et al., 1994) et peut

agir sur le cycle cellulaire (Faure et al., 1995). Ainsi, des résultats dépendants seulement de l'utilisation de ces inhibiteurs doivent être interprétés avec précaution. De plus, un grand nombre de processus cellulaires sont dépendants des tyrosine-kinases comme la croissance cellulaire (contrôlée par les récepteurs tyrosine-kinase qui lient les facteurs de croissance), le contact cellulaire dont la fusion (contrôlée entre autres par les kinases des points d'adhésion focaux) ou l'internalisation des protéines membranaires (contrôlée par la kinase Src lors de la formation des vésicules cavéolaires).

Plusieurs expériences ont donc été réalisées pour vérifier que les inhibiteurs utilisés avaient bien un effet direct sur le canal. Nous avons d'abord montré que le bpV(Phen) augmentait le taux de phosphorylation du canal tandis que la génistéine le diminuait. Puis, nous avons confirmé que l'application de ces drogues via la pipette de patch, directement dans la cellule, modulait le courant Kir2.1. Le bpV(Phen), en particulier, diminue rapidement le courant Kir2.1 (dès la 5^{ème} minute d'application) et cet effet est, de plus, éliminé par la mutation de la tyrosine 242 du canal. Enfin, nous avons vérifié que l'inhibition du courant Kir2.1 par le bpV(Phen) n'était pas due à l'internalisation des canaux Kir2.1. L'ensemble de ces résultats nous ont donc permis d'établir que l'effet des inhibiteurs observé sur l'activation des canaux Kir2.1 était dû à une action directe sur le canal, et que l'activation des canaux Kir2.1 ainsi que la différenciation des myoblastes dépendaient d'une déphosphorylation d'une tyrosine du canal.

Activation du courant Kir2.1 par déphosphorylation de la tyrosine 242

La mutation de la tyrosine 242 en phénylalanine entraîne l'abolition de la modulation de l'activité du canal Kir2.1 par le bpV(Phen). C'est donc par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation de la tyrosine 242 que l'activité du canal est modulée. Toutefois, cette modulation n'exclut pas l'implication d'autres types de contrôles. Même si nous avons écarté l'implication possible de deux autres tyrosines dans la modulation du canal en mutant les tyrosines 336 et 366 (les tyrosines les plus susceptibles d'être phosphorylées), nous n'avons pas analysé de façon exhaustive les autres sites potentiels de modulation du canal Kir2.1, comme les sites de phosphorylation sérine/thréonine. Or, il a été décrit que l'activité du canal Kir2.1 pouvait être modulé par des phosphorylations dépendantes de la PKA et de la PKC agissant sur des sérines/thréonines (Wischmeyer and Karschin, 1996; Jones, 1996). Ainsi, le processus de déphosphorylation de la tyrosine 242 est une étape nécessaire à l'activation du canal mais peut être pas suffisante.

La déphosphorylation des canaux Kir2.1 est induite au cours de la différenciation

Enfin, nous avons démontré que le canal Kir2.1 endogène avait un taux de tyrosine-phosphorylation plus faible après 6 heures en milieu de différenciation. Cette expérience, difficile à obtenir, était indispensable à notre travail car elle nous permettait de vérifier notre hypothèse dans les conditions de différenciation normale (de nombreuses autres observations ont été effectuées sur des myoblastes surexprimant des canaux Kir2.1). Grâce à ce dernier résultat, nous pouvons donc dire que la différenciation des myoblastes humains est induite par une activation, dépendante de la déphosphorylation de la tyrosine 242, des canaux Kir2.1.

Mon travail soulève néanmoins plusieurs nouvelles questions. Quel est le signal qui enclenche la déphosphorylation des canaux Kir2.1 ? Par quelle voie de signalisation la tyrosine-phosphatase nécessaire à cette déphosphorylation s'active-t-elle ? Quelle est l'identité de cette tyrosine-phosphatase ? Quelle tyrosine-kinase maintient la phosphorylation du canal et ainsi son inactivation en prolifération ?

3. Hypothèse de travail

Pour tenter de répondre à ces questions, nous proposons le modèle suivant. Les canaux Kir2.1 sont maintenus silencieux à la surface des myoblastes par la phosphorylation de leur tyrosine 242. Cette phosphorylation implique inévitablement l'action d'une tyrosine-kinase. Puis, quelques heures après l'induction de la différenciation, les canaux Kir2.1 s'activent par déphosphorylation de leur tyrosine 242, impliquant cette fois l'action d'une tyrosine-phosphatase. Il semble donc qu'il y ait une activité tyrosine-kinase en prolifération qui disparaisse en différenciation au profit d'une activité tyrosine-phosphatase.

