

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté n°524

Secteur de Recherche : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par

Charlotte Lorin

Altérations architecturales et fonctionnelles des éléments du couplage excitation-contraction des cardiomyocytes murins déficients en dystrophine

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

Soutenue le 2 Décembre 2011
Devant la Commission d'Examen

JURY

J-P. PENNEC	Maître de Conférences, Université de Brest	Rapporteur
S. RICHARD	Directeur de Recherche au CNRS, Université de Montpellier	Rapporteur
E. NIGGLI	Professeur, Université de Berne, Suisse	Examineur
J. GORELIK	Professeur, Imperial College de Londres, Royaume-Uni	Examineur
J-F. FAIVRE	Professeur des Universités, Université de Poitiers	Examineur
S. SEBILLE	Maître de Conférences, Université de Poitiers	Examineur
C. COGNARD	Directeur de Recherche au CNRS, Université de Poitiers	Examineur

À Janine et Georges Cochetoux,

Mes grands-parents

Remerciements

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires (IPBC, UMR 6187) dirigé par le Dr. Frédéric Becq, dans l'équipe « Physiopathologie et Pharmacologie des Canaux Ioniques » dirigée par le Dr. Christian Cognard.

Je remercie le Dr. Frédéric Becq de m'avoir accueillie au sein de l'UMR CNRS 6187. Je souhaite le remercier également pour sa gentillesse et le cadre agréable qu'il a su faire régner au sein de l'UMR.

Je remercie tout d'abord le Dr. Jean-Pierre Pennec et le Dr. Sylvain Richard d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. J'associe à ces remerciements le Pr. Ernst Niggli, le Dr. Julia Gorelik et le Pr. Jean-François Faivre pour avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Je remercie le Dr. Christian Cognard pour son accueil au sein de l'équipe, pour sa confiance, ses nombreux conseils scientifiques, et son soutien tout au long de ma thèse. Votre œil de lynx m'a permis d'apprendre à aligner parfaitement tous les éléments d'une figure, et j'avoue, il m'a rendu un peu maniaque ! Je n'oublierai jamais votre humour qui a permis d'entretenir la bonne humeur dans l'équipe et qui a rendu les pauses thés encore plus agréables.

Je tiens également à remercier le Dr. Stéphane Seville. Merci pour votre encadrement, votre confiance, vos encouragements, votre enthousiasme, votre bonne humeur, votre aide et votre passion. Vous avez toujours su trouver les mots pour me rassurer dans les moments de doutes. Votre optimisme sans faille fut un exemple et je tâcherai de toujours m'en inspirer dans mes futurs travaux de recherche, mais aussi lors d'enseignements, et durant les congrès. *“Schließlich, danke für all die angenehmen Momente in Berlin verbracht. Ich genoss diese Stadt zu besuchen mit Ihnen und Fabienne!”*

Je souhaite également remercier l'ensemble de l'équipe PPCI et plus particulièrement :

Le Dr. Patrick Bois. Vous m'avez donné ma chance il y a 5 ans, en m'acceptant en stage pour le Master 1. Vous avez renouvelé l'expérience en Master 2. Vous m'avez transmis votre passion pour la recherche, et plus particulièrement pour l'électrophysiologie. Vous avez contribué à développer mon esprit scientifique, ma curiosité et ma ténacité. Vous m'avez

confrontée à de nombreux défis techniques et biologiques que j'ai tenté de surmonter au mieux. Vous m'avez appris à ne pas me décourager, à aller chercher les solutions aux problèmes là où elles se trouvent et à être indépendante. Enfin, vous m'avez toujours soutenue et toujours cru en moi. Je sais que c'est grâce à vous que mes chances pour obtenir cette thèse furent augmentées. Merci simplement pour tout.

Le Dr. Jean-François Faivre. Votre confiance en moi, votre soutien, vos encouragements, votre disponibilité, vos conseils précieux, votre gentillesse et votre humour furent des éléments qui ont sans conteste contribué à réaliser ce travail. Ils ont également participé au développement de mes compétences scientifiques et humaines. Vous me manquerez, et promis un jour je gagnerai aux fléchettes !!!

Le Dr. Thierry Ferreira pour son humour, sa gentillesse et ses encouragements. Merci aux Drs. Clarisse Vandebrouck et Caroline Norez pour leur soutien. Vos encouragements pour les manip, et les différentes présentations que j'ai réalisées m'ont beaucoup touchée. Plus particulièrement je tiens à remercier Clarisse : tu m'as donné cette proposition de post-doc à laquelle j'ai candidaté et ça a marché !

Le Dr. Anne Cantereau. Merci de m'avoir formée aux différentes techniques de microscopie, et pour tous les conseils que tu m'as donnés.

Le Dr. Thomas Harnois. Merci pour ta bonne humeur, ton enthousiasme, et pour ton soutien.

Je tiens à remercier les Drs. Aurélien Chatelier et Jocelyn Bescond. Merci pour vos encouragements, votre gentillesse, vos conseils, et votre soutien

Merci aux étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer durant mon doctorat. Ces expériences m'ont appris beaucoup sur la fonction d'enseigner et la responsabilité qu'est de transmettre ses connaissances.

Je tiens à remercier tous les techniciens, Christophe pour tes encouragements, Claudine pour ton aide, Elise pour ta personnalité bien trempée qui m'a changé les idées, Mathilde pour ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne, Nathalie pour ta gentillesse et Françoise Mazin, partie à la retraite maintenant, pour ton aide et pour toutes nos conversations littéraires partagées aux pauses cigarettes.

Mais je tiens à remercier plus particulièrement Sandra. Tu es une personne incroyable. Ta personnalité hors du commun apporte une vraie bouffée d'oxygène dans les moments les plus difficiles de la thèse. Tu m'as fait énormément rire, et tes compétences professionnelles ont été d'une aide précieuse. Ne change pas, tes plus grandes qualités sont ton originalité et ta gentillesse.

Merci aux anciens doctorants que j'ai croisés durant mes premières années de thèse : Hamid qui m'a formée, Najete au caractère si optimiste et passionné, Lulu toujours prête à donner des conseils précieux mais la plus ronchonchon des ronchonchons que j'ai connue mais ça fait partie de ton charme !!

Merci à toi Johanna pour tous les bons moments que l'on a partagé, ainsi que pour tes bons conseils et pour ton soutien !! Je te souhaite le meilleur. Merci à maman Laurie-Anne ou « tati imouche » pour tes encouragements, ton rire communicatif qu'il faut absolument que j'enregistre !!!! Merci de m'avoir protégée du soleil par ton harcèlement pour mettre de la crème solaire !! Courage pour ta thèse, reste aussi passionnée et tout se passera très bien, j'ai confiance. Merci à Rania pour ton dynamisme, ton franc parlé, et notre entraide en ces temps économiques difficiles !!! Courage pour ta thèse, le travail paye toujours !! Merci à Tristan, mais allez faut s'y mettre maintenant à la rédaction !!! (Mais je sais que tu vas y arriver !!).

Je tiens à remercier les PAPs : Matthieu, Kokette, Coco, Goudie, Do, Sophie, Titou !! Vous êtes des gens incroyables !!

Coco, je t'avais promis une spéciale dédicace !!! J'ai vraiment aimé nos moments sportifs où j'avoue j'ai bien ri. Tes petites chorégraphies à chaque mouvement loupé étaient géniales !!

Do, courage pour la suite, il faut y croire !!!

Goudie (Auréli Mercier), merci pour ton soutien, ta gentillesse et tes conseils. Je te souhaite tout le bonheur du monde à toi et à ta famille !

Titou, mon cher Titou !! Merci pour ces soirées géniales passées ensemble, pour ton soutien, et tout simplement pour ton amitié !

Matthieu, on a partagé un bureau durant nos deux stages de M1 et M2. On a passé beaucoup de soirées ensemble, à rire, à se parler, à se confier. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi, et d'avoir cru en moi. Tu sais ce que tu représentes pour moi, un véritable ami et donc tu pourras toujours compter sur moi !! Bientôt ça sera ton tour de soutenir et bien sûr je serai là pour t'encourager!

En tout cas, tous les PAPs ont constitué une super promo ! Toutes nos soirées vont me manquer !! Mais je sais que ce n'est finalement que le commencement, que nos retrouvailles seront plus belles encore ! Je vous aime Tous !!!!

Merci à Tata Chocolat, pour s'être si bien occupée de mon chat durant mon congrès à Berlin. Je n'oublie pas de te féliciter aussi pour tous tes penses bêtes très ingénieux qui m'ont permis de me souvenir qu'une chaise s'appelle une « chaise » !! Merci à Patty, pour nos nombreuses conversations Facebook où tu m'as encouragée et soutenue. Tu m'as fait

beaucoup rire et tu m'as remotivée à des moments où c'était difficile : tu es quelqu'un de bien sois en sur !!!

Je tiens à remercier mes amis Line et Adrien. Notre rencontre fut pour moi l'une des meilleures choses qui me soit arrivée. Vous étiez là aux moments où j'en avais le plus besoin, dans la peine et la joie.....Ma Line, sache que tous tes conseils, (dis à ta manière.... Et on se comprend !) je ne les oublierai jamais !!! Tu es une amie, une vraie, avec sa mauvaise humeur, sa dureté, son mauvais caractère, mais aussi son cœur d'or. On sait bien que tout ça est révélateur d'une grande sensibilité !! Je n'ai pas assez de mots pour vous dire merci à vous Line et Adrien, vous serez toujours dans mon cœur.

Merci à toi Anne-Claire. Tu m'as accueillie à Londres pour mon séjour d'un mois, on a passé des moments inoubliables ! On se connaît depuis l'enfance et notre complicité est toujours aussi grande !! Je t'attends bien sûr à Berne pour découvrir la Suisse.

Merci à ma tante Brigitte et ma cousine Faustine. Brigitte tu as toujours été disponible pour m'accueillir chez toi quand j'en avais besoin. Je te remercie pour ta disponibilité et ton dynamisme. Faustine, merci pour tes encouragements !! Je serai toujours là pour toi, et crois-moi quand on met toutes ses forces pour réaliser son rêve et assouvir sa passion, ça fonctionne !

Ma sœur, ton soutien et ta confiance inconditionnels m'ont permis d'achever cette aventure qu'est la thèse!!!! Merci d'être venue chez moi la veille du nouvel an.....Merci pour tous ces weekends, pour les balades au bord de la mer, pour m'avoir fait répéter encore et encore chaque soir mon entretien pour la Suisse, pour avoir corrigé mon manuscrit, pour tous nos beaux voyages, et pour nos fous rires. Tout simplement merci d'avoir été là !!!!

Enfin, je tiens à dédier cette thèse à ma mère. Maman, tu as toujours cru en moi, tu m'as soutenue à chaque étape de ma vie. Ce doctorat est aussi le tien...De toute façon je sais que le jour de ma soutenance tu seras aussi stressée que moi !!! Tu m'as appris à toujours donner le meilleur de soi, à agir avec passion, et à être courageuse quelque soit la difficulté. J'essaie chaque jour d'appliquer tes conseils précieux. Tu es mon exemple à suivre et mon plus grand bonheur serait que tu sois fière de ta fille qui t'aime. Merci maman, sans toi, tout ça n'aurait pas vu le jour.

Sommaire

Sommaire abrégé

SOMMAIRE ABREGE	1
SOMMAIRE DETAILLE	2
ABRÉVIATIONS	6
ETAT DE L'ART	11
I- LE CŒUR.....	11
II- LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES	23
III- LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE (DMD)	48
IV- LA CARDIOMYOPATHIE DILATEE ASSOCIEE A LA DMD.....	66
V- LA MICROSCOPIE DE CONDUCTANCE IONIQUE A BALAYAGE	72
POSITION DU PROBLEME.....	83
MATERIELS ET METHODES	85
I- MATERIEL BIOLOGIQUE : CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES	85
II- TECHNIQUES DE MICROSCOPIE.....	88
III- ETUDE LA TOPOGRAPHIE MEMBRANAIRE (SICM)	92
IV- ETUDE DE L'ACTIVITE CALCIQUE INTRACELLULAIRE	97
V- TECHNIQUES DE MARQUAGE.....	103
VI- METHODES STATISTIQUES	110
RESULTATS	111
I- AVANT-PROPOS	111
II- RESULTATS PRELIMINAIRES :	113
TOPOGRAPHIES MEMBRANAIRES DE DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES OBTENUES PAR MICROSCOPIE DE CONDUCTANCE IONIQUE A BALAYAGE (SICM).....	113
III- ARTICLE : ULTRASTRUCTURAL AND FUNCTIONAL ALTERATIONS OF EC COUPLING ELEMENTS FROM MEMBRANE SURFACE TO DEPTH IN <i>MDX</i> CARDIOMYOCYTES.....	118
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	155
ANNEXES	161
I- ANNEXE 1 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES LORS DE L'ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES DE SOURIS.....	161
II- ANNEXE 2 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES LORS DE L'ISOLEMENT DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES ISSUES DU FDB DE SOURIS.....	162
III- ANNEXE 3 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES LORS DES EXPERIENCES DE MARQUAGE DES CARDIOMYOCYTES OU DES CŒURS DE SOURIS	163
IV- ANNEXE 4 : COMPOSITION DU MILIEU DEPOLARISANT UTILISE LORS DES MESURES DE LIBERATION GLOBALE DE CALCIUM DANS LES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES ISSUES DES FDB MURINS.....	164
BIBLIOGRAPHIE	165
RESUME	190

Sommaire détaillé

SOMMAIRE ABREGE	1
SOMMAIRE DETAILLE	2
ABRÉVIATIONS	6
ETAT DE L'ART	11
I- LE CŒUR.....	11
1- Généralités	11
2- Anatomie et structure.....	11
<i>a. Les cavités cardiaques</i>	<i>11</i>
<i>b. Les systèmes valvulaires</i>	<i>12</i>
<i>c. La paroi cardiaque.....</i>	<i>13</i>
<i>d. La vascularisation coronarienne.....</i>	<i>14</i>
3- Fonctions et propriétés.....	15
<i>a. La circulation sanguine.....</i>	<i>15</i>
<i>b. La circulation pulmonaire.....</i>	<i>16</i>
<i>c. La circulation systémique.....</i>	<i>16</i>
<i>d. L'automatisme cardiaque.....</i>	<i>17</i>
<i>i. Le tissu nodal.....</i>	<i>17</i>
<i>ii. Les tissus conducteurs.....</i>	<i>18</i>
4- Les cellules cardiaques.....	19
<i>a. Les cellules myocytaires.....</i>	<i>19</i>
<i>i. Les cardiomyocytes.....</i>	<i>19</i>
<i>ii. Les cellules nodales</i>	<i>21</i>
<i>b. Les cellules non-myocytaires.....</i>	<i>21</i>
<i>i. Les cellules musculaires lisses.....</i>	<i>21</i>
<i>ii. Les cellules endothéliales</i>	<i>21</i>
<i>iii. Les fibroblastes</i>	<i>22</i>
II- LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES	23
1- Morphologie	23
2- Ultrastructure	23
<i>a. Les systèmes membranaires.....</i>	<i>23</i>
<i>i. Le sarcolemme</i>	<i>23</i>
<i>ii. Les tubules transverses</i>	<i>23</i>
<i>iii. Le réticulum sarcoplasmique.....</i>	<i>25</i>
<i>iv. Les cavéoles.....</i>	<i>26</i>
<i>v. Les disques intercalaires.....</i>	<i>27</i>
<i>b. Les myofibrilles.....</i>	<i>27</i>
<i>i. Les filaments épais de myosine</i>	<i>28</i>
<i>ii. Les filaments fins</i>	<i>29</i>
<i>c. Le cytosquelette.....</i>	<i>30</i>
<i>i. Le compartiment myofibrillaire</i>	<i>30</i>
<i>ii. Le compartiment extra-myofibrillaire.....</i>	<i>30</i>
3- Propriétés électriques.....	31
<i>a. Le potentiel membranaire de repos</i>	<i>31</i>
<i>b. Le potentiel d'action</i>	<i>33</i>
4- Les canaux ioniques du sarcolemme.....	34
<i>a. Le canal sodique rapide.....</i>	<i>34</i>
<i>b. Le canal calcique de type L ou DHPR</i>	<i>34</i>
<i>c. Les canaux chlorures</i>	<i>35</i>
<i>i. Le canal chlorure-calcium dépendant</i>	<i>35</i>

ii.	Le canal chlorure « swell ».....	35
iii.	Le canal chlorure « Clir »	36
d.	Les canaux potassiques	36
i.	Le canal potassique de type 1	36
ii.	Le canal potassique transitoire.....	36
iii.	Le canal potassique de type rapide.....	36
iv.	Le canal potassique de type lent	36
5-	Les pompes et échangeurs du sarcolemme	37
a.	L'échangeur sodium/calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou NCX).....	37
b.	Les pompes	37
i.	La pompe sodium/potassium (Na^+/K^+)	37
ii.	La pompe calcique PMCA	37
6-	Les canaux ioniques du réticulum sarcoplasmique	38
a.	Les récepteurs à la ryanodine de type 2 ou RYR2s	38
b.	Les récepteurs aux inositols trisphosphates (IP3)	40
7-	La pompe SERCA du réticulum sarcoplasmique	41
8-	Les systèmes tampons du calcium	42
a.	Les mitochondries.....	42
b.	Les calciprotéines cytoplasmiques.....	43
i.	La troponine C	43
ii.	La calmoduline	43
9-	Le couplage excitation-contraction	43
a.	L'excitation	43
b.	La contraction.....	44
10-	La relaxation myocytaire	44
11-	Les événements de libération calcique spontanée et localisée	45
III-	LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE (DMD)	48
1-	Aspects cliniques de la pathologie	48
a.	La découverte.....	48
b.	La pathologie	48
2-	Origine génétique	49
3-	Les modèles d'étude de la DMD	50
a.	Les modèles animaux	50
i.	La souris mdx.....	50
ii.	Le chien GRMD	52
iii.	Le chat HFMD	53
b.	Les lignées cellulaires	53
4-	La dystrophine et le « Dystrophin-Glycoprotein Complex »	53
a.	La dystrophine	53
i.	Localisation (Figure H-35).....	53
ii.	Structure	54
iii.	Mutations	55
b.	Le « Dystrophin-Glycoprotein-Complex » (DGC)	55
i.	Composition.....	55
ii.	Rôle.....	56
c.	Physiopathologie dystrophique	57
i.	L'hypothèse mécanique ou mécano-signalétique.....	57
ii.	L'hypothèse de la surcharge calcique.....	57
iii.	L'hypothèse vasculaire	59
iv.	L'hypothèse du stress oxydatif et de l'inflammation.....	59
d.	Les thérapies	59
i.	La thérapie génique	60
ii.	Le saut d'exon.....	60
iii.	Les thérapies pharmacologiques	62
iv.	La thérapie cellulaire.....	63
IV-	LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE ASSOCIÉE A LA DMD	66
1-	La cardiomyopathie dilatée : nouveau symptôme de la DMD	66
2-	Les manifestations cliniques chez le patient DMD	66