Durant la phase de prolifération, de nombreux facteurs de croissance (GF, figure 15) sont présents dans le milieu extracellulaire. Ces facteurs de croissance qui comprennent l'EGF, le PDGF, le FGF, l'IGF et le VEGF sont les ligands de récepteurs à tyrosine-kinase (RTK). Or, durant la phase de différenciation, la quantité de ces facteurs de croissance est diminuée afin que la différenciation s'enclenche (notre milieu de différenciation ne contient plus de sérum, source essentielle de ces facteurs). Rappelons que les milieux de prolifération et de

différenciation miment l'évolution du milieu extracellulaire *in vivo* après une lésion (cf. introduction).

Nous proposons donc que des facteurs de croissance présents en prolifération sont à l'origine de la phosphorylation de la tyrosine 242 des canaux Kir2.1 par l'activation d'une tyrosine-kinase. Le passage en différenciation éliminerait cette source d'activation tyrosine-kinase et activerait (par un mécanisme encore inconnu) une protéine tyrosine-phosphatase (PTP) permettant l'activation des canaux Kir2.1 par déphosphorylation de leur tyrosine 242 (figure 15).

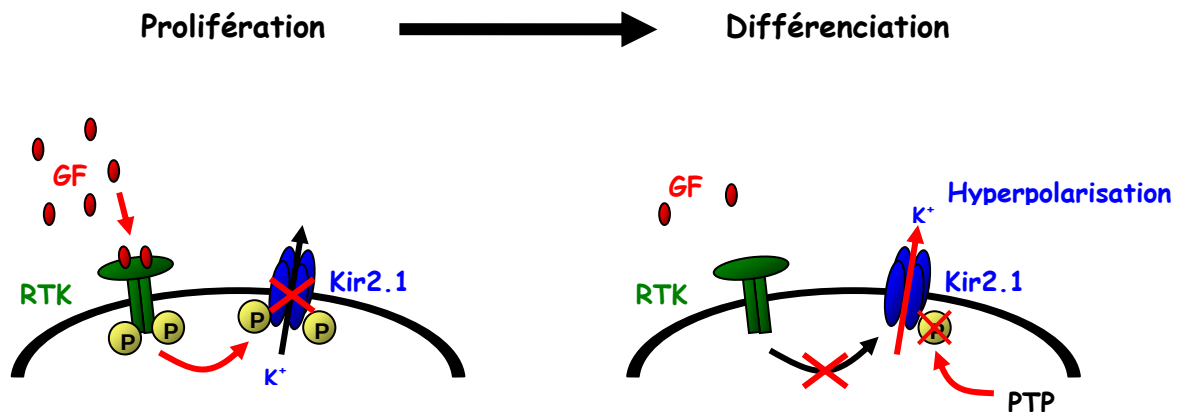


Figure 15 : Modèle proposé pour expliquer le *switch* de phosphorylation-déphosphorylation des canaux Kir2.1 au cours de la différenciation. Les facteurs de croissance, présents en prolifération se lient aux RTK. Ils maintiennent les canaux Kir2.1 dans un état inactif en les phosphorylant. Le passage en différenciation lève cette inhibition et active une PTP qui déphosphoryle les canaux Kir2.1 permettant l'hyperpolarisation des myoblastes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Après avoir observé que la différenciation des myoblastes humains nécessitait l'hyperpolarisation de leur potentiel membranaire, nous venons de montrer que cette hyperpolarisation était due à l'activation, par déphosphorylation de la tyrosine 242, de canaux Kir2.1 déjà présents à la membrane. D'un état phosphorylé et inactif, le canal Kir2.1 devient déphosphorylé et actif, quelques heures après induction de la différenciation.

L'avantage de cette modulation est qu'elle permet aux myoblastes d'être réactifs très rapidement au signal inducteur. Dès que le signal est perçu, il suffit d'un *switch* entre état de phosphorylation et état de déphosphorylation pour activer les canaux et hyperpolariser la cellule. Il semble donc que les myoblastes soient dans l'attente d'un signal pour pouvoir amorcer le processus de différenciation.

Les facteurs de croissance présents pendant la prolifération sont connus pour leurs effets positifs sur la division des myoblastes, ainsi que pour une possible inhibition de leur entrée en différenciation. La neuréguline-1, par exemple, ligand des récepteurs EGFR, induit la mitogénèse des cellules myogéniques et inhibe leur différenciation (Ford et al., 2003). D'autre part, deux études ont démontré que le canal Kir2.1 était inhibé lorsqu'il était co-exprimé avec les récepteurs à l'EGF (Wischmeyer et al., 1998; Sun et al., 2007). Il serait donc intéressant de regarder dans nos cultures de myoblastes humains si les canaux Kir2.1 sont affectés par l'activité des récepteurs EGFR (surexprimés ou endogènes).

Toutefois, la disparition des facteurs de croissance du milieu extracellulaire, diminuant l'activité tyrosine-kinase sur les canaux Kir2.1 n'est pas suffisante pour activer le canal. L'activation d'une phosphatase est indispensable pour déphosphoryler le canal. La SHP-2, une tyrosine phosphatase pourrait alors être un bon candidat, cette protéine étant décrite pour être activée en début de différenciation et être nécessaire à l'induction du processus (Kontaridis et al., 2004).

Un premier axe de recherche concernerait donc l'identification des tyrosine-kinases et tyrosine-phosphatases impliquées dans la modulation des canaux Kir2.1 et des voies de signalisation par lesquelles ces enzymes sont activées.

Par ailleurs, il est de plus en plus évident que la modulation par phosphorylation, que ce soit sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine, soit un mécanisme majeur de régulation de l'activité des canaux ioniques. La majorité des canaux ioniques, et peut-être même tous (canaux voltage-dépendant, ligand-dépendant, second messenger-dépendant et autres), sont modulés par des phosphorylations (Davis et al., 2001). Cette observation n'est pas surprenante quand on sait que la phosphorylation des protéines joue un rôle central dans un grand nombre de processus cellulaire, métabolique et signalétique.

Actuellement, notre travail ne permet pas d'expliquer par quel mécanisme la phosphorylation module l'activité des canaux Kir2.1. De nombreuses études ont montrés que la phosphorylation d'un canal pouvait moduler son activité par divers mécanismes. D'abord, la phosphorylation peut modifier le niveau de désensibilisation du canal. Par exemple, la tyrosine-phosphorylation du récepteur nicotinique augmente la cinétique de la phase rapide de désensibilisation du canal (Hopfield et al., 1988). D'autre part, il a été décrit qu'une phosphorylation pouvait entraîner un déplacement du potentiel d'activation des canaux. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 1928 des canaux calciques de type-L augmente leur courant en déplaçant le potentiel d'activation du canal vers des potentiels plus négatifs (Gao et al., 1997). Enfin, la phosphorylation peut moduler l'activité d'un canal en modifiant ses cinétiques d'activation et d'inactivation. C'est le cas du canal Kv1.3 qui est inhibé à 95% lorsqu'il est phosphorylé par la kinase v-src sur ses tyrosines 137/449 (Holmes et al., 1996). Un second axe de recherche consisterait donc à analyser plus précisément les conséquences de la phosphorylation de la tyrosine 242 sur les propriétés biophysiques du canal Kir2.1.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance :

- Au Professeur *Laurent Bernheim* pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, conseillé et formé tout au long de ma thèse ainsi que pour sa qualité d'écoute.
- Aux Professeurs *Charles Bader* et *Dominique Belin* ainsi qu'au Docteur *Eliane Tribollet* pour leurs conseils avisés et leur soutien.
- Aux Professeurs *Serge Charpak* et *Jean-Claude Martinou* pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier également :

- Les Docteurs *Serge Arnaudeau*, *Stéphane Konig* et *Thomas Laumonier* pour leurs enseignements scientifiques et leurs critiques constructives.
- *Pierre Brawand*, *Patrick Teta*, *Marina Berti*, *Catia Pomponio* et *Christelle Viglino* pour leurs excellences techniques et leur bonne humeur.
- Les Docteurs *Marlène Michel*, *Nicolas Holzer*, *Ron Hogg*, *Laure Gurcel*, *Marzia Lecchi*, et *Philippe Baumann* (ainsi que sa cousine), sans oublier *Anne Béguet*, *Basile Darbellay* et *Marina Leroy* pour leur présence, leur amitié et leur aide précieuse.

Enfin, je n'aurais certainement pas pu aller au bout de ce travail sans le soutien inconditionnel de ma famille.