a.	<i>Généralités</i>	66
b.	<i>ECG</i>	67
3-	Le modèle d'étude	68
a.	<i>La souris mdx</i>	68
b.	<i>Les cardiomyocytes mdx</i>	68
4-	La prévention de la cardiomyopathie dilatée	70
V-	LA MICROSCOPIE DE CONDUCTANCE IONIQUE A BALAYAGE	72
1-	Historique	72
2-	Le SICM : une technique polyvalente	74
a.	<i>Explorations macroscopiques</i>	75
b.	<i>Explorations microscopiques</i>	77
c.	<i>Explorations nanoscopiques</i>	79
d.	<i>Conclusion</i>	81
	POSITION DU PROBLEME	83
	MATERIELS ET METHODES	85
I-	MATERIEL BIOLOGIQUE : CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES	85
1-	Dissection	85
2-	Digestion du cœur	85
3-	Isolement cellulaire	86
4-	Ensemencement cellulaire	87
II-	TECHNIQUES DE MICROSCOPIE	88
1-	La Microscopie de Conductance Ionique à Balayage	88
2-	La Microscopie confocale	88
a.	<i>Principe de la microscopie confocale</i>	88
b.	<i>Principe de la fluorescence</i>	88
c.	<i>Microscope confocal Olympus FV1000</i>	89
d.	<i>Microscope confocal Bio-Rad MRC1024</i>	90
3-	La Microscopie électronique à balayage	90
a.	<i>Principe de la microscopie électronique à balayage</i>	90
b.	<i>Microscope électronique JSM 840A (JEOL)</i>	91
c.	<i>Préparation des échantillons</i>	91
III-	ETUDE LA TOPOGRAPHIE MEMBRANAIRE (SICM)	92
1-	Dispositif expérimental	92
2-	Principe	93
3-	Milieux extracellulaires et intra-pipettes	95
4-	Paramètres d'acquisition	96
5-	Analyse des données	96
a.	<i>Z-groove ratio</i>	96
b.	<i>Calcul de surfaces</i>	96
IV-	ETUDE DE L'ACTIVITE CALCIQUE INTRACELLULAIRE	97
1-	Principe de la sonde Fluo-4-AM	97
2-	Mesure des libérations calciques lors d'une stimulation localisée	97
a.	<i>Système de stimulation</i>	97
b.	<i>Charge des cardiomyocytes</i>	99
c.	<i>Micropipette</i>	99
d.	<i>Protocole d'acquisition</i>	100
e.	<i>Analyse des données</i>	100
3-	Mesure des libérations calciques spontanées	101
a.	<i>Principe</i>	101
b.	<i>Système d'acquisition</i>	101
c.	<i>Charge des cardiomyocytes</i>	101
d.	<i>Protocole d'acquisition</i>	102
e.	<i>Analyse des données</i>	102
V-	TECHNIQUES DE MARQUAGE	103
1-	Marquage par sonde fluorescente : le di-8-ANEPPS	103
a.	<i>Généralités</i>	103

b.	<i>Protocole</i>	103
c.	<i>Analyse des données</i>	103
i.	<i>Transformée de Fourier et Power</i>	104
ii.	<i>Volume Ratio</i>	105
iii.	<i>Le réseau de tubules-T</i>	105
2-	Immunocytochimie	106
a.	<i>Principe</i>	106
b.	<i>Protocole</i>	106
c.	<i>Anticorps utilisés</i>	107
d.	<i>Analyse des données</i>	107
3-	Marquage tissulaire	108
a.	<i>Protocole</i>	108
i.	<i>Le cœur de souris</i>	108
ii.	<i>Les muscles squelettiques de la patte de souris</i>	108
b.	<i>Coupes tissulaires</i>	108
c.	<i>Marquage au trichrome de Masson</i>	109
d.	<i>Immunohistochimie des muscles squelettiques</i>	109
i.	<i>Principe</i>	109
ii.	<i>Protocole</i>	109
VI-	METHODES STATISTIQUES	110
	RESULTATS	111
I-	AVANT-PROPOS	111
II-	RESULTATS PRELIMINAIRES :.....	113
	TOPOGRAPHIES MEMBRANAIRES DE DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES OBTENUES PAR MICROSCOPIE DE CONDUCTANCE IONIQUE A BALAYAGE (SICM).....	113
1-	Contexte de l'étude	113
2-	Topographies membranaires de plusieurs types cellulaires	114
a.	<i>Les cellules</i>	114
b.	<i>Résultats</i>	115
3-	Conclusion	116
III-	ARTICLE : ULTRASTRUCTURAL AND FUNCTIONAL ALTERATIONS OF EC COUPLING ELEMENTS FROM MEMBRANE SURFACE TO DEPTH IN MDX CARDIOMYOCYTES	118
1-	Contexte de l'étude	118
2-	Altération des systèmes membranaires	118
3-	Perturbation de l'homéostasie calcique	119
4-	Organisation des réseaux protéiques intracellulaires	119
5-	Conclusions	120
6-	Reproduction du manuscrit	121
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	155
	ANNEXES	161
I-	ANNEXE 1 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES LORS DE L'ISOLEMENT DES CARDIOMYOCYTES DE SOURIS	161
II-	ANNEXE 2 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES LORS DE L'ISOLEMENT DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES ISSUES DU FDB DE SOURIS	162
III-	ANNEXE 3 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES LORS DES EXPERIENCES DE MARQUAGE DES CARDIOMYOCYTES OU DES CŒURS DE SOURIS	163
IV-	ANNEXE 4 : COMPOSITION DU MILIEU DEPOLARISANT UTILISE LORS DES MESURES DE LIBERATION GLOBALE DE CALCIUM DANS LES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES ISSUES DES FDB MURINS	164
	BIBLIOGRAPHIE	165
	RESUME	190

Abréviations

Abréviations

-A-

AFM:	Atomic Force Microscopy
ADP :	Adénosine DiPhosphate
AMPc:	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANP :	Atrial Natriuretic Peptide
ATP :	Adénosine TriPhosphate
2-APB:	2-AminoethoxydiPhenyl Borate
ARN:	Acide Ribonucléique
ARNm:	Acide Ribonucléique messenger

-B-

BAPTA:	1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
BDM:	Dystrophie Musculaire de Becker
BNP:	Brain Natriuretic Peptide
BSA:	Bovine Serum Albumin

-C-

Ca ²⁺ :	Calcium
CamKII:	Kinase II dépendante de la calmoduline
CEC :	Couplage excitation-contraction
CICR:	Calcium Induce Calcium Release
CMD:	Cardiomyopathie Dilatée
CMLs:	Cellules Musculaires Lisses
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CPA :	Acide cyclopiazonique

-D-

° :	Degré
2D :	Deux Dimensions
DCM :	Dilated Cardiomyopathy
DGC :	Dystrophin-Glycoprotein Complex
DHPRs :	Récepteurs à la Dihydropyridine
Di-8-ANEPPS :	Di-8-butyl-Amino-Naphtyl-Ethylene-Pyridine-Propyl-Sulfonate
DMD :	Dystrophie Musculaire de Duchenne
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO:	Densité Optique

-E-

EC :	Excitation-Contraction
ECG :	Electrocardiogramme
$E_{Na, K, Ca, Cl}$:	Piles aux ions sodium, potassium, calcium et chlorure
EGF-R:	Epidermal Growth Factor Récepteur
EGTA:	Ethylene Elycol Tetraacetic Acid
ELC:	Essential Light Chain
Ext:	Extracellulaire

-F-

FDB:	Flexor Digitorum Brevis
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer

-G-

$g_{Na, K, Ca, Cl}$:	Conductances aux ions sodium, potassium, calcium, chlorure
GRMD :	Golden Retriever Muscular Dystrophy

-H-

HCN:	Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel
HD:	Half Decay
HDMS :	Hexaméthylidisilazane

HF:	Heart Failure
HFMD :	Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy

-I-

IGF :	Insulin Growth Factor
Int:	Intracellulaire
IP3Rs :	Récepteurs à l'Inositol TrisPhosphate
IS1 :	Séquence d'Insertion 1
IS2 :	Séquence d'Insertion 2

-K-

K ⁺ :	Potassium
KB:	Kraftbrühe
KCl:	Chlorure de potassium
kDa:	KiloDalton
KO:	Knock Out
kPa:	Kilopascal
kV:	Kilovolt

-L-

LCC :	L-type Ca ²⁺ Channel
LEs:	Eléments Longitudinaux
LGMD2A :	Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2A

-M-

<i>mdx</i> :	X-linked Muscular Dystrophy
MHC:	Myosin Heavy Chain
MLC:	Myosin Light Chain
MLP:	Muscle Lim Protein
mL:	Millilitre
mPa :	Millipascal
mV :	Millivolt

mW : Milliwatt

-*N*-

Na⁺ : Sodium

NLS : Signal de Localisation Nucléaire

nm : Nanomètre

nM : Nanomolaire

NO : Oxyde Nitrique

NOs : Nitric Oxyde synthase

NS : Séquence en N-terminale

-*P*-

P_i : Phosphate inorganique

PA : Potentiel d'Action

PAF : Paraformaldéhyde

PBS : Phosphate Buffer Saline

PIP2 : Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate

PKA : Protéine Kinase A

pL : Picolitre

PLN : Phospholamban

PMCA : Plasma Membrane Calcium ATPase

% : Pourcentage

PVDF : PolyFluorure de VinyliDène

-*R*-

RLC : Regular Light Chain

ROS : Espèces Oxygénées Réactives

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RT : Rise Rate

RyRs : Récepteurs à la ryanodine

-*S*-

s :	Seconde
SERCA :	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SICM :	Microscopie de Conductance Ionique à Balayage
SPM :	Scanning Probe Microscopes
SR:	Sarcoplasmic Reticulum

-T-

TEs :	Eléments transverses
TGF :	Transmission Growth Factor
TRPC1 :	Transient Receptor Potential Channel 1
TTX :	Tétradotoxine
Tubule-T ou TT :	Tubule Transverse

-U-

UI :	Unités Internationales
UA :	Unités Arbitraires
μM :	Micromolaire
μm :	Micromètre

-W-

WT :	Wild Type
------	-----------

Etat de L'art

Etat de l'art

I- Le cœur

1- Généralités

Le cœur est situé dans la cage thoracique au niveau du médiastin. C'est un organe musculaire creux responsable de la circulation sanguine dans l'ensemble de l'organisme. Il est doté d'une activité rythmique permanente, qui se traduit par une phase de contraction : la systole, et par une phase de relaxation : la diastole. Il agit comme une pompe dont la fonction est d'assurer un apport constant en nutriments, hormones et gaz respiratoires indispensables à la physiologie et à la survie cellulaires.

2- Anatomie et structure

a. Les cavités cardiaques

Le cœur est composé de quatre cavités : deux oreillettes et deux ventricules (Figure H-1).

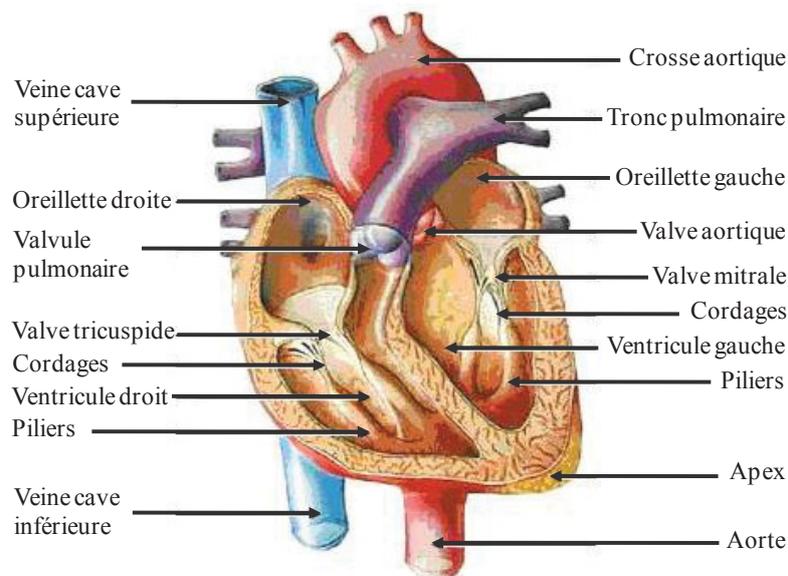


Figure H-1 : Anatomie cardiaque de la face antérieure du cœur en coupe transversale
(Selon le site internet www.htapquebec.ca)

Les quatre cavités sont séparées les unes des autres par différents éléments anatomiques : les deux oreillettes, droite et gauche, sont séparées par le septum inter-auriculaire et les deux ventricules, droit et gauche, par le septum inter-ventriculaire (Kisch, 1951).

b. Les systèmes valvulaires

Entre les oreillettes et les ventricules, un premier système valvulaire permet la circulation sanguine dans le cœur (Markham, 1861) (Figure H-2) :

- La valve tricuspide, composée de trois feuillets, sépare l'oreillette droite du ventricule droit.
- La valve mitrale, composée de deux feuillets, s'insère entre l'oreillette gauche et le ventricule gauche.

Un deuxième système valvulaire est ensuite nécessaire pour propulser le sang dans l'ensemble de l'organisme. Il est composé de la valve pulmonaire et de la valve aortique, chacune à trois feuillets. Située entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire, la valve pulmonaire est traversée par un sang non oxygéné qui se dirige vers le poumon pour remplacer son dioxyde de carbone par du dioxygène (hématose). Au contraire lors de la systole, la valve aortique, placée entre le ventricule gauche et l'aorte, est traversée par un sang riche en oxygène propulsé vers tous les organes.

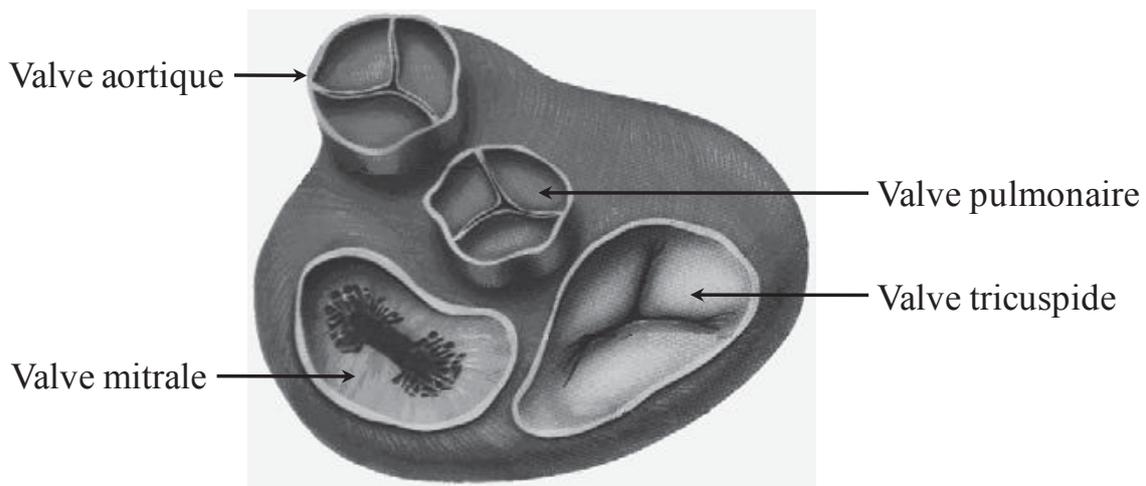


Figure H-2 : Représentation des valves cardiaques

(Selon le site internet www.staps.univ-avignon.fr)

Le système valvulaire s'ouvre et se ferme de manière passive en fonction des variations de pression entre les cavités. Mais une fois fermé, il forme une barrière étanche qui empêche le reflux du sang et n'autorise ainsi qu'un seul sens de circulation. Sa fonction est assurée par des muscles papillaires qui sont enchâssés dans la couche de tissus internes des ventricules.

c. La paroi cardiaque

La paroi du cœur est constituée de trois types de tuniques (Figure H-3).