REFERENCES

- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y.** (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**, 5592-5.
- Akiyama, T. and Ogawara, H.** (1991). Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol* **201**, 362-70.
- Allen, R. E. and Boxhorn, L. K.** (1989). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* **138**, 311-5.
- Andres, V. and Walsh, K.** (1996). Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol* **132**, 657-66.
- Arnaudeau, S., Holzer, N., Konig, S., Bader, C. R. and Bernheim, L.** (2006). Calcium sources used by post-natal human myoblasts during initial differentiation. *J Cell Physiol* **208**, 435-45.
- Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A. and Rudnicki, M. A.** (2002). Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* **159**, 123-34.
- Ashen, M. D., O'Rourke, B., Kluge, K. A., Johns, D. C. and Tomaselli, G. F.** (1995). Inward rectifier K⁺ channel from human heart and brain: cloning and stable expression in a human cell line. *Am J Physiol* **268**, H506-11.
- Barash, I. A., Mathew, L., Ryan, A. F., Chen, J. and Lieber, R. L.** (2004). Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C355-64.
- Baroffio, A., Hamann, M., Bernheim, L., Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G. and Bader, C. R.** (1996). Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* **60**, 47-57.
- Bassel-Duby, R. and Olson, E. N.** (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* **75**, 19-37.
- Becker, C., Della Gaspera, B., Guyot, M., Donsez, E., Armand, A. S., Charbonnier, F., Launay, T. and Chanoine, C.** (2003). Expression of MRF4 protein in adult and in regenerating muscles in *Xenopus*. *Dev Dyn* **227**, 445-9.
- Bernheim, L., Liu, J. H., Hamann, M., Haenggeli, C. A., Fischer-Lougheed, J. and Bader, C. R.** (1996). Contribution of a non-inactivating potassium current to the resting membrane potential of fusion-competent human myoblasts. *J Physiol* **493** (Pt 1), 129-41.
- Bijlenga, P., Liu, J. H., Espinos, E., Haenggeli, C. A., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R. and Bernheim, L.** (2000). T-type alpha 1H Ca²⁺ channels are involved in Ca²⁺ signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7627-32.
- Black, B. L., Molkentin, J. D. and Olson, E. N.** (1998). Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol Cell Biol* **18**, 69-77.
- Black, B. L. and Olson, E. N.** (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 167-96.
- Cantini, M. and Carraro, U.** (1995). Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 121-8.

- Charge, S. B. and Rudnicki, M. A.** (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209-38.
- Conboy, I. M. and Rando, T. A.** (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* **3**, 397-409.
- Constantin, B., Cognard, C. and Raymond, G.** (1996). Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels. *Cell Calcium* **19**, 365-74.
- Cooper, E.** (2001). A new role for ion channels in myoblast fusion. *J Cell Biol* **153**, F9-12.
- Cooper, R. N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M. and Butler-Browne, G. S.** (1999). In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* **112** (Pt 17), 2895-901.
- Corbel, S. Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T. R., Blau, H. M. and Rossi, F. M.** (2003). Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med* **9**, 1528-32.
- Cornelison, D. D., Wilcox-Adelman, S. A., Goetinck, P. F., Rauvala, H., Rapraeger, A. C. and Olwin, B. B.** (2004). Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev* **18**, 2231-6.
- David, J. D., See, W. M. and Higginbotham, C. A.** (1981). Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: role of calcium influx preceding membrane union. *Dev Biol* **82**, 297-307.
- Davis M. J., Wu X., Nurkiewicz T. R., Kawasaki J., Gui P., Hill M. A., Wilson E.** (2001) Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **281**(5), H1835-62.
- Davis, R. L., Cheng, P. F., Lassar, A. B. and Weintraub, H.** (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* **60**, 733-46.
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- De Angelis L., Berghella L., Coletta M., Lattanzi L., Zanchi M., Cusella-De Angelis M. G., Ponzetto C., Cossu G.** (1999) Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* **147** (4), 869-78.
- Delling, U., Tureckova, J., Lim, H. W., De Windt, L. J., Rotwein, P. and Molkentin, J. D.** (2000). A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol* **20**, 6600-11.
- Doumit, M. E., Cook, D. R. and Merkel, R. A.** (1993). Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells. *J Cell Physiol* **157**, 326-32.
- Edwall, D., Schalling, M., Jennische, E. and Norstedt, G.** (1989). Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinology* **124**, 820-5.
- Emerson, C. P., Jr.** (1993). Skeletal myogenesis: genetics and embryology to the fore. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 265-74.
- Espinos, E., Liu, J. H., Bader, C. R. and Bernheim, L.** (2001). Efficient non-viral DNA-mediated gene transfer to human primary myoblasts using electroporation. *Neuromuscul Disord* **11**, 341-9.
- Faure, R., Vincent, M., Dufour, M., Shaver, A. and Posner, B. I.** (1995). Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *J Cell Biochem* **59**, 389-401.
- Fischer-Lougheed, J., Liu, J. H., Espinos, E., Mordasini, D., Bader, C. R., Belin, D. and Bernheim, L.** (2001). Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. *J Cell Biol* **153**, 677-86.

- Friday, B. B., Horsley, V. and Pavlath, G. K.** (2000). Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol* **149**, 657-66.
- Friday, B. B., Mitchell, P. O., Kegley, K. M. and Pavlath, G. K.** (2003). Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation* **71**, 217-27.
- Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M. L., Sako, H., Green, S. A., Dascal, N., Scott, J. D. and Hosey, M. M.** (1997). cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron* **19**, 185-96.
- Gayraud-Morel, B., Chretien, F., Flamant, P., Gomes, D., Zammit, P. S. and Tajbakhsh, S.** (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol* **312**, 13-28.
- Giovannardi, S., Forlani, G., Balestrini, M., Bossi, E., Tonini, R., Sturani, E., Peres, A. and Zippel, R.** (2002). Modulation of the inward rectifier potassium channel IRK1 by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* **277**, 12158-63.
- Gossett, L. A., Kelvin, D. J., Sternberg, E. A. and Olson, E. N.** (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* **9**, 5022-33.
- Grishin, A., Li, H., Levitan, E. S. and Zaks-Makhina, E.** (2006). Identification of gamma-aminobutyric acid receptor-interacting factor 1 (TRAK2) as a trafficking factor for the K^{+} channel Kir2.1. *J Biol Chem* **281**, 30104-11.
- Gussoni, E., Blau, H. M. and Kunkel, L. M.** (1997). The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* **3**, 970-7.
- Haberland, M., Arnold, M. A., McAnally, J., Phan, D., Kim, Y. and Olson, E. N.** (2007). Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation. *Mol Cell Biol* **27**, 518-25.
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth FJ.** (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391(2)**, 85-100.
- Hawke, T. J. and Garry, D. J.** (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* **91**, 534-51.
- Hawke, T. J., Jiang, N. and Garry, D. J.** (2003). Absence of p21CIP rescues myogenic progenitor cell proliferative and regenerative capacity in Foxk1 null mice. *J Biol Chem* **278**, 4015-20.
- Hinard V., Belin D., Konig S., Bader C. R., Bernheim L.** (2008) Initiation of human myoblast differentiation via dephosphorylation of Kir2.1 K^{+} channels at tyrosine 242. *Development* **135**, 859-867.
- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F.** (1952). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**, 473-96.
- Holmes, T. C., Fadool, D. A. and Levitan, I. B.** (1996). Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel. *J Neurosci* **16**, 1581-90.
- Hopfield, J. F., Tank, D. W., Greengard, P. and Huganir, R. L.** (1988). Functional modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation. *Nature* **336**, 677-80.
- Horikawa, M., Higashiyama, S., Nomura, S., Kitamura, Y., Ishikawa, M. and Taniguchi, N.** (1999). Upregulation of endogenous heparin-binding EGF-like growth factor and its role as a survival factor in skeletal myotubes. *FEBS Lett* **459**, 100-4.
- Ishii, K., Yamagishi, T. and Taira, N.** (1994). Cloning and functional expression of a cardiac inward rectifier K^{+} channel. *FEBS Lett* **338**, 107-11.