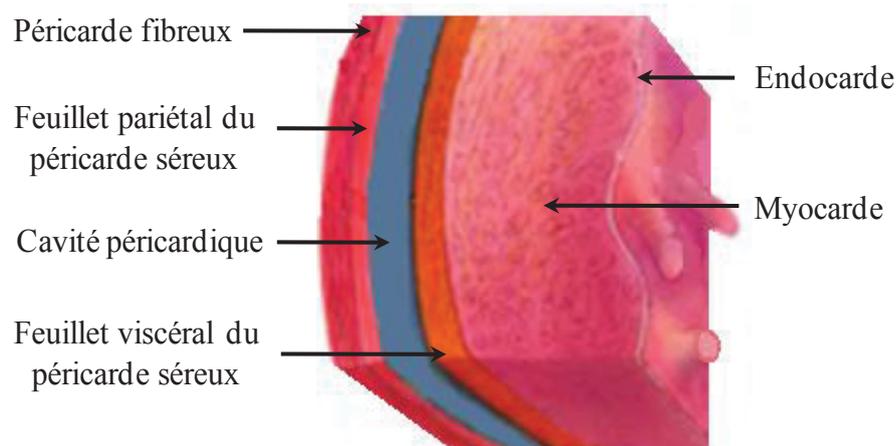


Figure H-3 : Structure du péricarde et de la paroi du cœur

(Selon le site internet www.s3.e-monsite.com)

De l'intérieur vers l'extérieur :

- L'endocarde tapisse les cavités, les valves et les muscles papillaires. C'est un endothélium qui est en continuité avec celui des veines caves, de l'artère pulmonaire et de l'aorte. Il est en contact avec des cellules musculaires lisses et du tissu conjonctif bien vascularisé et formé de fibroblastes, de collagène, de fibres nerveuses et élastiques.
- Le myocarde constitue la couche active du cœur puisqu'elle est composée de cellules musculaires striées organisées en travées où s'insèrent de nombreuses fibres nerveuses sensibles et des vaisseaux sanguins. Cette tunique est à l'origine de la fonction de pompe du cœur.
- Le péricarde est une double enveloppe entourant le cœur. L'enveloppe externe fibreuse est bordée sur sa face interne par une séreuse (pariétale). L'épicarde, péricarde viscéral, est une deuxième couche séreuse qui forme la paroi cardiaque

par ses cellules mésothéliales et son tissu conjonctif fait de fibroblastes et d'adipocytes. Un liquide séreux occupe l'espace péricardique entre ces deux feuillets pour lubrifier et diminuer les forces de frottement lors de la contraction cardiaque.

d. La vascularisation coronarienne

Le cœur est une pompe responsable de la circulation sanguine dans l'ensemble de l'organisme grâce à un réseau de vaisseaux sanguins très développé. Il possède également son propre système vasculaire, les artères coronaires (Baroldi et al., 1956), droite et gauche, qui prennent naissance à la base de l'aorte juste après la valve aortique (Figure H-4).

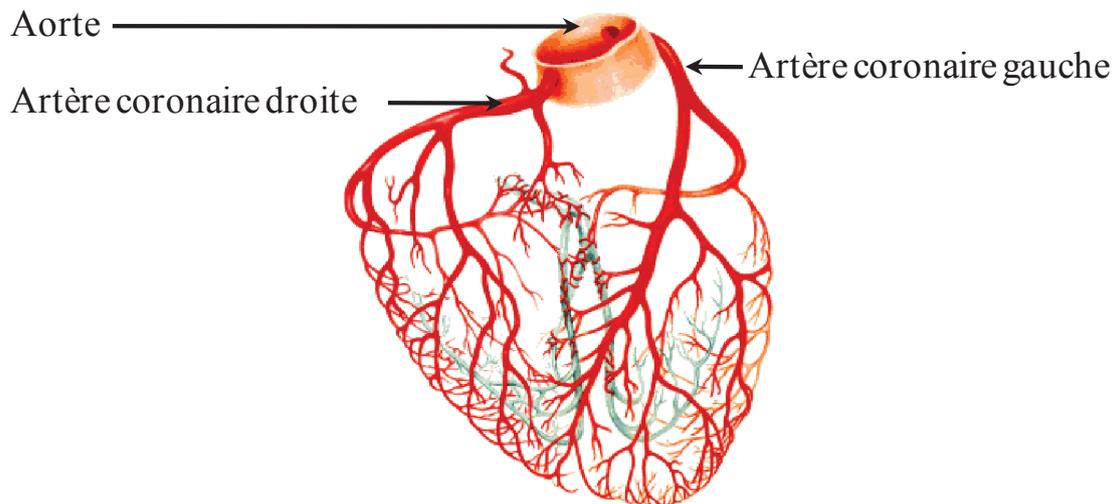


Figure H-4 : Vascularisation coronarienne du cœur. Juste après la valve aortique, les deux artères coronaires (droite et gauche) prennent naissance à la base de l'aorte pour ensuite former un réseau vasculaire qui se propage dans la paroi myocardique.

(Selon le site internet www.freewebs.com)

Contrairement à l'artère coronaire droite, l'artère coronaire gauche ne peut pas être perfusée lors de la systole car le ventricule gauche possède un myocarde très développé empêchant son irrigation par sa propre contraction. Ainsi sa circulation sanguine est dite diastolique. Grâce à ce système vasculaire, les cellules cardiaques sont alimentées en oxygène, et en nutriments nécessaires à leur survie et leur fonctionnement. Elles rejettent également des déchets (gazeux et métaboliques) qui sont captés dans le réseau veineux coronarien qui se concentre en une veine, le sinus coronarien, qui débouche dans l'oreillette droite près de la valve tricuspide et de l'orifice de la veine cave inférieure.

3- Fonctions et propriétés

a. La circulation sanguine

La circulation sanguine est un système en circuit fermé qui a deux fonctions principales. Elle apporte à l'ensemble des cellules les nutriments, les hormones et les gaz respiratoires, notamment le dioxygène, indispensables à leur fonctionnement mais aussi à leur survie (Katz, 1992). Il est également le moyen de collecte de tous les déchets métaboliques (le dioxyde de carbone et l'urée) produits par l'organisme (Figure H-5).

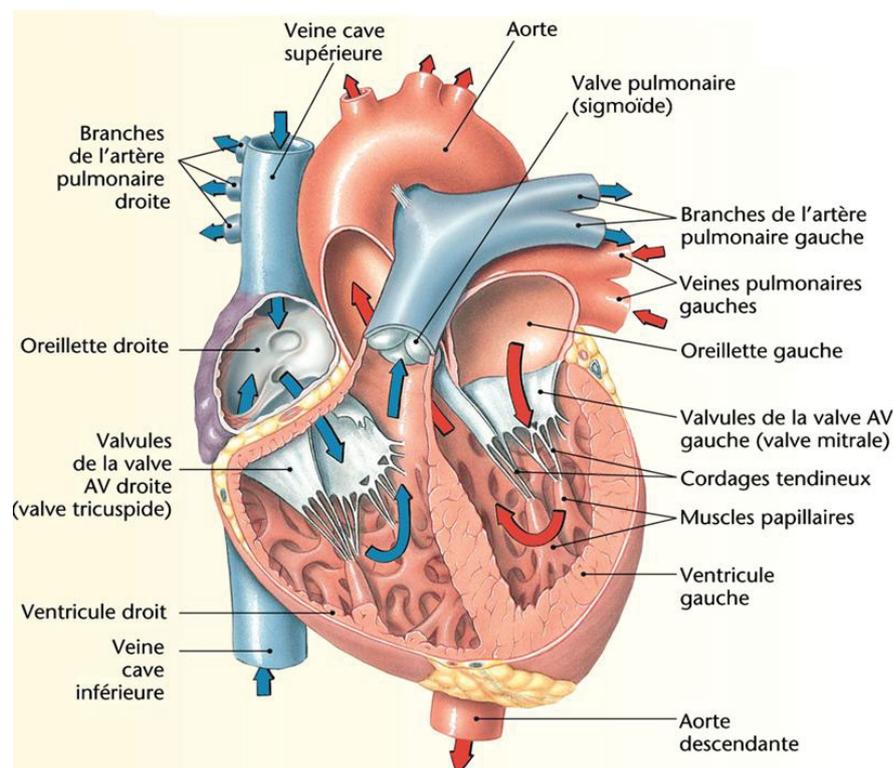


Figure H-5 : Circulations pulmonaires (flèches bleues) et systémiques (flèches rouges) à travers le cœur. Le sang veineux arrive par les veines caves (supérieure et inférieure) dans l'oreillette droite, puis il est propulsé dans l'aorte pulmonaire qui le conduit aux poumons par le ventricule droit.

(Selon le site internet. www.knol.google.com)

Pour gérer ce double emploi, le muscle cardiaque est constitué de deux cœurs montés en série:

- Un cœur droit, constitué de l'oreillette et du ventricule droits, qui assure la circulation pulmonaire ou petite circulation.

- Un cœur gauche, composé de l'oreillette et du ventricule gauches, qui est responsable de la circulation systémique ou grande circulation.

b. La circulation pulmonaire

Le sang désaturé en oxygène est collecté par l'ensemble du réseau veineux de l'organisme et est amené à l'oreillette droite par les veines caves (inférieure et supérieure) et le sinus coronaire. Puis il est perfusé à travers la valve tricuspide dans le ventricule droit où il va s'accumuler jusqu'à la systole pour être propulsé dans le tronc de l'aorte pulmonaire jusqu'aux poumons. Au contact des cellules pulmonaires, des échanges alvéolo-capillaires permettent de remplacer le dioxyde de carbone par du dioxygène (Figure H-6).

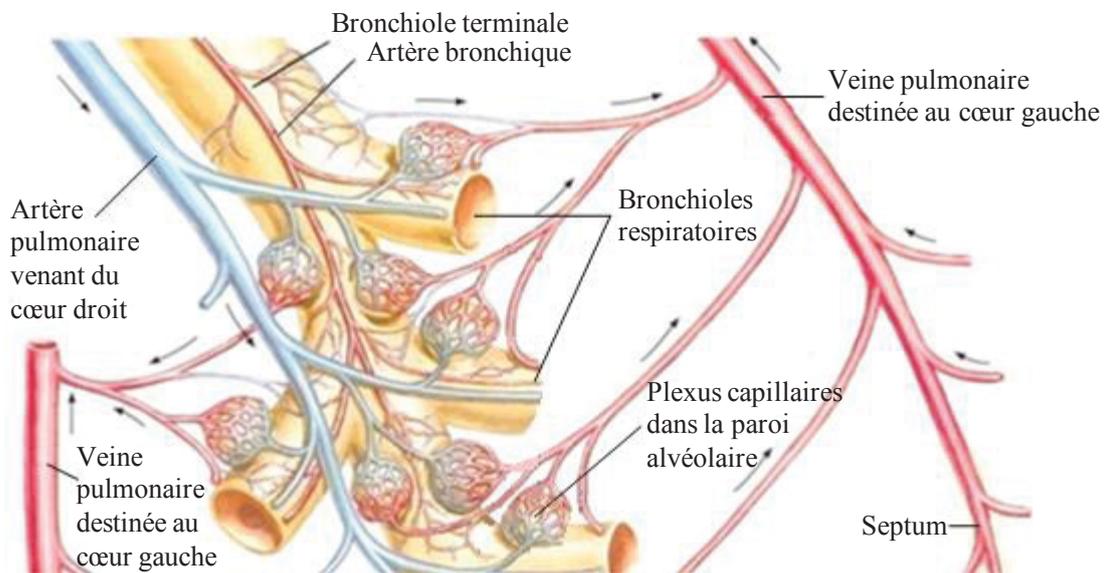


Figure H-6 : Echanges alvéolo-capillaires lors de la circulation pulmonaire. Le sang veineux arrive aux alvéoles pulmonaires par des artères pulmonaires, qui se divisent en capillaires sanguins, pour être conduit aux plexus capillaires où les échanges gazeux s'effectuent. Puis le sang chargé en dioxygène repart au cœur par les veines pulmonaires.

(Selon le site internet www.mediatice-grenoble.fr)

c. La circulation systémique

Une fois réoxygéné, le sang retourne dans l'oreillette gauche par les quatre veines pulmonaires. Puis il passe à travers la valve mitrale pour remplir le ventricule gauche. Lors de la systole, il est propulsé dans l'aorte pour être distribué à l'ensemble des cellules de l'organisme grâce au système vasculaire.

d. L'automatisme cardiaque

L'une des principales caractéristiques du cœur est sa propriété d'autorythmicité. Effectivement, ce muscle possède la capacité de produire des potentiels d'action (PA) spontanés et rythmés grâce à des cellules particulières, les cellules nodales. Ces PA sont ensuite propagés à travers le cœur, de cellules en cellules, par les tissus pour déclencher une systole coordonnée des quatre cavités cardiaques en commençant par les oreillettes puis par les ventricules.

i. Le tissu nodal

Le tissu nodal est constitué de cellules qui sont génératrices, conductrices et régulatrices de PA. Il s'organise en deux amas cellulaires (Figure H-7) :

- Le nœud sino-atrial (sinusal ou de Keith et Flack) situé dans la partie postérieure de l'oreillette droite contre le septum inter-auriculaire.
- Le nœud auriculo-ventriculaire (ou nœud de Tawara) localisé dans la cloison inter-ventriculaire.

Les cellules du nœud sinusal sont à l'origine de la propriété d'autorythmicité du cœur, et donc de la fréquence cardiaque (Oosthoek et al., 1993a). Elles produisent des PA à une fréquence comprise entre 60 et 100 excitations par minute chez l'homme au repos, mais cette activité peut cependant être modulée par le système nerveux autonome pour accélérer ou ralentir le rythme cardiaque. Leur fonction est principalement due à une famille de canaux ioniques appelés HCN (*Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*) (Kaupp et al., 2001). Ces protéines ont la faculté d'être activées en hyperpolarisation entraînant une entrée d'ions sodium qui dépolarise lentement la membrane cellulaire jusqu'à atteindre le seuil d'activation des canaux calciques de type T puis de type L initiant ainsi un PA. Puis ces canaux calciques s'inactivent, et se désactivent. En parallèle, des canaux potassiques s'activent et conduisent la membrane à se repolariser jusqu'à atteindre le seuil d'activation des canaux HCN. Ces cellules ne possèdent pas de potentiel de repos stable ce qui leur confère un rôle de « *pacemaker* » (Irisawa et al., 1993).

Le PA généré par les cellules sinusales se propage ensuite jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire tout en dépolarisant les cardiomyocytes auriculaires qui se contractent par une entrée de calcium dans leur cytoplasme (Oosthoek et al., 1993b). Dans le nœud auriculo-

ventriculaire, ce PA est retardé de 70 millisecondes pour laisser le temps aux oreillettes de finir leur systole. En conditions physiopathologiques où le nœud sinusal est défectueux, le nœud auriculo-ventriculaire est capable de prendre le relais pour générer des potentiels d'action. Néanmoins, le rythme cardiaque sera, dans ce cas, plus lent (bradycardie), 40 à 60 battements par minutes.

ii. Les tissus conducteurs

Ils sont le moyen de propagation des PA produits par le nœud sinusal (Figure H-7) :

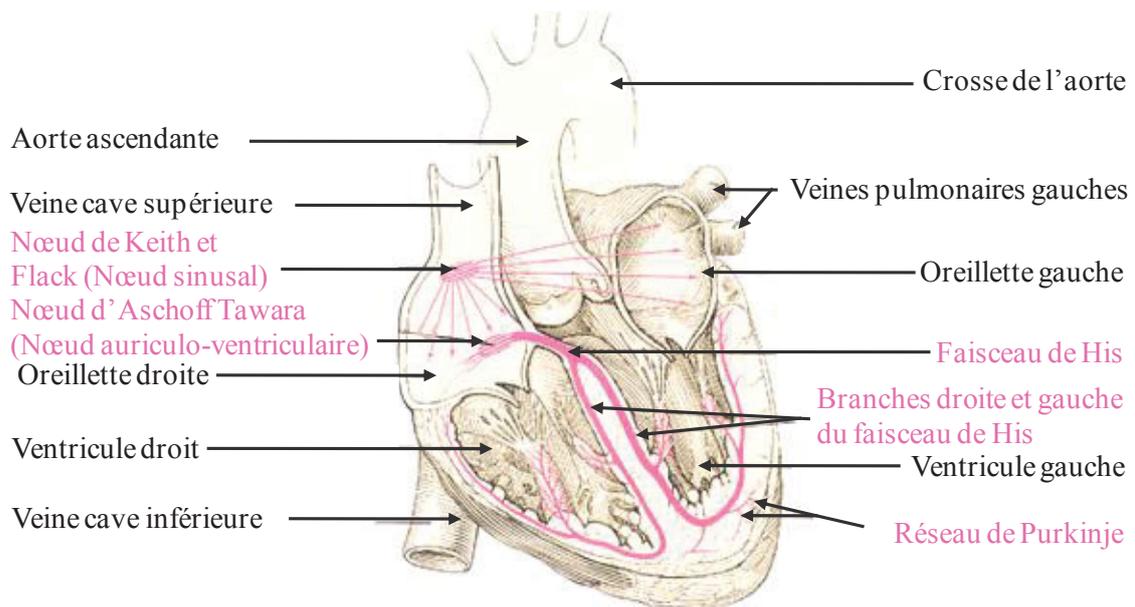


Figure H-7 : Système de conduction électrique du cœur. Le potentiel d'action initiateur de la contraction cardiaque naît dans le nœud sinusal pour se propager ensuite dans les deux oreillettes jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire. Puis il est conduit dans les ventricules par le réseau de fibres de His et de Purkinje.

(Selon le site internet www.foulon.chez-alice.fr)

- Les voies inter-nodales se propagent à travers les deux oreillettes jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire. Elles sont constituées du faisceau internodal antérieur, du faisceau de Bachman, du faisceau internodal moyen de Wenchebach, du faisceau internodal postérieur de Thorel et des voies accessoires de Jame, Makaim et Kent.
- Le faisceau de His part du nœud auriculo-ventriculaire puis se divise en deux branches (droite et gauche) pour s'étendre dans les deux ventricules.
- Le réseau de Purkinje comporte les ramifications terminales de deux branches du faisceau de His et parcourt toute la musculature myocardique.

Les faisceaux de His et de Purkinje sont aussi générateurs de potentiels d'action en condition pathologique lorsque les nœuds, sinusal et auriculo-ventriculaire, cessent de fonctionner (Oosthoek, et al., 1993b).

4- Les cellules cardiaques

Le cœur est composé de cellules myocytaires (cardiomyocytes et cellules nodales) et non-myocytaires (fibroblastes, cellules musculaires lisses, et cellules endothéliales) qui sont entourées de matrice extracellulaire assurant leur cohésion (Baudino et al., 2006) (Figure H-8).

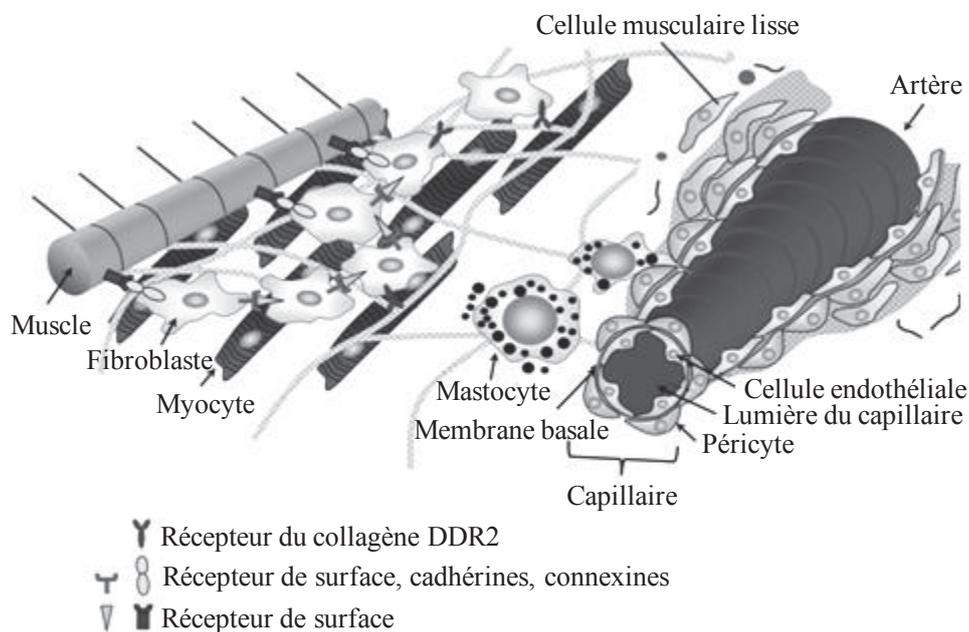


Figure H-8 : Représentation schématique des interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire dans le cœur.

(Modifié d'après Baudino et al., 2006)

L'organisation et la proportion de ces différents types cellulaires sont cruciales pour le développement et le fonctionnement du myocarde. Dans le cœur adulte, les cardiomyocytes ne représentent que 20% du nombre de cellules totales mais ils sont les plus volumineux et occupent 70 à 80% de la masse cardiaque (Long, 1996).

a. Les cellules myocytaires

i. Les cardiomyocytes

Les cardiomyocytes sont les cellules spécialisées de la contraction et sont localisés dans les quatre cavités cardiaques. Leur taille est seulement de 15 à 20 μm dans les oreillettes

tandis que dans les ventricules, elles mesurent environ 150 μm de longueur et 20 μm de largeur. Ce sont des cellules rectangulaires qui ne possèdent généralement qu'un seul noyau (Figure H-9).

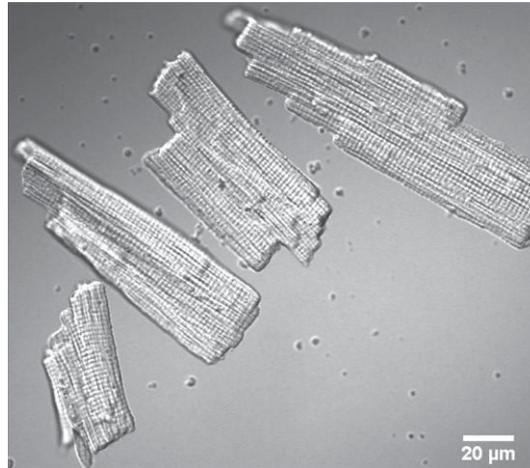


Figure H-9 : Image en microscopie confocale (Olympus FV1000) de cardiomyocytes ventriculaires de souris BL 10 âgées de 12 mois isolés par la technique de Langendorff.
(Obtenue au laboratoire)

Ces cellules, regroupées en plusieurs fibres musculaires, sont liées les unes aux autres par des disques intercalaires. Ces structures sont des jonctions spécialisées contenant des desmosomes et des jonctions communicantes. Les desmosomes sont les liens mécaniques indispensables entre les cellules lors de la contraction, et les jonctions communicantes servent de voie de communication électrique entre les cardiomyocytes tout le long de la fibre musculaire. Ce réseau cellulaire s'organise donc en un syncytium fonctionnel (Figure H-10).

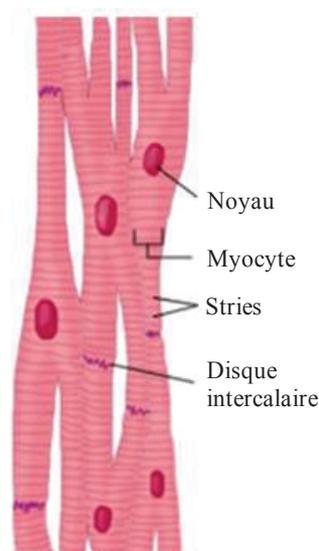


Figure H-10 : Représentation schématique des interactions entre les cardiomyocytes dans le cœur.

(Selon le site internet www.colvir.net)

ii. Les cellules nodales

Elles sont localisées dans le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire, les fibres de Purkinje et de His. Ce sont de petites cellules (4 à 6 μm) organisées en lignes qui s'anastomosent fréquemment. Leur cytoplasme est pauvre en myofibrilles et contient un noyau central (Oosthoek, et al., 1993a).

Comme il a été décrit précédemment, ces cellules sont responsables de la fréquence cardiaque par leur capacité à générer spontanément des potentiels d'action. Elles font partie également du tissu conducteur qui permet de propager l'excitation à travers l'ensemble du myocarde pour déclencher la systole cardiaque.

b. Les cellules non-myocytaires

i. Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses (CMLs) sont constitutives de la paroi des vaisseaux sanguins qui irriguent le cœur et qui forment le système vasculaire coronarien vu précédemment. Elles sont localisées dans la média qui est la tunique moyenne de la paroi des vaisseaux sanguins composés également d'une tunique externe (l'adventice) et d'une tunique interne (l'intima). Les CMLs ont une forme allongée et possèdent un noyau central. Leur cytoplasme contient des myofibrilles leur permettant de se contracter pour assurer la vasomotricité artérielle.

ii. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont des cellules uni-nucléées, plates qui reposent sur une lame basale (Stemerman et al., 1976). Elles constituent l'intima (paroi interne des vaisseaux sanguins) du réseau coronarien, et elles recouvrent l'ensemble des parois et des valves cardiaques. Elles sont au contact de la circulation sanguine et assurent l'étanchéité du vaisseau tout en permettant les échanges gazeux et nutritifs avec le tissu environnant. Elles participent également au phénomène d'hémostase grâce à leur expression membranaire de thrombomodulines (anti-thrombotiques) et leur sécrétion de prostacyclines PGI₂ (anti-thrombotiques et antiplaquettaires). Elles jouent aussi un rôle dans la vasomotricité, en réponse à diverses hormones, en produisant de l'oxyde nitrique (NO) qui provoque la relaxation des cellules musculaires lisses et donc la vasodilatation des vaisseaux sanguins.

iii. Les fibroblastes

Les fibroblastes représentent quantitativement 80% des cellules cardiaques. Ils sont fusiformes, possèdent un noyau ovale et n'ont pas un cytoplasme très développé. Ils ont un rôle de soutien et participent aux propriétés structurales, biochimiques, mécaniques et électriques du cœur (Eyden et al., 1986). Elles sont responsables de la synthèse et du renouvellement de la matrice extracellulaire permettant la cohésion des cardiomyocytes entre eux.

En conditions physiopathologiques, les fibroblastes peuvent voir leur fonctionnement perturbé par de nombreux facteurs. Ces dysfonctionnements conduisent généralement à une augmentation du nombre de fibroblastes et à une fibrose par une synthèse excessive de matrice extracellulaire qui va modifier les propriétés de contractilité et de conduction des PA du myocarde.

II- Les cardiomyocytes ventriculaires

1- Morphologie

Les cardiomyocytes ventriculaires ont une forme rectangulaire, mesurent 150 μm de longueur et 20 μm de largeur environ. En microscopie optique, ces cellules présentent une alternance de bandes transversales claires et sombres qui correspondent aux sarcomères, unités contractiles de la cellule, et dont le nombre varie entre 50 et 90 par myocyte (Figure H-11).

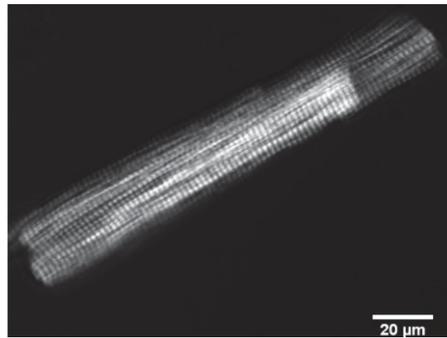


Figure H-11 : Image en microscopie optique de transmission (Olympus FV1000) d'un cardiomyocyte ventriculaire de souris BL 10 âgée de 12 mois isolé par la technique de Langendorff.
(Obtenue au laboratoire)

2- Ultrastructure

a. Les systèmes membranaires

Les cardiomyocytes possèdent un système membranaire riche, de leur surface au cytoplasme.

i. Le sarcolemme

Le sarcolemme est la membrane plasmique qui entoure la cellule musculaire et délimite le milieu extracellulaire du cytoplasme. Il est principalement de nature phospholipidique et intègre de nombreux canaux ioniques, transporteurs, pompes, et récepteurs qui régulent les fonctions cellulaires.

ii. Les tubules transverses

- Structure

Les tubules transverses (ou tubules-T) sont des invaginations du sarcolemme et représentent 30% de la totalité de la membrane plasmique. Ils ont un diamètre compris entre

100 et 300 nm (Soeller and Cannell, 1999) et sont présents dans les cardiomyocytes ventriculaires. Néanmoins, ils sont peu représentés dans les myocytes auriculaires et absents des cellules sinusales et des tissus conducteurs (Ayetey et al., 1978). Ce sont des structures labiles, inexistantes à l'état néonatal et qui disparaissent progressivement (dédiérenciation) lors de la mise en culture de ces cellules (Louch et al., 2004). Leur formation requiert plusieurs éléments tels que du cholestérol et des protéines spécifiques comme les cavéolines de type 3 et les amphisines de type 2 (Carozzi et al., 2000).

Ils sont répartis régulièrement dans la membrane et ils forment ainsi un véritable réseau qui est constitué de ramifications composées à 60% d'éléments transversaux (TEs) et à 40% d'éléments longitudinaux (LEs) (Soeller et Cannell, 1999 ; Brette et Orchard, 2003). Les TEs prennent naissance à la membrane plasmique et s'étendent jusqu'aux lignes Z pour amener rapidement les PA au plus près des systèmes contractiles (Soeller et Cannell, 1999). Ils sont espacés d'environ 2 μm pour correspondre à la taille d'un sarcomère. Concernant les LEs, les données restent encore assez hypothétiques, cependant ils relieraient les TEs entre eux et longeraient les myofibrilles (Figures H-12 et H-14).

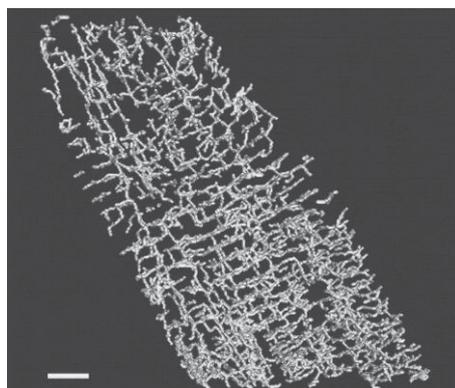


Figure H-12 : Représentation tridimensionnelle du réseau de tubules-T dans un cardiomyocyte ventriculaire adulte de rat. La barre d'échelle représente 5 μm . (D'après Soeller et Cannell, 1999)

- Propriétés

Les tubules-T représentent une voie de passage du signal, de la surface à l'intérieur de la cellule, indispensable au couplage excitation-contraction (présenté plus loin dans ce manuscrit). Pour assurer cette fonction, plusieurs canaux ioniques, transporteurs et échangeurs y sont localisés et sont à l'origine de courants (Tableau H-13).

	% dans les tubules-T
I_{Ca}	80
I_{Na}	22
I_{NaCa}	63
I_{NaK}	59
I_{To}	29
I_K	27
I_{K1}	26

Tableau H-13 : Distribution membranaire des courants ioniques dans un cardiomyocyte ventriculaire de rat. I_{Ca} : DHPRs (récepteurs aux dihydropyridines), I_{Na} : canaux sodiques rapides ; I_{NaCa} : échangeur Na/Ca, I_{NaK} : pompe Na/K, I_{To} ; I_K et I_{K1} : canaux ioniques potassiques.

(D'après le revue Brette et al., 2007).

Dans les cellules musculaires cardiaques, les tubules-T forment une structure particulière appelée diade (Figure H-14). Cette diade est le résultat de la juxtaposition d'un tubule-T et d'une citerne terminale du réticulum sarcoplasmique jonctionnel. La distance séparant ces deux éléments est seulement de 12 nm pour garantir une communication fonctionnelle efficace entre les récepteurs à la dihydropyridine (DHPRs) et les récepteurs à la ryanodine (RYRs). Cette organisation structurale est optimale pour la réalisation du couplage excitation-contraction.

iii. Le réticulum sarcoplasmique

Dans chaque cardiomyocyte, le réticulum sarcoplasmique (RS) sert de réserve calcique indispensable à la contraction cellulaire (Song et al., 2006). Il est divisé en deux compartiments en continuité l'un avec l'autre :

- Le RS longitudinal qui est un réseau de tubules entourant les myofibrilles.
- Le RS jonctionnel qui est une citerne proche de la ligne Z des sarcomères et des tubules-T. Les récepteurs à la ryanodine de type 2 (RYR2s) sont localisés dans la membrane de cet organite pour être au plus près (12 nm) des récepteurs à la dihydropyridine (DHPRs) et ainsi optimiser la libération calcique des RYR2s

provoquée par l'influx calcique des DHPRs, c'est le phénomène de « *Calcium-Induced Calcium Release* » (CICR).

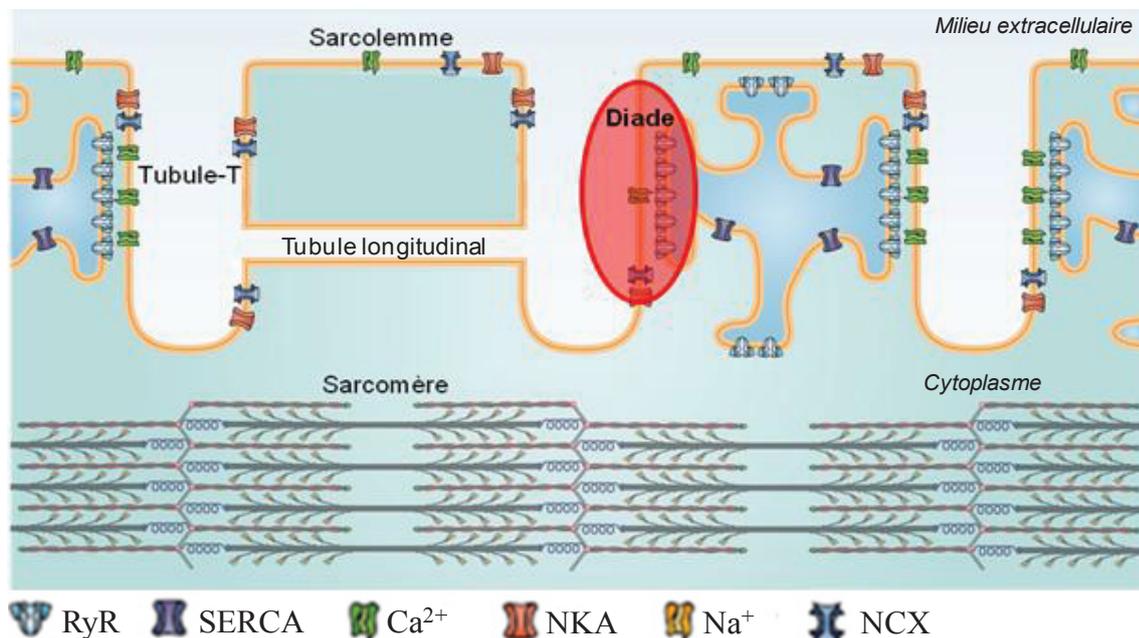


Figure H-14 : Représentation schématique d'une diade dans un cardiomyocyte ventriculaire. Le couplage excitation-contraction est possible grâce à la propagation du PA le long du sarcolemme et des tubules-T jusqu'au cœur du myocyte. La structure formée par la proximité entre les tubules-T et les cisternes du réticulum sarcoplasmique, appelée diade, permet une communication fonctionnelle entre les DHPRs (Ca^{2+}) et les récepteurs à la ryanodine (*RyR*). D'autres protéines participent à l'homéostasie calcique comme l'échangeur NCX, les SERCA, et les pompes NA/K (*NKA*) (Modifié d'après Louch et al., 2010).

iv. Les cavéoles

Les cavéoles sont de petites invaginations membranaires de 50 à 100 nm de diamètre, constituées, entre autres, de protéines particulières, les cavéolines (Cohen et al., 2004). Leur constitution en glycosphingolipides, sphingomyélines et en cholestérol font de ces cavéoles des micro-domaines particuliers nécessaires à la localisation et au fonctionnement de certaines protéines comme les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs tyrosines kinases (Galbiati et al., 2001) (Figure H-15).

Les cavéolines de type 3 sont les isoformes spécifiquement exprimées dans les cellules musculaires. Elles participent à la formation des tubules transverses (Bonilla et al., 1981), à la

transduction de signaux et à la régulation fonctionnelle d'un complexe protéique lié à la dystrophine, le « *Dystrophin-Glycoprotein Complex* » ou DGC (Song et al., 1996).