- Jones, S. V.** (1996). Modulation of the inwardly rectifying potassium channel IRK1 by the m1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **49**, 662-7.
- Jones, S. V.** (2003). Role of the small GTPase Rho in modulation of the inwardly rectifying potassium channel Kir2.1. *Mol Pharmacol* **64**, 987-93.
- Kakulas, B. A.** (1997). Problems and potential for gene therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **7**, 319-24.
- Karpati, G., Carpenter, S., Morris, G. E., Davies, K. E., Guerin, C. and Holland, P.** (1993). Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 119-28.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V. and Tajbakhsh, S.** (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* **431**, 466-71.
- Katz, R. L. and Eakins, K. E.** (1969). The actions of neuromuscular blocking agents on extraocular muscle and intraocular pressure. *Proc R Soc Med* **62**, 1217-20.
- Keren, A., Tamir, Y. and Bengal, E.** (2006). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol Cell Endocrinol* **252**, 224-30.
- Keren-Raifman, T., Ivanina, T., Bismuth, Y. and Dascal, N.** (2000). Expression cloning of KCRF, a potassium channel regulatory factor. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 852-8.
- Kitamura, T., Kitamura, Y. I., Funahashi, Y., Shawber, C. J., Castrillon, D. H., Kollipara, R., DePinho, R. A., Kitajewski, J. and Accili, D.** (2007). A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest* **117**, 2477-85.
- Kitzmann, M. and Fernandez, A.** (2001). Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci* **58**, 571-9.
- Knapp, J. R., Davie, J. K., Myer, A., Meadows, E., Olson, E. N. and Klein, W. H.** (2006). Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development* **133**, 601-10.
- Konig, S., Beguet, A., Bader, C. R. and Bernheim, L.** (2006). The calcineurin pathway links hyperpolarization (Kir2.1)-induced Ca^{2+} signals to human myoblast differentiation and fusion. *Development* **133**, 3107-14.
- Konig, S., Hinard, V., Arnaudeau, S., Holzer, N., Potter, G., Bader, C. R. and Bernheim, L.** (2004). Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. *J Biol Chem* **279**, 28187-96.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-33.
- Kurata, H. T., Cheng, W. W., Arrabit, C., Slesinger, P. A. and Nichols, C. G.** (2007). The role of the cytoplasmic pore in inward rectification of kir2.1 channels. *J Gen Physiol* **130**, 145-55.
- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H. and Honjo, T.** (1999). Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* **274**, 7238-44.
- Kusaka, M. and Sperelakis, N.** (1996). Genistein inhibition of fast Na^{+} current in uterine leiomyosarcoma cells is independent of tyrosine kinase inhibition. *Biochim Biophys Acta* **1278**, 1-4.
- Kwak, K. B., Chung, S. S., Kim, O. M., Kang, M. S., Ha, D. B. and Chung, C. H.** (1993). Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1175**, 243-9.
- LaBarge, M. A. and Blau, H. M.** (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**, 589-601.

- Lassar, A. and Munsterberg, A.** (1994). Wiring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 432-42.
- Le Gros Clark W. E.** (1946) The regeneration of mammalian striped muscle. *Journal of Anatomy* **80**, 24-41.
- Le Moigne, A., Martelly, I., Barlovatz-Meimon, G., Franquinet, R., Aamiri, A., Frisdal, E., Bassaglia, Y., Moraczewski, G. and Gautron, J.** (1990). Characterization of myogenesis from adult satellite cells cultured in vitro. *Int J Dev Biol* **34**, 171-80.
- Leonoudakis, D., Conti, L. R., Anderson, S., Radeke, C. M., McGuire, L. M., Adams, M. E., Froehner, S. C., Yates, J. R., 3rd and Vandenberg, C. A.** (2004). Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* **279**, 22331-46.
- Leyland, M. L. and Dart, C.** (2004). An alternatively spliced isoform of PSD-93/chapsyn 110 binds to the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J Biol Chem* **279**, 43427-36.
- Liu, J. H., Bijlenga, P., Fischer-Lougheed, J., Occhiodoro, T., Kaelin, A., Bader, C. R. and Bernheim, L.** (1998). Role of an inward rectifier K⁺ current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J Physiol* **510** (Pt 2), 467-76.
- Lluis, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M. and Munoz-Canoves, P.** (2005). E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *Embo J* **24**, 974-84.
- Lognonne, J. L. and Wahrmann, J. P.** (1986). Spontaneous myoblast fusion is mediated by cell surface Ca²⁺-dependent protein kinase(s). *Exp Cell Res* **166**, 340-56.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N. and Nichols, C. G.** (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**, 366-9.
- Lopatin, A. N. and Nichols, C. G.** (2001). Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J Mol Cell Cardiol* **33**, 625-38.
- Lopes, C. M., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J. and Logothetis, D. E.** (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* **34**, 933-44.
- Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L. and Olson, E. N.** (2000). Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4070-5.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-9.
- MacIntyre, D. L., Sorichter, S., Mair, J., Berg, A. and McKenzie, D. C.** (2001). Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* **84**, 180-6.
- Matsuda, H. and Stanfield, P. R.** (1989). Single inwardly rectifying potassium channels in cultured muscle cells from rat and mouse. *J Physiol* **414**, 111-24.
- Mauro, A.** (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493-5.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. and Olson, E. N.** (2000a). Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106-11.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L. and Olson, E. N.** (2000b). Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14400-5.
- Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E. and Rudnicki, M. A.** (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* **10**, 1173-83.