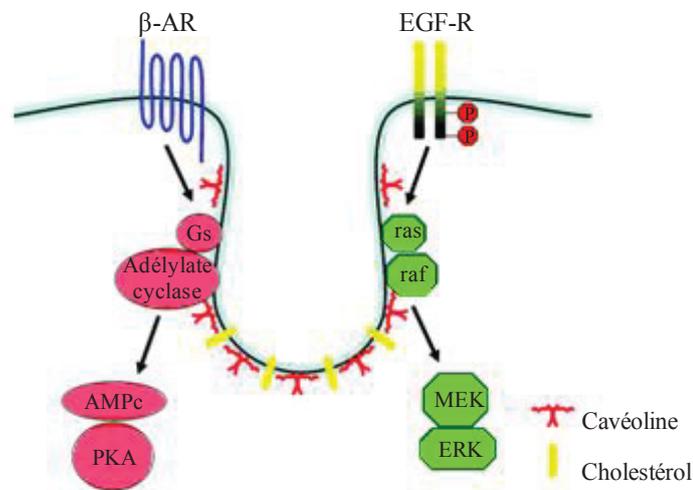


Figure H-15 : Représentation schématique de transduction de signaux à partir d'une cavéole. Après avoir été stimulé, le récepteur β -adrénergique (récepteur couplé à une protéine G_s , en bleu) active l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc. Ce second messenger va activer les protéines kinases A (PKA) qui peuvent alors phosphoryler leurs cibles. De même, le récepteur EGF-R (*Epidermal Growth Factor Receptor*) une fois stimulé entraîne une cascade d'activation protéique (ras, raf...).

(D'après Cohen et al., 2004)

v. Les disques intercalaires

Les disques intercalaires sont des liaisons intercellulaires constituées de *zonula adhaerens*, de desmosomes et de jonctions communicantes. Les *zonula adhaerens* permettent le couplage mécanique entre les myocytes, les desmosomes assurent la cohésion cellulaire *via* leurs filaments intermédiaires et les jonctions communicantes sont des synapses électriques pour le couplage des cardiomyocytes car elles laissent transiter les ions et donc les PA (Gourdie et al., 1998).

b. Les myofibrilles

Les myofibrilles sont composées d'une succession de sarcomères, unités contractiles de la cellule musculaire (Katz, 1992). Ces sarcomères, délimités par deux stries Z, sont constitués de protéines contractiles, l'actine et la myosine, organisées en filaments fins et épais qui donnent l'aspect strié aux cellules. Effectivement, ils sont arrangés en une alternance de bandes I (isotropiques, claires) où sont situés les filaments fins et de bandes A

(anisotropiques, sombres) contenant les filaments épais qui se rejoignent dans la bande H au centre du sarcomère (Figure H-16).

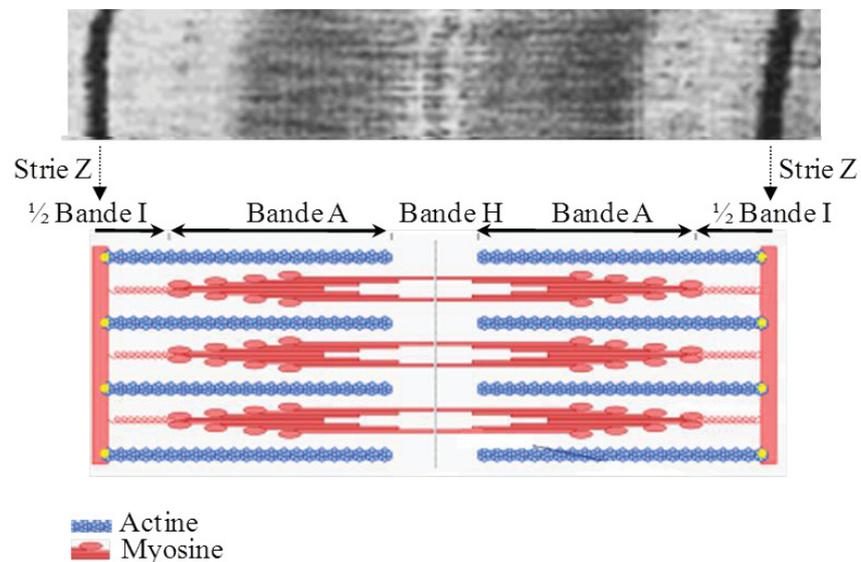


Figure H-16 : Structure d'un sarcomère. En haut, vue longitudinale d'un sarcomère en microscopie électronique à transmission. En bas, représentation schématique du sarcomère. (D'après le site internet www.wikipedia.org)

i. Les filaments épais de myosine

Ces filaments sont constitués de myosines qui sont des molécules cytoplasmiques en forme de bâtonnet, d'une longueur de 180 nm. Cette protéine est un hexamère composé de deux chaînes lourdes entrelacées de 200 kDa chacune (MHC : « *Myosin Heavy Chain* ») et de deux paires de chaînes légères de 20 kDa chacune (MLC : « *Myosin Light Chain* »), l'une dite essentielle (ELC) et l'autre dite régulatrice (RLC). Les chaînes lourdes peuvent se diviser en deux parties (Figure H-17) :

- La queue ou méromyosine légère qui est fibrillaire à l'extrémité C-terminale.
- La tête ou méromyosine lourde qui porte les chaînes légères et l'activité enzymatique ATPasique de la molécule de myosine à l'extrémité N-terminale.

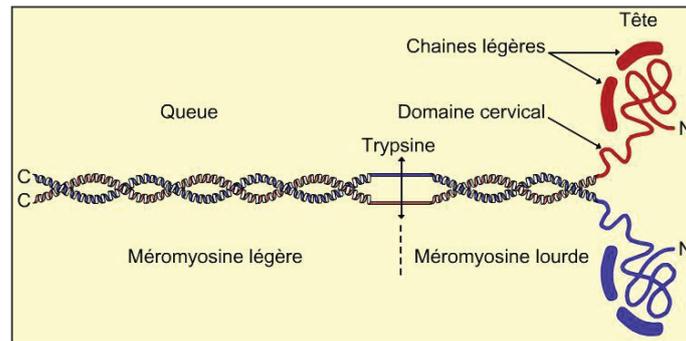


Figure H-17 : Structure schématique de la molécule de myosine.
(D'après le site internet www.snv.jussieu.fr)

Plusieurs molécules de myosine sont nécessaires à la formation d'un filament épais. Les parties caudales se réunissent parallèlement pour se rejoindre au niveau de la bande H et les têtes de myosine dépassent en périphérie pour se lier aux filaments d'actine. Enfin les molécules de myosine sont disposées en deux groupes têtes-bêches dont la partie centrale est dépourvue de tête de myosine (Figure H-18).

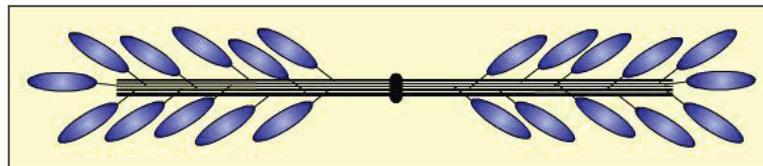


Figure H-18 : Structure schématique d'un filament épais de myosine.
(D'après le site internet www.snv.jussieu.fr)

ii. Les filaments fins

Ces filaments sont des homopolymères d'actines globulaires qui sont des protéines cytoplasmiques de 42 kDa (Figure H-19). Les molécules d'actine se polymérisent spontanément pour former des filaments linéaires d'actine F (Filamenteuse) qui s'associent par paire.

D'autres molécules sont constitutives de ces filaments fins tels que la tropomyosine et le complexe de troponines (Solaro et al., 1998, pour revue).

- La tropomyosine est une protéine homo- ou hétérodimérique en forme d'hélice qui s'étend sur sept molécules d'actine.
- Le complexe de troponines est composé de troponines T qui lient le complexe à l'extrémité de la tropomyosine, de troponines I qui ont une fonction inhibitrice de

l'activité ATPasique de la myosine, et de troponines C qui possèdent quatre sites de liaison aux ions calcium.

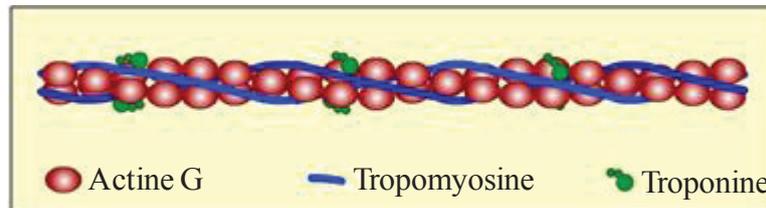


Figure H-19 : Structure schématique d'un filament fin.

(D'après le site internet www.snv.jussieu.fr)

c. Le cytosquelette

Le cytosquelette du cardiomyocyte est composé de compartiments myofibrillaires et extra-myofibrillaires (cytoplasmiques) (Figure H-20).

i. Le compartiment myofibrillaire

Le compartiment myofibrillaire est organisé en une succession de sarcomères, comme vu précédemment, responsable de la contraction cellulaire. Un certain nombre de protéines, associées à la ligne Z, sont en relation avec le sarcolemme. Il s'agit de la taline, de la métavinculine, de la MLP (Muscle Lim Protein), des intégrines (Chen et Chien, 1999) et d'un complexe membranaire, le « *Dystrophin-Glycoprotein Complex* » (DGC) associé à la dystrophine (Campbell, 1995, pour revue). Ce DGC est constitué d'un certain nombre d'éléments protéiques (laminine, dystroglycanes, sarcoglycanes, sarcospan, dystrobrevine, syntrophines, « *Nitric Oxyde synthase* », syncoiline et cavéoline 3) qui relie les filaments d'actine du cytosquelette à la matrice extracellulaire à travers le sarcolemme (Figure H-20).

ii. Le compartiment extra-myofibrillaire

Le compartiment extra-myofibrillaire (cytoplasmique) est constitué de filaments intermédiaires, des microtubules et des microfilaments d'actine.

- Les filaments intermédiaires, composés de desmine, forment un lien entre deux myofibrilles adjacentes et le sarcolemme. Ils entourent aussi les disques Z et les desmosomes.
- Les microtubules sont des assemblages d'hétéro-dimères de tubulines α et β associés à d'autres protéines telles que les MAPS (*Mitogen-Activated-Proteins*) (Wade et al., 1990).

Le réseau de microtubules entoure le noyau et les myofibrilles, mais il est aussi sous-membranaire pour contribuer à la cohésion de l'ensemble du cytoplasme.

- Les microfilaments d'actine participent à la forme, et à la mobilité cellulaire, ainsi qu'au maintien de la viscoélasticité cytoplasmique.

Les trois réseaux (filaments intermédiaires, microtubules et filaments d'actine) établissent et maintiennent l'architecture interne du cytoplasme, et déterminent la forme cellulaire.

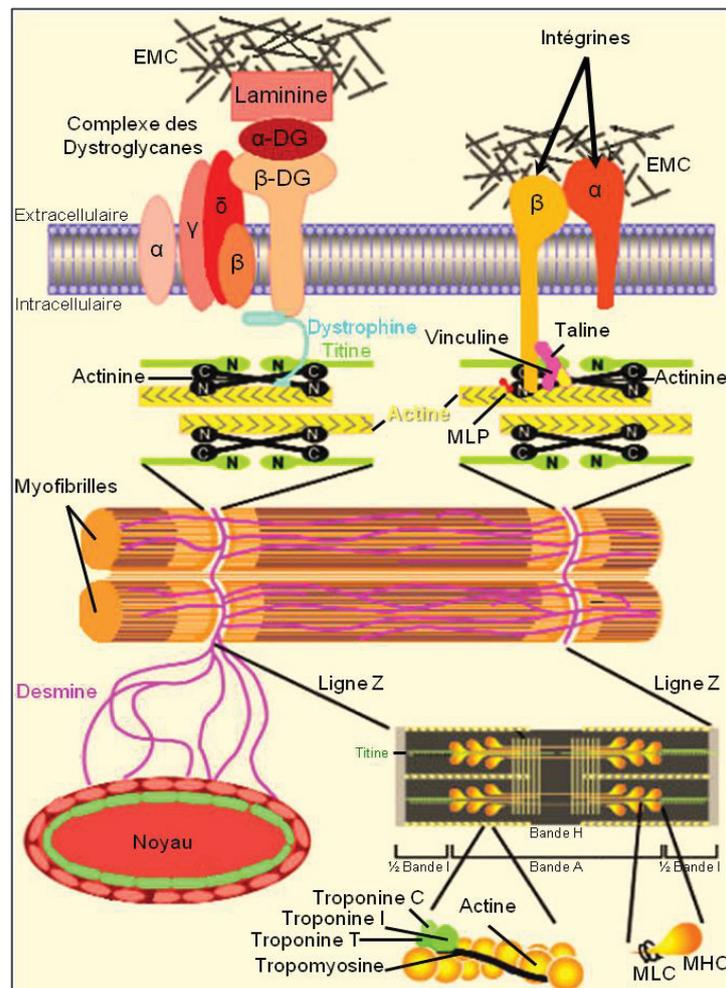


Figure H-20 : Représentation du cytosquelette dans un cardiomyocyte.
(D'après Chen et Chien, 1999)

3- Propriétés électriques

a. Le potentiel membranaire de repos

Le potentiel membranaire de repos représente la polarisation électrique de la membrane plasmique cellulaire. C'est une différence de potentiel entre le cytoplasme et le milieu

extracellulaire qui est fonction des propriétés physicochimiques du sarcolemme, ainsi que de sa constitution en protéines transmembranaires. La bicouche lipidique de la membrane plasmique lui confère une propriété indispensable à l'établissement d'une différence de concentrations ioniques de part et d'autre du sarcolemme : elle est imperméable aux ions. Cependant, dans cette bicouche lipidique, des pompes à ions (pompes Na/K, et calciques par exemple) existent et permettent de créer et de maintenir cette différence en faisant entrer des ions K^+ et sortir des ions Na^+ et Ca^{2+} . Ainsi, la membrane joue le rôle d'un condensateur et les pompes celui d'un générateur. De ce fait, la face externe est chargée positivement alors que la face interne est négative créant un gradient électrique. Les protéines transmembranaires, et principalement les canaux ioniques, autorisent une perméabilité sélective et/ou transitoire des ions à travers la membrane plasmique. Cette caractéristique fait varier le potentiel de membrane en fonction des canaux activés (Figure H-21). Au repos, le sarcolemme est plus perméant aux K^+ par les canaux potassiques de type 1. Sa polarisation tend donc vers le potentiel d'équilibre des ions K^+ , et lui confère une valeur comprise entre -80 et -90 mV chez les cardiomyocytes ventriculaires.

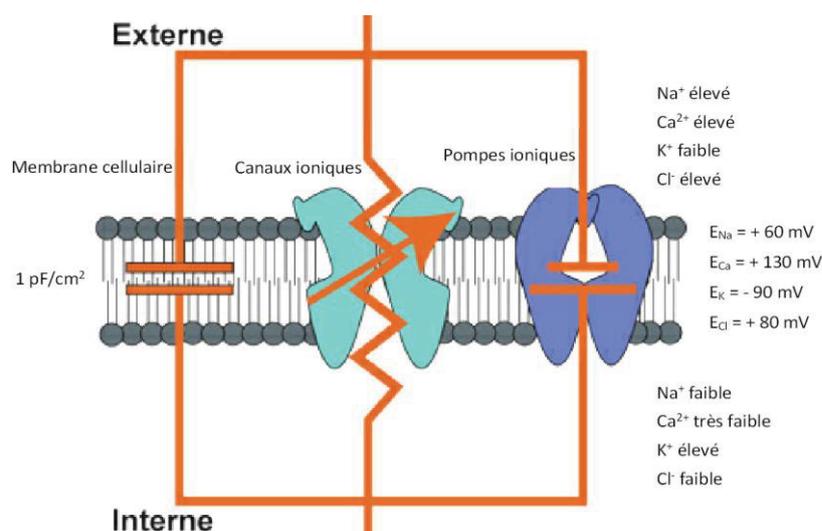


Figure H-21 : Circuit électrique équivalent de la membrane plasmique. La membrane se comporte comme un condensateur (C_m) monté en parallèle avec des résistances variables qui sont fonctions de l'ion considéré (Na^+ , K^+ , Cl^- et Ca^{2+}). Au repos, le potentiel membranaire tend vers la pile au potassium (E_K) de -90 mV.

(Modifié d'après le site internet http://www.apteronote.com/revue/neurone/article_79.shtml, Erik Harvey-Girard)

b. Le potentiel d'action

Le potentiel d'action (PA) est une variation locale et rapide du potentiel de membrane due à des changements de perméabilité ionique transmembranaire principalement sodique, calcique et potassique.

Le PA du cardiomyocyte ventriculaire se déroule en quatre phases successives (Figure H-22) :

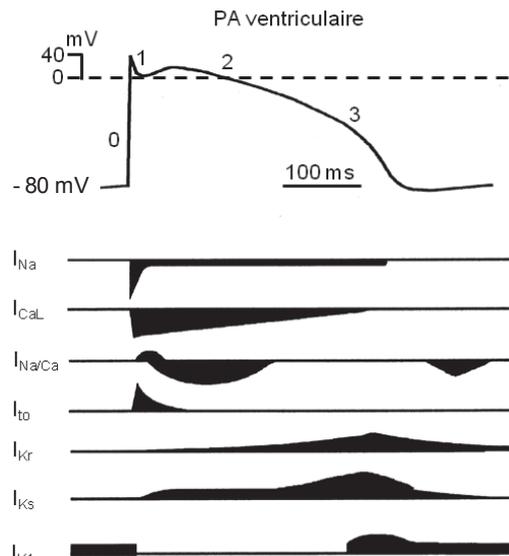


Figure H-22 : Représentation schématique d'un potentiel d'action d'un cardiomyocyte ventriculaire. Le PA ventriculaire se déroule en quatre phases successives (0, 1, 2, 3). Les différentes composantes ioniques, entrantes ou sortantes, sont figurées en dessous du PA. Les courants vers le bas correspondent à des courants entrants de charges positives, et ceux vers le haut à une sortie.

(Modifié d'après Snyders, 1999)

- La phase 0 ou de dépolarisation. Le potentiel de membrane atteint le seuil d'activation des canaux sodiques qui génèrent un courant entrant. Comme la perméabilité au sodium est supérieure à celle du potassium, le potentiel de membrane tend vers la pile au sodium, +60 mV. Déjà à -40 mV, les canaux calciques de type L (DHPRs) s'activent et renforcent le phénomène (pile au calcium environ +130 mV).
- La phase 1 ou de repolarisation précoce. Les canaux sodiques s'inactivent, empêchant l'entrée de Na^+ . En même temps, les canaux potassiques I_{to} s'ouvrent et amorcent une repolarisation membranaire qui tend vers des valeurs plus négatives (pile au potassium environ -90 mV).

- La phase 2 ou de plateau. Les DHPRs maintiennent une phase de dépolarisation de plusieurs millisecondes.
- La phase 3 ou de repolarisation. Les DHPRs s'inactivent progressivement, et les canaux potassiques, principalement de types « rapide ou r » et « lent ou s » ramènent le potentiel de membrane à sa valeur de repos (Zhou et al., 1998).

4- Les canaux ioniques du sarcolemme

Les canaux ioniques responsables de l'activité électrique du cardiomyocyte ventriculaire étant nombreux, je ne décrirai dans ce manuscrit que les principaux acteurs du couplage excitation-contraction.

a. Le canal sodique rapide

Le canal sodique rapide joue un rôle déterminant dans le déclenchement et le déroulement du PA des cardiomyocytes ventriculaires (Balsler, 1999). Son activation à -70 mV induit une dépolarisation membranaire très rapide et ses propriétés d'inactivation contrôlent en partie la durée du PA (Coraboeuf et al., 1979). C'est une protéine dépendante du voltage qui est composée de plusieurs sous-unités (Balsler, 1999) :

- La sous-unité α intègre le pore du canal. Elle comprend quatre domaines membranaires composés chacun de six segments transmembranaires. Une boucle « p » entre les segments 5 et 6 des quatre domaines lui attribue un filtre de sélectivité aux ions sodium. Une autre boucle entre les domaines 3 et 4 est impliquée dans le processus d'inactivation des canaux sodiques.
- Les sous-unités β ont une fonction de régulation de la protéine.

Les canaux $\text{Na}_v 1.5$, résistants à la tétrodotoxine (TTX : inhibiteur des canaux sodiques, Diss et al., 2004), sont les isoformes cardiaques prédominantes regroupées au niveau des disques intercalaires et des tubules-T (Dominguez et al., 2008).

b. Le canal calcique de type L ou DHPR

Les DHPRs (*DiHydroPyridine Receptors*) sont des canaux calciques dépendants du voltage dont le seuil d'activation est estimé à -40 mV. Leur inactivation est un facteur déterminant dans la limitation de la durée du PA d'une part, et du déclenchement de la phase de repolarisation d'autre part (Lipp et al., 1987). Elle est dite biphasique avec une phase

rapide dépendante du calcium et une phase lente liée au potentiel membranaire. L'inactivation rapide est principalement contrôlée par le calcium libéré du RS selon un mécanisme de rétrocontrôle négatif possible grâce à la proximité des DHPRs avec les récepteurs à la ryanodine. Ce canal calcique de type L est principalement localisé dans la membrane des tubules-T pour permettre l'entrée du calcium dans le cytoplasme au plus près des récepteurs à la ryanodine durant le plateau du PA.

Ce canal calcique est la résultante de l'assemblage de quatre sous-unités, α_1 ; α_2 ; β et δ , ayant une structure différente. La sous-unité α_1 est organisée en quatre domaines constitués chacun de six segments transmembranaires. Elle forme le pore du canal et porte, au niveau de son segment S4, la sensibilité au voltage. Sur son domaine IV est situé le site de fixation à plusieurs molécules inhibitrices des DHPRs, comme les dihydropyridines (nifédipine par exemple), les benzodiazépines, et les phénylalkylamines. La sous-unité α_1 est également liée à trois sous-unités régulatrices, α_2 et δ extracellulaires et β intracellulaire, qui lui confèrent certaines propriétés électrophysiologiques comme l'inactivation dépendante du voltage et du calcium (Singer et al., 1991).

c. Les canaux chlorures

Ces protéines constituent une large famille de canaux ioniques qui sont présents dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Ils participent à de nombreux phénomènes physiologiques tels que la régulation du volume cellulaire, le transport transépithélial, et la régulation de l'excitabilité cellulaire (Jentsch et al., 2002).

i. Le canal chlorure-calcium dépendant

Le canal chlorure-calcium dépendant ou ClCa est activé par le calcium intracellulaire. Il a été enregistré dans les cellules ventriculaires mais son identité moléculaire est pour l'instant inconnue (Jentsch et al., 2002). Il participerait à la phase précoce de repolarisation membranaire durant le potentiel d'action (Hiraoka et Kawano, 1989)

ii. Le canal chlorure « *swell* »

Ce canal ionique est activé par le gonflement cellulaire et a été localisé dans toutes les cellules cardiaques (Jentsch et al., 2002). Il est impliqué dans la régulation du volume cellulaire suite à un choc hypotonique. Néanmoins, l'identité moléculaire de cette protéine ainsi que sa régulation restent encore très controversées.

iii. Le canal chlorure « Clir »

Ce canal ionique a été identifié dans les cellules ventriculaires de souris. Il jouerait un rôle dans le maintien du potentiel de repos et le contrôle de l'homéostasie chlorure mais ses fonctions restent encore à éclaircir (Duan et al., 2000).

d. Les canaux potassiques

Ces protéines forment une large famille de canaux ioniques qui interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques comme la transmission de la dépolarisation dans les cellules excitables, le maintien du potentiel membranaire, la sécrétion cellulaire et la genèse du rythme.

i. Le canal potassique de type 1

C'est le principal canal ionique qui maintient le potentiel de repos membranaire dans les cellules cardiaques. C'est un homotétramère dont l'expression est plus importante dans les cellules ventriculaires qu'auriculaires (Lopatin et Nichols, 2001).

ii. Le canal potassique transitoire

Le canal potassique transitoire ou « to » s'exprime dans tout le tissu cardiaque. Il s'active suite à une dépolarisation membranaire, et présente une activation et une inactivation rapides (Näbauer et al., 1996).

iii. Le canal potassique de type rapide

Cette protéine voltage dépendante produit un courant potassique « I_{Kr} ». C'est un homotétramère qui est caractérisé par une activation rapide. Elle participe à la phase de repolarisation membranaire dans le PA ventriculaire (Sanguinetti et al., 1990).

iv. Le canal potassique de type lent

Ce canal ionique, dépendant du voltage, génère le courant potassique « I_{Ks} ». C'est un homotétramère indispensable au processus de repolarisation membranaire lors du PA cardiaque (Barhanin et al., 1996).

5- Les pompes et échangeurs du sarcolemme

a. L'échangeur sodium/calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou NCX)

Cet échangeur est présent dans le sarcolemme de toutes les cellules cardiaques car il est le principal mécanisme d'extrusion du calcium vers le milieu extracellulaire. Effectivement, il est important pour la régulation de la concentration calcique intracellulaire et par conséquent, il est indispensable dans le couplage excitation-contraction ainsi que dans la durée du PA cardiaque (Choi et al., 2000).

Le fonctionnement de l'échangeur sodium/calcium nécessite l'utilisation de l'énergie du gradient sodique membranaire. Le potentiel d'inversion de cette protéine est estimé entre -10 et -50 mV. Pour des potentiels inférieurs au potentiel d'inversion, elle fait sortir dans le milieu extracellulaire un ion calcium contre une entrée de trois ions sodium dans le cytoplasme et inversement pour des potentiels membranaires supérieurs au potentiel d'inversion (Egan et al., 1989).

b. Les pompes

i. La pompe sodium/potassium (Na^+/K^+)

La pompe Na^+/K^+ est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α qui possède des fonctions enzymatiques et de transporteurs d'ions, et d'une sous-unité β régulatrice. Cette enzyme membranaire hydrolyse une molécule d'ATP (Adénosine Triphosphate) en ADP (Adénosine Diphosphate + P_i , Phosphate inorganique). Cette énergie est utilisée pour faire sortir trois ions sodium dans le milieu extracellulaire et faire entrer deux ions potassiques dans le cytoplasme (Apell et Karlish, 2001).

ii. La pompe calcique PMCA

La pompe calcique PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPase*) est une protéine d'environ 130 kDa possédant dix domaines transmembranaires. Son activité est stimulée par la calmoduline. En hydrolysant une molécule d'ATP en ADP + P_i , elle transporte un ion calcium vers le milieu extracellulaire contre son gradient de concentration (Monteith et al., 1998).

6- Les canaux ioniques du réticulum sarcoplasmique

a. Les récepteurs à la ryanodine de type 2 ou RYR2s

Les récepteurs à la ryanodine sont de grosses protéines de deux mégadaltons organisées en homotétramères et insérées dans la membrane du réticulum sarcoplasmique jonctionnel. Ils sont exprimés sous trois isoformes. Les RYR2s sont exprimés dans le cœur et le muscle lisse ; les RYR1s sont présents essentiellement dans le muscle squelettique et les RYR3s sont localisés dans le cerveau, le muscle squelettique en développement, certains muscles lisses et les cellules non musculaires. Les RYR2s sont organisés en clusters qui font face aux DHPRs situés à environ 12 nm dans les tubules-T (Figure H-23). Contrairement aux muscles squelettiques, chaque DHPR ne fait pas forcément face à un RYR2, leur position est beaucoup plus aléatoire en raison de l'absence de lien physique entre les deux canaux (Sun et al., 1995).

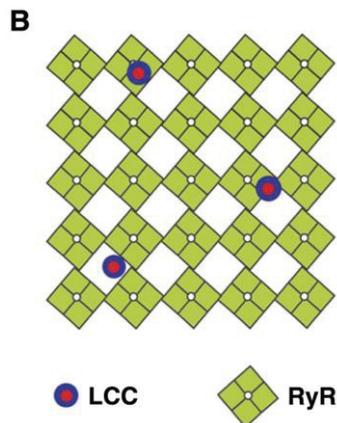


Figure H-23 : Représentation schématique de l'organisation des RYR2s cardiaques. LCC : « *L-type Ca²⁺ channels* » ou DHPRs; RYR: récepteur à la ryanodine.

(Modifié d'après Cheng et Lederer, 2008)

Même s'il existe trois isoformes, seul le type 2 est exprimé dans le cœur. La partie C-terminale de ces protéines forme le pore du récepteur par lequel les ions calcium du RS transitent vers le cytoplasme. La partie N-terminale cytosolique interagit avec de nombreuses protéines cruciales pour la régulation de ces récepteurs (Figure H-24) (Bers, 2004). Les principales protéines caractérisées sont :

- La calstabile 2 (FKBP 12.6) qui est une enzyme se liant à chaque monomère de RYR2s. Dans cette configuration, elle favorise l'état fermé du canal et sa dissociation augmente la probabilité d'ouverture du RYR2 (Brillantes et al., 1994).
- La calmoduline qui est une protéine se liant aux ions calciques et à chaque monomère des RYR2s. Elle a une action inhibitrice sur le canal.

- La protéine kinase A (PKA) et la kinase II dépendante de la calmoduline (CamKII). La PKA phosphoryle les RYR2s sous une stimulation β -adrénergique induisant une dissociation de la calstabile 2 avec le canal qui favorise la probabilité d'ouverture de la protéine. La CamKII a la même action mais plus modérée que la PKA car elle n'engendre pas la dissociation de la calstabile 2 (Witcher et al., 1991).
- Une protéine d'ancrage, mAKAP, des phosphatases 1 (PP1) et 2A (PP2A), et une phosphodiesterase (PDE4).

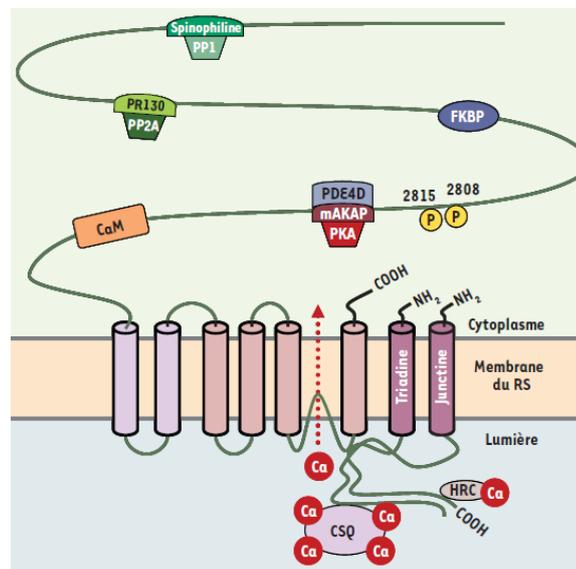


Figure H-24 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire formé par le récepteur à la ryanodine et ses protéines associées. CaM : Calmoduline ; CSQ : Calséquestrine ; FKBP : calstabile 2 ; HRC : « *Histidine Rich Ca²⁺-binding protein* ». (Modifié d'après Lacampagne et al., 2008)

Les récepteurs à la ryanodine de type 2 interagissent également avec des protéines régulatrices contenues dans le RS telles que la calséquestrine et la HSR (*Histidine Rich Ca²⁺-binding protein*) qui ont un fort pouvoir chélateur du calcium et permettent de maintenir une forte concentration calcique dans le RS (environ 1 mM). Certaines protéines transmembranaires du RS, comme la triadine et la junctine, interviendraient aussi dans la régulation des RYR2s mais leur rôle précis n'a pas encore été identifié. Les RYR2s portent également des sites d'activation par fixation d'ATP et de calcium. En réalité, ces protéines possèdent deux sites de fixation pour le calcium, l'un à haute affinité qui est responsable de l'ouverture du pore pour de faibles concentrations de calcium cytoplasmique (1-10 μ M) et

l'autre à moindre affinité qui les inactive pour des concentrations plus élevées en ions Ca^{2+} (1-10 mM) (Lacolley et al., 2007).

Les RYRs de type 2 participent à deux phénomènes importants dans les cardiomyocytes ventriculaires qui seront développés un peu plus loin dans le manuscrit : les libérations spontanées et localisées de calcium dans le cytoplasme ou « *sparks* » et le couplage excitation-contraction. Les *sparks* sont des libérations de calcium du RS vers le cytoplasme par les RYR2s qui peuvent être générées par la cellule au repos. Le couplage excitation-contraction est le mécanisme au cours duquel l'entrée de calcium par les DHPRs entraîne une libération massive des stocks de calcium contenu dans le RS par les RYR2s au voisinage des myofibrilles pour générer un raccourcissement des sarcomères et donc la contraction.

b. Les récepteurs aux inositols trisphosphates (IP3)

Les récepteurs à l'IP3 (IP3Rs) sont des canaux calciques ligand-dépendants localisés à la membrane du RS. Ce sont des homotétramères activés par la liaison de l'inositol 1-, 4-, 5-trisphosphate (IP3) sur la partie N-terminale cytoplasmique du canal. L'IP3 est un second messenger provenant du métabolisme du phosphatidylinositol-4-5 bisphosphate (PIP2) (Berridge et Irvine, 1984). Ces IP3Rs possèdent également des sites de fixation au calcium, à l'ATP et à la calmoduline (Figure H-25).

Chez les mammifères, il existe trois isoformes (IP3R-1, IP3R-2, et IP3R-3) qui possèdent une homologie de séquence d'environ 65% et un poids moléculaire de 300 kDa. Ces canaux calciques sont trouvés dans divers tissus tels que le cerveau, les tissus nerveux, les muscles squelettiques au sein desquels ils sont impliqués dans des processus biologiques variés comme la sécrétion d'hormones, la prolifération cellulaire et le couplage excitation-transcription (Balghi et al., 2006a).

L'implication des IP3Rs dans le couplage excitation-contraction cardiaque est controversée (Lipp et al., 2000 ; Woodcock et al., 1998). Bien que le type 1 soit présent dans le cœur, c'est l'isoforme 2 qui est majoritairement trouvée dans les cardiomyocytes avec une expression six fois plus importante dans les cellules atriales (Marks, 2000). Ils seraient impliqués dans les événements de libération calcique spontanée et localisée (*sparks*) (Lipp et al., 2002 ; Mackenzie et al., 2002) et moduleraient le couplage excitation-contraction (Lipp et al., 2000). Leur rôle dans les cardiomyocytes ventriculaires reste à clarifier. Ils pourraient participer au CICR ou aux « *sparks* » mais cela doit encore être déterminé (Song et al., 2005).

La figure H-26 montre une localisation éventuelle de ces canaux proche des RYRs de type 2 qui les ferait participer au CICR (Song et al., 2005).

7- La pompe SERCA du réticulum sarcoplasmique

La pompe SERCA (*Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) est ubiquitaire et existe sous douze isoformes, mais seule la SERCA2a est l'isoforme cardiaque. Elle est localisée sur toute la membrane du RS longitudinal et possède, comme la PMCA, dix segments transmembranaires dont le poids moléculaire total est de 100 kDa. Elle est régulée par une protéine associée, le phospholamban (PLN). Le PLN est un homopentamère qui, lorsqu'il est déphosphorylé, se lie au domaine cytoplasmique et inhibe l'activité ATPasique de la SERCA (Brittsan et al., 2000). Dès que ces PLNs sont phosphorylés par les protéines kinases A (PKA), la SERCA utilise l'énergie obtenue par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP+Pi pour transporter deux ions calcium du cytoplasme vers la lumière du RS (Zhang et al., 2000). Une fois dans le RS, le calcium est séquestré par différentes protéines telles que la calsésquestrine, la calréticuline, la sarcaluménine qui jouent le rôle de chélateur de Ca²⁺.

Les SERCAs peuvent être inhibées par différentes molécules telles que la thapsigargine (Inesi et Sagara, 1994) et l'acide cyclopiazonique (Demaurex et al., 1992) qui seront utilisés lors de cette étude. Cette inhibition diminue le phénomène de relaxation des cardiomyocytes et provoque une libération passive du calcium du RS vers le cytoplasme par les RYR2s.