- Mi, H., Deerinck, T. J., Jones, M., Ellisman, M. H. and Schwarz, T. L.** (1996). Inwardly rectifying K⁺ channels that may participate in K⁺ buffering are localized in microvilli of Schwann cells. *J Neurosci* **16**, 2421-9.
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F. and Olson, E. N.** (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**, 1125-36.
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F. and Olson, E. N.** (1996). Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. *Mol Cell Biol* **16**, 2627-36.
- Morgan, J. E. and Partridge, T. A.** (2003). Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1151-6.
- Mu, X., Brown, L. D., Liu, Y. and Schneider, M. F.** (2007). Roles of the calcineurin and CaMK signaling pathways in fast-to-slow fiber type transformation of cultured adult mouse skeletal muscle fibers. *Physiol Genomics* **30**, 300-12.
- Musaro, A. and Rosenthal, N.** (1999). Maturation of the myogenic program is induced by postmitotic expression of insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* **19**, 3115-24.
- Mutai, H., Kenyon, L. C., Locke, E., Kikuchi, N. and Oberholtzer, J. C.** (2004). Characterization of the chicken inward rectifier K⁺ channel IRK1/Kir2.1 gene. *BMC Genomics* **5**, 90.
- Neher, E. and Sakmann, B.** (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Neusch, C., Weishaupt, J. H. and Bahr, M.** (2003). Kir channels in the CNS: emerging new roles and implications for neurological diseases. *Cell Tissue Res* **311**, 131-8.
- Nguyen, H. X. and Tidball, J. G.** (2003a). Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *J Physiol* **550**, 347-56.
- Nguyen, H. X. and Tidball, J. G.** (2003b). Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol* **547**, 125-32.
- Nichols, C. G. and Lopatin, A. N.** (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 171-91.
- Niisato, N., Ito, Y. and Marunaka, Y.** (1999). Activation of Cl⁻ channel and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in renal epithelial A6 cells by flavonoids: genistein, daidzein, and apigenin. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 368-71.
- Ohkawa, Y., Yoshimura, S., Higashi, C., Marfella, C. G., Dacwag, C. S., Tachibana, T. and Imbalzano, A. N.** (2007). Myogenin and the SWI/SNF ATPase Brg1 maintain myogenic gene expression at different stages of skeletal myogenesis. *J Biol Chem* **282**, 6564-70.
- Olson, E. N.** (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev* **4**, 1454-61.
- Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P. and Kunkel, L. M.** (1989). Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* **337**, 176-9.
- Péault B., Rudnicki M., Torrente Y., Cossu G., Tremblay J. P., Partridge T., Gussoni E., Kunkel L. M., Huard J.** (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* **15**(5), 867-77.
- Pegan, S., Arrabit, C., Zhou, W., Kwiatkowski, W., Collins, A., Slesinger, P. A. and Choe, S.** (2005). Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* **8**, 279-87.
- Penn, B. H., Bergstrom, D. A., Dilworth, F. J., Bengal, E. and Tapscott, S. J.** (2004). A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* **18**, 2348-53.

- Posner, B. I., Faure, R., Burgess, J. W., Bevan, A. P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Fantus, I. G., Ng, J. B., Hall, D. A., Lum, B. S. et al.** (1994). Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem* **269**, 4596-604.
- Potthoff, M. J. and Olson, E. N.** (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* **134**, 4131-40.
- Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y. et al.** (1997). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* **1**, 35-45.
- Raab-Graham, K. F., Radeke, C. M. and Vandenberg, C. A.** (1994). Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport* **5**, 2501-5.
- Rao, A., Luo, C. and Hogan, P. G.** (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-47.
- Redell, J. B. and Tempel, B. L.** (1998). Multiple promoter elements interact to control the transcription of the potassium channel gene, KCNJ2. *J Biol Chem* **273**, 22807-18.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A. and Buckingham, M.** (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* **172**, 91-102.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Jin, T., Ramdya, P. P., Molnar, Z. and Logothetis, D. E.** (2003). Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 745-50.
- Rossignol, T. M. and Jones, S. V.** (2005). Regulation of a family of inwardly rectifying potassium channels (Kir2) by the m1 muscarinic receptor and the small GTPase Rho. *Pflugers Arch*, 1-11.
- Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A. and Rudnicki, M. A.** (1999) Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell. Biol.* **144**(4), 631-43.
- Sabourin, L. A. and Rudnicki, M. A.** (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* **57**, 16-25.
- Sampson, L. J., Leyland, M. L. and Dart, C.** (2003). Direct interaction between the actin-binding protein filamin-A and the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J Biol Chem* **278**, 41988-97.
- Schmalbruch, H. and Lewis, D. M.** (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* **23**, 617-26.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M. A.** (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777-86.
- Sejersted, O. M. and Sjogaard, G.** (2000). Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* **80**, 1411-81.
- Shainberg A., Yagil G., Yaffe D.** (1969) Control of myogenesis in vitro by Ca²⁺ concentration in nutritional medium. *Exp Cell Res* **58**(1), 163-7.
- Sheehan, S. M. and Allen, R. E.** (1999). Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol* **181**, 499-506.
- Shi, X. and Garry, D. J.** (2006). Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* **20**, 1692-708.
- Shin, K. S., Park, J. Y., Kwon, H., Chung, C. H. and Kang, M. S.** (1997). A possible role of inwardly rectifying K⁺ channels in chick myoblast differentiation. *Am J Physiol* **272**, C894-900.

- Soom, M., Schonherr, R., Kubo, Y., Kirsch, C., Klinger, R. and Heinemann, S. H.** (2001). Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett* **490**, 49-53.
- Stockklauser, C. and Klocker, N.** (2003). Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *J Biol Chem* **278**, 17000-5.
- Stockklauser, C., Ludwig, J., Ruppertsberg, J. P. and Klocker, N.** (2001). A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. *FEBS Lett* **493**, 129-33.
- Tamir, Y. and Bengal, E.** (2000). Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. *J Biol Chem* **275**, 34424-32.
- Tang, W., Qin, C. L. and Yang, X. C.** (1995). Cloning, localization, and functional expression of a human brain inward rectifier potassium channel (hIRK1). *Receptors Channels* **3**, 175-83.
- Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O. and Allen, R. E.** (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* **194**, 114-28.
- Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E. and Allen, R. E.** (2002). Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* **13**, 2909-18.
- Tidball, J. G.** (1995). Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* **27**, 1022-32.
- Tidball, J. G.** (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R345-53.
- Tremblay, J. P., Bouchard, J. P., Malouin, F., Theau, D., Cottrell, F., Collin, H., Rouche, A., Gilgenkrantz, S., Abbadi, N., Tremblay, M. et al.** (1993). Myoblast transplantation between monozygotic twin girl carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **3**, 583-92.
- Vandenberg, C. A.** (1987). Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2560-4.
- Wagers, A. J. and Conboy, I. M.** (2005). Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* **122**, 659-67.
- Webster, C. and Blau, H. M.** (1990). Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet* **16**, 557-65.
- Widmer, H., Hamann, M., Baroffio, A., Bijlenga, P. and Bader, C. R.** (1995). Expression of a voltage-dependent potassium current precedes fusion of human muscle satellite cells (myoblasts). *J Cell Physiol* **162**, 52-63.
- Wischmeyer, E., Doring, F. and Karschin, A.** (1998). Acute suppression of inwardly rectifying Kir2.1 channels by direct tyrosine kinase phosphorylation. *J Biol Chem* **273**, 34063-8.
- Wischmeyer, E. and Karschin, A.** (1996). Receptor stimulation causes slow inhibition of IRK1 inwardly rectifying K⁺ channels by direct protein kinase A-mediated phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5819-23.
- Wright, W. E.** (1992). Muscle basic helix-loop-helix proteins and the regulation of myogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 243-8.
- Wu, Z., Woodring, P. J., Bhakta, K. S., Tamura, K., Wen, F., Feramisco, J. R., Karin, M., Wang, J. Y. and Puri, P. L.** (2000). p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol* **20**, 3951-64.
- Xu, Q., Yu, L., Liu, L., Cheung, C. F., Li, X., Yee, S. P., Yang, X. J. and Wu, Z.** (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase-, calcium-calmodulin-dependent protein kinase-, and

- calcineurin-mediated signaling pathways transcriptionally regulate myogenin expression. *Mol Biol Cell* **13**, 1940-52.
- Yablonka-Reuveni, Z. and Anderson, J. E.** (2006). Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Dev Dyn* **235**, 203-12.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K. and Nabeshima, Y.** (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* **111 (Pt 6)**, 769-79.
- Yu, Y. T., Breitbart, R. E., Smoot, L. B., Lee, Y., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B.** (1992). Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* **6**, 1783-98.
- Zhou, Z. and Bornemann, A.** (2001). MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **22**, 311-6.