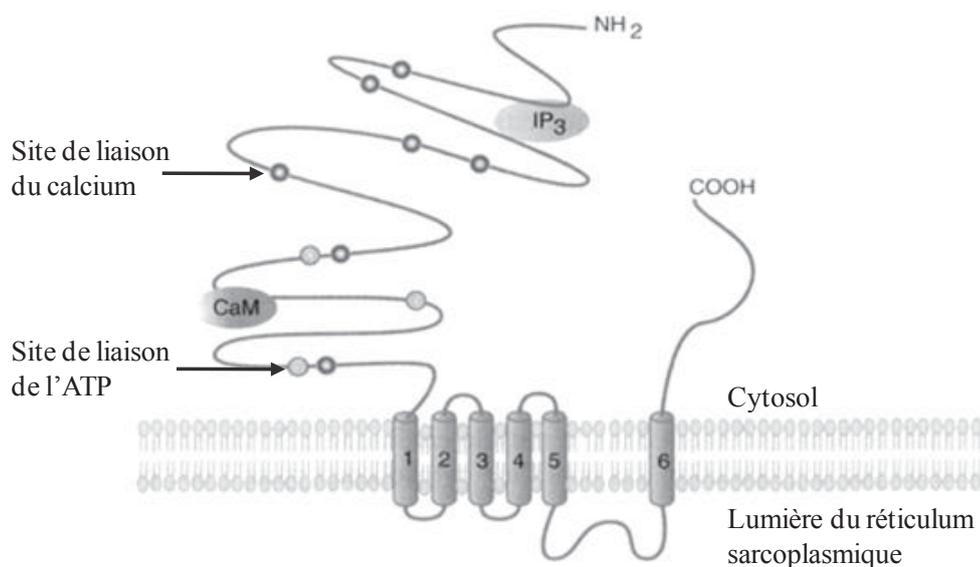


Figure H-25 : Structure du monomère du récepteur à l'IP3.

(Selon le site internet www.pharma.uhp-nancy.fr/formation/cours/msdm/Proteines%20G.pdf)

8- Les systèmes tampons du calcium

a. Les mitochondries

Les mitochondries sont des organites intracellulaires dont la taille est de l'ordre du micromètre. Dans le cardiomyocyte ventriculaire, elles occupent 35% du volume cellulaire. Grâce au cycle de Krebs et à la respiration mitochondriale, elles produisent une grande quantité d'énergie sous forme d'ATP par le processus de phosphorylation oxydative.

Néanmoins, les mitochondries ont d'autres fonctions. Elles participent activement à l'homéostasie calcique cellulaire par leur capacité à séquestrer les ions Ca^{2+} (Rizzuto et al., 1992). Effectivement, dans les cardiomyocytes, certaines mitochondries sont longitudinales et sont localisées entre les myofibrilles pour tamponner les petites variations intracellulaires de calcium produites, par exemple lors des « sparks » (Isaeva et Shirokova, 2003).

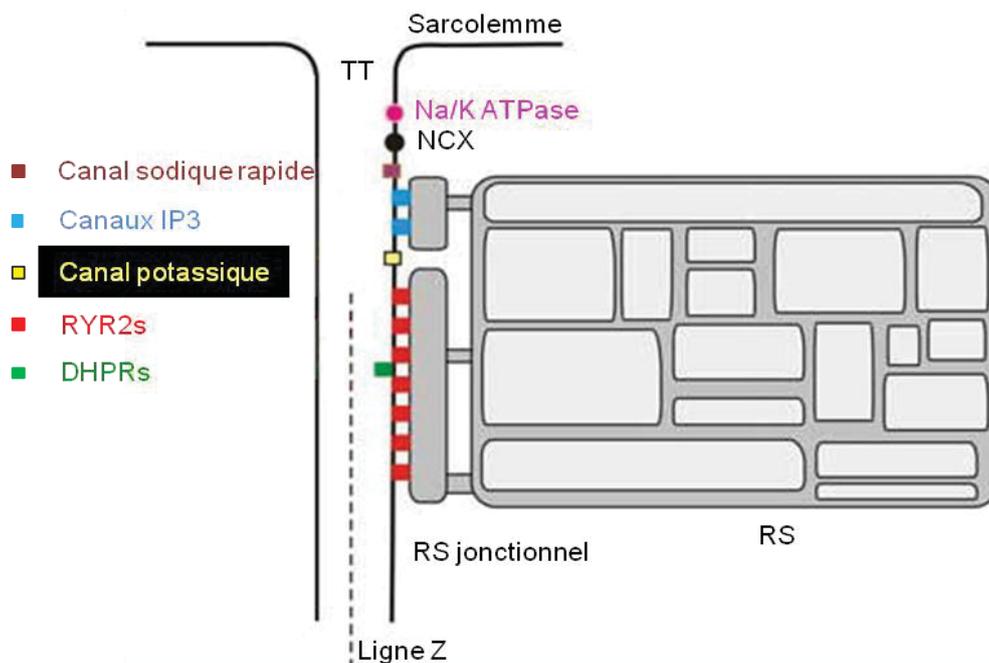


Figure H-26 : Représentation des canaux ioniques et des transporteurs clés dans le couplage excitation-contraction du cardiomyocyte ventriculaire. TT : tubules-T ; RS : réticulum sarcoplasmique.

(Modifié d'après Song et al., 2005)

Elles interviennent également dans des phénomènes comme l'apoptose où cette capacité à séquestrer le calcium est augmentée pour libérer le cytochrome c qui est une protéine pro-apoptotique (Green et Reed, 1998). Enfin, dans les myotubes déficients en dystrophine, leur

pouvoir tampon est augmenté pour tenter de diminuer la concentration calcique cytosolique basale qui est plus élevée que dans les cellules saines (Vandebrouck et al., 2005).

b. Les calciprotéines cytoplasmiques

La troponine C et la calmoduline sont les deux protéines cytoplasmiques impliquées dans la régulation de la concentration calcique par leur haute affinité à lier les ions Ca^{2+} grâce à leurs domaines « *EF hands* ».

i. La troponine C

La troponine C fait partie du complexe de troponines lié aux myofilaments fins d'actine par la tropomyosine. Elle possède deux domaines « *EF hands* » et peut donc lier quatre ions calciques. Lors de l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium induite par une dépolarisation membranaire, la fixation des quatre ions sur la troponine C, via les domaines « *EF hands* », provoque un changement de la conformation de la protéine et donc du complexe de troponines. L'inhibition exercée par la troponine I est alors levée grâce au déplacement de la troponine T qui tire sur la tropomyosine et démasque alors les sites de liaison de l'actine avec la myosine. C'est le début de la contraction musculaire.

ii. La calmoduline

La calmoduline est une protéine cytosolique exprimée dans toutes les cellules. Elle peut fixer jusqu'à quatre ions calciques, mais comme elle est plus faiblement exprimée que la troponine C, elle a un pouvoir tampon réduit. Néanmoins, une fois liée au calcium, la calmoduline change de conformation et peut ainsi interagir avec d'autres protéines pour induire des réponses spécifiques comme des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, méthylation, et clivage protéolytique) (Chou et al., 2001).

9- Le couplage excitation-contraction

a. L'excitation

Le couplage excitation-contraction est le processus physiologique où une excitation électrique (PA) induit une réponse mécanique (contraction). Dans le cardiomyocyte ventriculaire, le PA résulte d'une dépolarisation membranaire qui implique de nombreux canaux ioniques comme cela a été déjà décrit précédemment. Ce PA est une vague de dépolarisation qui parcourt la membrane plasmique et pénètre au cœur de la cellule par les

tubules-T où l'activation des DHPRs permet une entrée de calcium du milieu extracellulaire dans le cytoplasme mais qui n'est pas suffisante pour activer les protéines contractiles. Ce flux calcique diffuse alors jusqu'aux citernes du RS séparées des tubules-T de 12 nm (Cheng et Lederer, 2008) où il active les RYR2s. Chaque RYR2 libère dans le cytosol une petite quantité de calcium stocké dans le RS, appelée « *spark évoqué* », qui active de proche en proche les autres RYR2s. La sommation de ces milliers de *sparks* génère une vague calcique au contact immédiat des myofibrilles. Ce mécanisme est appelé CICR pour « *Calcium-Induced Calcium Release* » car c'est l'entrée de calcium dans le cytosol qui induit la libération des stocks de calcium au plus près des protéines contractiles (Fabiato, 1983). Au niveau des sarcomères, ces ions Ca^{2+} se lient aux troponines C qui changent de conformation et induisent la libération des sites de fixation de la myosine sur l'actine (Figure H-27).

b. La contraction

La contraction cellulaire consiste en un raccourcissement des sarcomères réalisé par un glissement des fibres d'actine sur les filaments de myosine. Ce mécanisme nécessite plusieurs étapes successives. Tout d'abord, le calcium libéré du RS permet la liaison des têtes de myosine sur l'actine. Cette interaction est stabilisée par le départ de l'ADP et du Pi couplés au repos à la myosine, et entraîne un changement de configuration des têtes de myosine avec leur queue. L'angle entre les deux éléments diminue de 90° à 45° . Ce mouvement induit un glissement des myofilaments fins d'actine le long des myosines. Cette conformation stable est appelée *rigor* car elle est à l'origine de la rigidité cadavérique (*rigor mortis*). La liaison actomyosine est ensuite rompue par l'interaction d'une molécule d'ATP sur les têtes de myosine. Le retour à la configuration de repos de la myosine nécessite l'hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi pour que l'angle entre la tête et la queue reprenne sa valeur initiale (Figure H-28).

10- La relaxation myocytaire

Une diminution rapide de la concentration intracellulaire de calcium est à la base de la relaxation myocytaire. Selon l'espèce, 80% à 90% du Ca^{2+} systolique est recapté dans le RS par les SERCA2a. Les 10% à 20% restants sont extrudés de la cellule par les pompes et les échangeurs vus précédemment (majoritairement NCX, PMCA et indirectement la pompe Na^+/K^+). Ainsi les SERCA2a contrôlent la relaxation, le niveau de charge du RS et la concentration intracellulaire en calcium. La fermeture des RYR2s contribue également à diminuer la concentration en Ca^{2+} . Plusieurs mécanismes sont impliqués : l'inactivation de ces

canaux par fixation de calcium, la fermeture des DHPRs, et la déplétion en calcium du RS qui diminue leur probabilité d'ouverture (Stern et Cheng, 2004).

11- Les évènements de libération calcique spontanée et localisée

Les évènements de libération calcique spontanée et localisée sont communément appelés « *sparks* » traduit de l'anglais par « étincelles ». Effectivement, ce sont des libérations de calcium par le réticulum sarcoplasmique qui ont pu être visualisées pour la première fois dans des cardiomyocytes quiescents par la combinaison de la microscopie confocale avec la sonde Fluo-3 comme indicateur des variations calciques intracellulaires (Cheng et Lederer, 2008, pour revue) (Figure H-29).

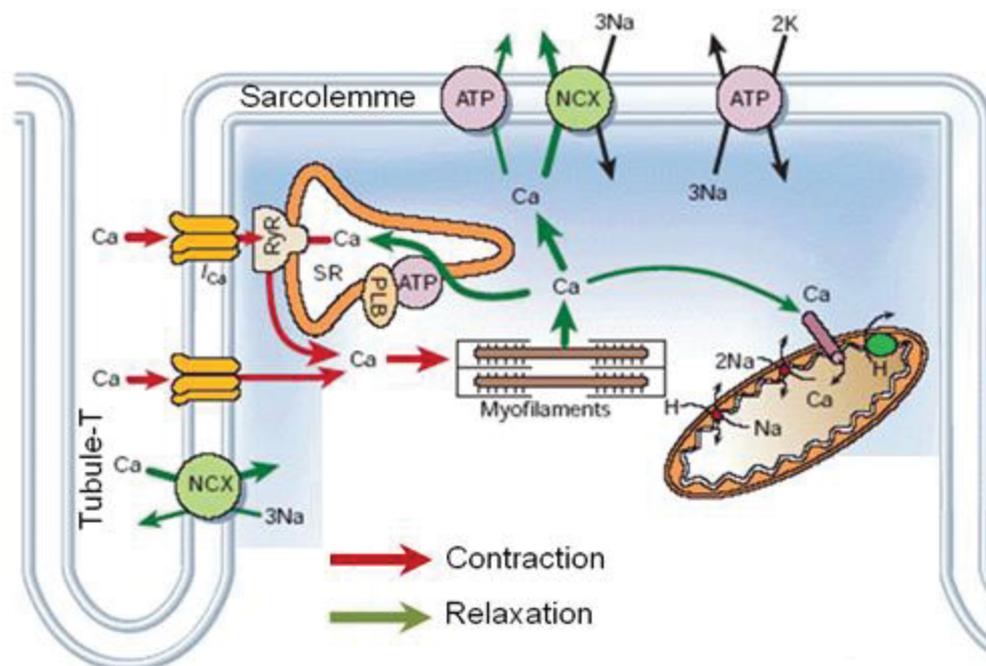


Figure H-27 : Le couplage excitation contraction dans un cardiomyocyte ventriculaire.
(Selon le site internet www.edoc.hu-berlin.de)

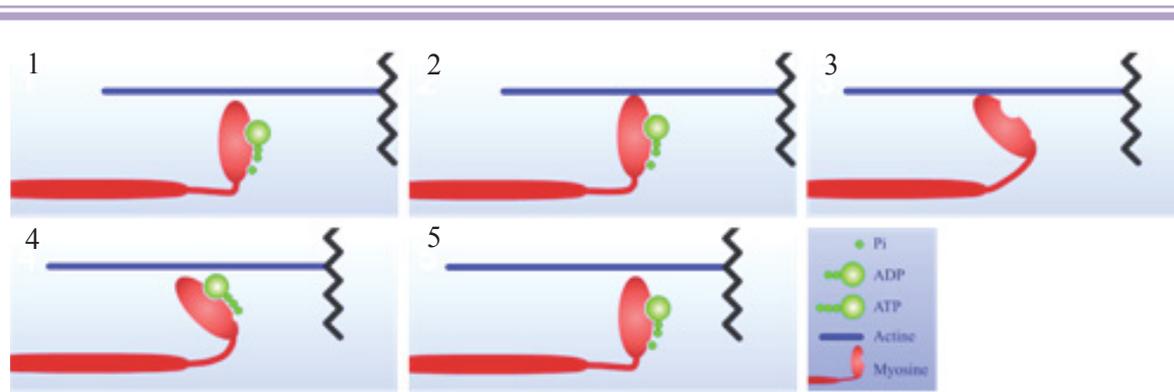


Figure H-28 : Le cycle de la myosine durant le couplage-excitation contraction dans un cardiomyocyte ventriculaire.

1 : Liaison de la myosine à l'actine après libération des sites de liaison par la tropomyosine grâce à l'augmentation du calcium intracellulaire.

2 : Changement de conformation de la tête de myosine par le départ de l'ADP et du Pi et glissement du filament d'actine sur la myosine.

3 : Liaison d'une molécule d'ATP sur la tête de myosine entraînant la dissociation du complexe acto-myosine.

4 et 5 : Hydrolyse de l'ATP induisant un retour de la tête de myosine à sa conformation de repos

(Selon le site internet www.snv.jussieu.fr)

Ces *sparks* ont été observés également dans d'autres types cellulaires tels que les muscles squelettiques (Baylor et al., 2002), les muscles lisses (Burdyga et Wray, 2005), le tissu nerveux (Haak et al., 2001), ainsi que dans certaines cellules non-excitables (Huser et al., 1997).

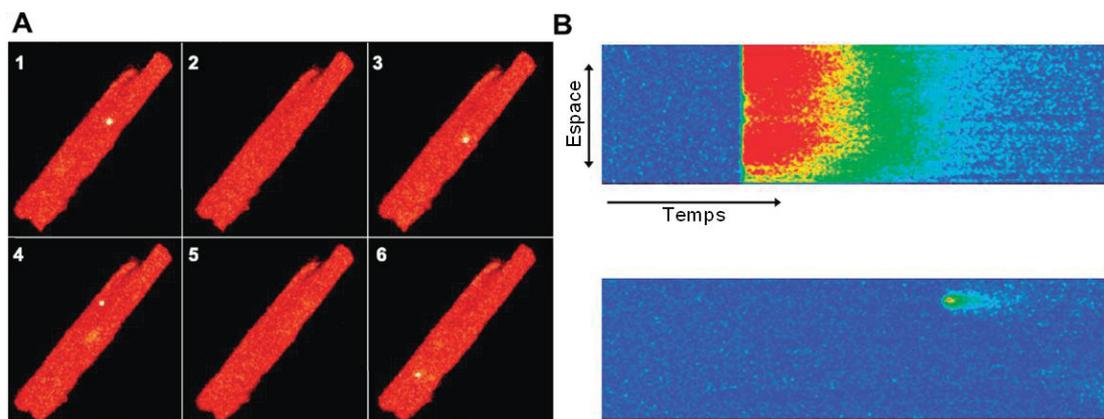


Figure H-29 : Les évènements de libération calcique spontanée et localisée : les *sparks*. A : Images en microscopie confocale de *sparks* dans un cardiomyocyte quiescent (vitesse d'acquisition : 1 image/seconde). B, haut : Acquisition en x, t (le long d'une ligne d'acquisition au cours du temps) d'un PA initié par des *sparks*. B, bas : Acquisition en x, t (le long d'une ligne d'acquisition au cours du temps) d'un *spark*. La vitesse d'acquisition est d'une ligne toutes les deux millisecondes.

(Modifié selon Cheng et al., 1993)

L'existence des *sparks* ne dépend pas d'une entrée de calcium du milieu extracellulaire par les DHPRs ou par toute autre voie du sarcolemme. Ils sont le résultat de l'ouverture des RYR2s dont la probabilité d'ouverture est fonction de nombreux facteurs tels que les concentrations calciques cytosoliques et réticulaires. Leur origine fut démontrée par l'utilisation de drogues comme la caféine qui, en se liant aux RYRs, augmente leur fréquence, et la ryanodine qui diminue le phénomène en inhibant les RYRs. (Lukyanenko et al., 1999). Il a également été observé que lors du couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes, des phénomènes de *sparks* sont provoqués par l'influx calcique provenant des DHPRs, *via* le CICR (« *Calcium Induced Calcium Release* ») (Santana et al., 1996). Par stimulation de proche en proche des RYRs, la sommation de ces *sparks* est à l'origine d'une vague calcique cytoplasmique induisant la contraction (Cannell et al., 1994). Les récepteurs aux IP3 peuvent également intervenir dans les phénomènes de libération calcique spontanée et localisée dans les cellules musculaires. Ils auraient la capacité de recruter les RYRs pour provoquer une libération calcique plus large (Gordienko et Bolton, 2002). Il y aurait donc une interaction entre RYRs et IP3Rs pour moduler l'activité calcique spontanée.

III-La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

1- Aspects cliniques de la pathologie

a. La découverte

La dystrophie musculaire de Duchenne ou DMD fut décrite par Guillaume Duchenne en 1858. Il découvrit que cette pathologie était liée à une dégénérescence du tissu musculaire suivie du développement d'une fibrose mais qui n'était pas associée à une carence nutritionnelle comme l'avait suggéré William John Little et Edouard Meyron (Emery et Emery, 1993). Il observa également que l'hydrothérapie et des massages accompagnés de stimulations électriques amélioraient la condition physique des patients dans les phases précoces de la maladie.

b. La pathologie

La DMD touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles squelettiques, lisses et cardiaques). C'est la plus répandue des myopathies génétiques à transmission récessive liée au chromosome X chez les enfants, avec une incidence d'une naissance sur 3500 : seuls les garçons sont atteints, les femmes sont transmettrices (Emery, 1993).

L'enfant atteint présente peu de signes de la maladie avant l'âge de 3 ans mis à part une marche tardive, des chutes fréquentes et une difficulté à se relever. Au cours du temps, une faiblesse musculaire des membres et du tronc apparaît progressivement et aboutit à la perte de la marche vers 10-12 ans, l'emploi d'un fauteuil roulant devient alors indispensable. Puis l'utilisation des membres supérieurs se limite, et une scoliose souvent grave se développe due à une atteinte des muscles dorsaux. Les muscles respiratoires ne sont pas épargnés et rendent l'enfant particulièrement sensible aux infections broncho-pulmonaires. Effectivement, le monoxyde de carbone a tendance à être retenu dans les poumons et provoque une anoxémie (diminution de la quantité d'oxygène dans le sang). Une défaillance du muscle cardiaque est également observée mais elle est plus progressive et les premiers symptômes ne se manifestent que plus tardivement. Néanmoins, un dépistage précoce est vital dès l'âge de 6-7 ans pour une meilleure prise en charge et une amélioration de l'espérance de vie qui n'est actuellement que de 20 à 30 ans.

Le diagnostic de la DMD se fait par une observation d'un déficit moteur accompagné d'une hypertrophie musculaire. Des prises de sang permettent aussi de déterminer la

concentration en créatine kinase sérique qui est une enzyme musculaire libérée dans le sang lors de lésions musculaires. Enfin, une biopsie musculaire affine le diagnostic et permet d'avérer le cas de dystrophie musculaire de Duchenne.

Toutefois, il n'existe aucun traitement curatif de cette pathologie. Son évolution peut être ralentie grâce à un diagnostic précoce et une prise en charge multidisciplinaire, rapide et régulière : orthopédique, respiratoire, cardiaque... Cette thérapeutique palliative permet à l'enfant de conserver le plus longtemps possible sa qualité de vie en limitant les conséquences de la maladie.

2- Origine génétique

La DMD est la conséquence de l'absence d'une protéine présente dans les cellules musculaires appelée la dystrophine. La dystrophine fut caractérisée en 1987 par le groupe de Kunkel (Hoffman et al., 1987), mais son gène, nommé « DYS », avait été identifié un an plus tôt (Monaco et al., 1986) et localisé sur le chromosome X au locus Xp21. Le gène de la dystrophine est parmi les plus grands connus, avec 2,6 millions de paires de bases et il constitue ainsi 1% du chromosome X (Figure H-30). La partie codante représente environ 14 kilobases et renferme 79 exons séparés par des introns pouvant atteindre 200 kilobases (Koenig et al., 1987). Ainsi, seulement 0,6% du gène code pour la dystrophine.

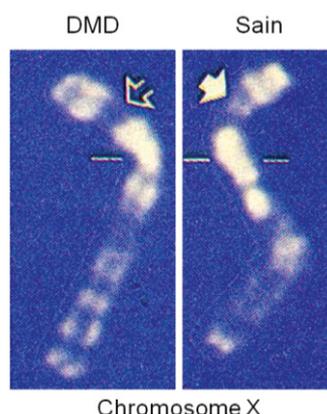


Figure H-30 : Chromosome X porteur du gène codant pour la dystrophine. A gauche chez un patient atteint de la DMD, à droite chez un patient sain.

D'après le site internet :

<http://www.inserm.fr/var/inserm/storage/images/mediatheque/images/dossier-d-informations/genetique-et-developpement/epigenetique2/11617-1-fre-FR/epigenetique2.jpg>

La grande taille de ce gène favorise le nombre de mutations éventuelles. Elles peuvent être de différents types : délétion d'exons, duplication ou mutation ponctuelle. Cela conduit généralement à un décalage du cadre de lecture qui engendre un codon stop prématuré. Une

protéine tronquée est ainsi produite qui se traduit phénotypiquement par le développement d'une dystrophie.

3- Les modèles d'étude de la DMD

Trois modèles d'animaux présentent une absence spontanée d'expression de la dystrophine dans les cellules musculaires : la souris *mdx* (*X-linked Muscular Dystrophy*), le chien GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*), et le chat HFMD (*Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy*). Il existe également des lignées cellulaires dépourvues en dystrophine.

a. Les modèles animaux

i. La souris *mdx*

La souris *mdx* (Figure H-31), issue de la souche C57BL/10ScSn, possède une mutation ponctuelle sur l'exon 23 du gène DYS codant pour la dystrophine qui conduit à la formation d'un codon stop et donc à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Sicinski et al., 1989). Néanmoins cette souris, comparée aux patients, présente un phénotype associé à la pathologie moins sévère. Effectivement la faiblesse musculaire n'est pas une caractéristique évidente, la durée de vie n'est pas extrêmement réduite et elle peut se reproduire (Lynch et al., 2001).



Figure H-31 : Photographie d'une souris *mdx*, modèle murin de la DMD.

A l'âge de quatre semaines, ce modèle animal présente un pic de nécrose pour les fibres musculaires squelettiques qui sont régénérées continuellement par les cellules satellites mais elles présentent des noyaux centraux (Tanabe et al., 1986) (Figure H-32).

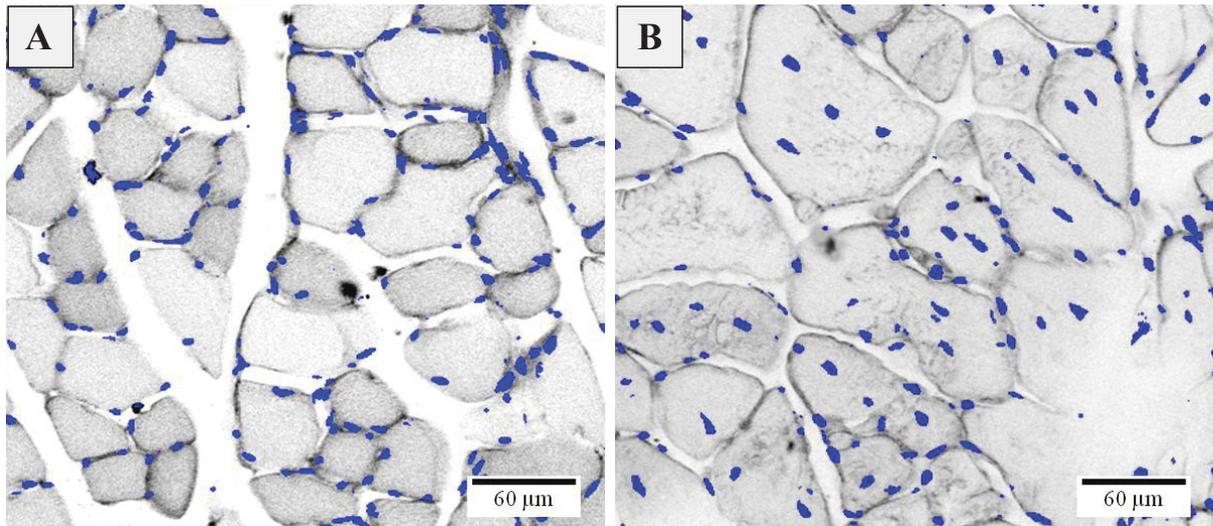


Figure H-32 : Marquages des noyaux de fibres musculaires squelettiques contrôles et *mdx* en coupe transversale. A : Marquage périphérique des noyaux (bleus) dans les fibres musculaires squelettiques provenant d'une souris contrôlée. B. Marquage central des noyaux (bleus) dans les fibres musculaires squelettiques provenant d'une souris *mdx*. (Obtenus au laboratoire)

Le remplacement de ces cellules musculaires par du tissu conjonctif est limité. Cependant, le diaphragme de la souris *mdx* est plus proche du phénotype pathologique des patients DMD. Ces animaux développent également une cardiomyopathie dilatée (CMD). La fonction systolique du ventricule gauche reste normale jusqu'à l'âge de huit semaines puis progressivement la CMD s'installe pour être totalement établie à l'âge de 42 semaines (Quinlan et al., 2004). La paroi postérieure du ventricule gauche s'amincit, engendrant une dilatation de la chambre cardiaque, puis une fibrose apparaît qui se traduit par une augmentation d'un facteur 10 du tissu conjonctif (Spurney et al., 2008) (Figure H-33).

Les différences observées entre la souris *mdx* et les patients DMD peuvent être expliquées par deux hypothèses. Tout d'abord, la souris compense l'absence de dystrophine par une autre protéine ayant 80% d'homologie de séquence, l'utrophine (De La Porte et al., 1999). Une déficience en utrophine provoque des caractéristiques phénotypiques plus sévères et plus similaires aux patients DMD (Deconinck et al., 1997). Enfin, les cellules satellites des souris auraient un potentiel régénératif plus élevé (Grounds et McGeachie, 1992).

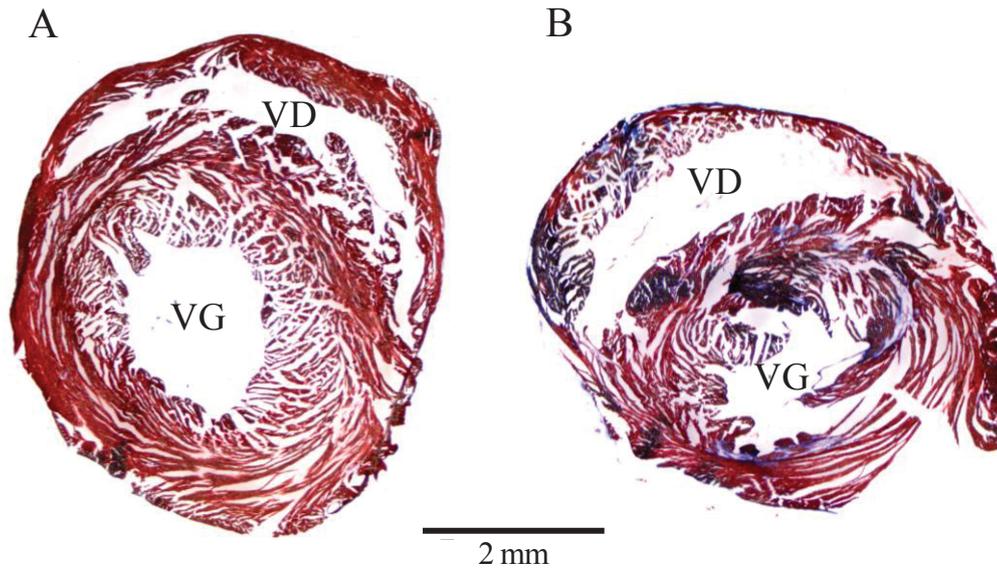


Figure H-33 : Exemples de marquage au trichrome de Masson du tissu musculaire (rouge) et du tissu fibreux (bleu) dans des coupes transversales de cœurs contrôles et *mdx* âgés de 12 mois observé au microscope (Olympus). A : Image d'un cœur contrôle contenant 6% de tissu fibreux. B : Image d'un cœur *mdx* contenant 20% de tissu fibreux. VG : ventricule gauche, VD : ventricule droit. Le pourcentage de tissu fibreux a été obtenu en calculant le ratio de la surface de tissu coloré en bleu divisé par la surface tissulaire totale. (Obtenus au laboratoire)

ii. Le chien GRMD

L'absence de dystrophine chez les chiens provoque une myopathie et une cardiomyopathie similaires aux patients DMD (Cooper, 1989). Les races de chien touchées concernées sont : les golden retrievers (Figure H-34), les terriers irlandais, les samoyèdes et les rottweilers. Leur taux de créatine kinase sérique est élevé et augmenté par l'exercice. Ces chiens ont une stature raide, une démarche dandinante, une difficulté à ouvrir la mâchoire et à se nourrir. Leur langue est épaissie et ils salivent beaucoup. Leurs fibres musculaires squelettiques nécrosées sont au fur et à mesure remplacées par du tissu fibreux causant ainsi une atrophie musculaire (Valentine et al., 1992). Ce modèle animal est plus proche du phénotype DMD que le modèle murin mais peu pratique pour l'expérimentation en raison des contraintes d'élevage et des problèmes d'éthique.

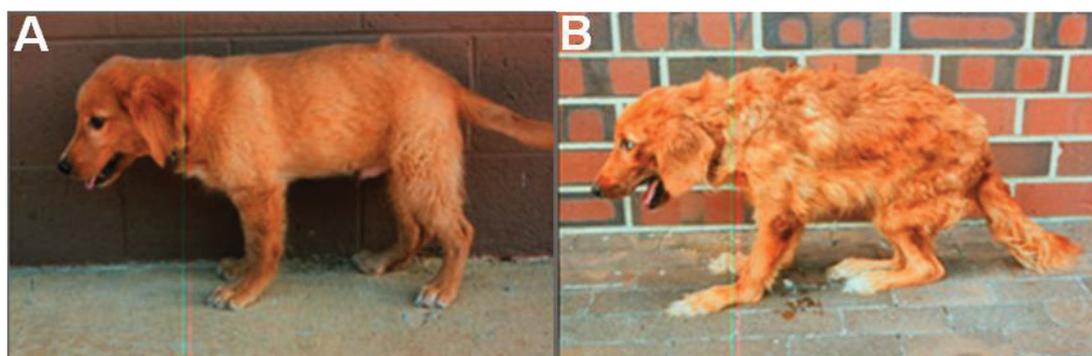


Figure H-34 : Photographies d'un chien GRMD montrant l'évolution de la dystrophie canine. A : Chien à l'âge de 3 mois. B : Même chien à l'âge de 6 mois. En 3 mois, une raideur des muscles pelviens, des contractures articulaires, une hyper extension des pattes sont observées. (Modifié selon Kornegay et al., 1994)

iii. Le chat HFMD

Les dystrophies chez le chat sont plus rares et les symptômes sont observés durant leur première ou leur deuxième année de vie. Lorsqu'il est atteint par cette pathologie, cet animal présente un élargissement musculaire, une langue proéminente, une mobilité affectée et des signes de cardiomyopathie (Gaschen et al., 1992). Sur des coupes de muscles, on observe des amas de fibres musculaires nécrotiques et un faible marquage pour la dystrophine.

b. Les lignées cellulaires

Il existe des lignées cellulaires dépourvues en dystrophine, appelée lignée SolC1(-). Leur utilisation permet d'étudier et de comprendre la mise en place de mécanismes précoces qui conduisent au phénotype DMD. Cette lignée a été obtenue à partir de la lignée myogénique Sol8 qui a été isolée du muscle soléaire de souris normale C3H (Mulle et al., 1988). Après plusieurs clonages successifs par dilution limite, cette lignée Sol8 a perdu l'expression de la dystrophine donnant lieu à la lignée SolC1(-).

4- La dystrophine et le « *Dystrophin-Glycoprotein Complex* »

a. La dystrophine

i. Localisation (Figure H-35)

La dystrophine est une protéine intracellulaire cytosquelettique, d'un poids moléculaire de 427 kDa, qui appartient à la famille des protéines β -spectrine/ α -actinine. Elle est présente dans tous les types de muscles, ainsi que dans le cortex cérébral et les cellules de Purkinje du cervelet (Byers et al., 1991). Au niveau cellulaire, elle se localise seulement sous le

sarcolemme des fibres musculaires squelettiques avec une expression accrue aux jonctions neuromusculaires et myotendineuses (Arahata et al., 1988) ; mais dans les cellules cardiaques, elle se situe aussi au niveau intracellulaire le long des tubules-T (Kostin et al., 1998).

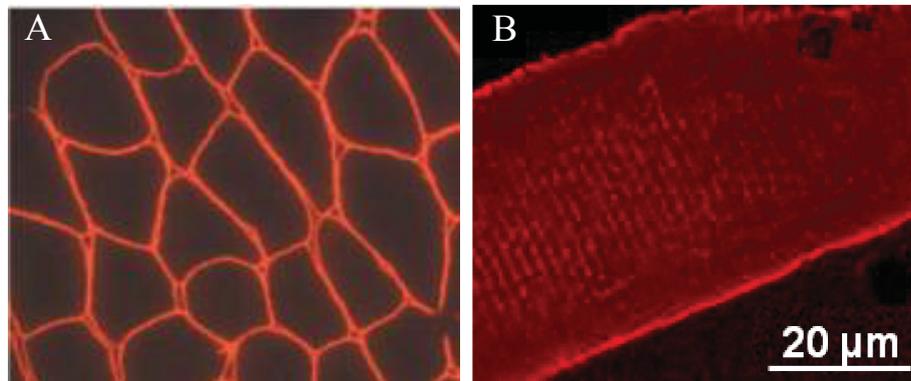


Figure H-35 : Localisation cellulaire de la dystrophine (en rouge). A : Coupe immunohistochimique transversale d'un muscle squelettique sain montrant une localisation membranaire de la dystrophine (Blake et al., 2002). B : Marquage immunocytochimique de la dystrophine dans un cardiomyocyte ventriculaire sain observé selon un axe longitudinal (obtenu au laboratoire). La localisation de la protéine est membranaire et cytoplasmique.

ii. Structure

La dystrophine est organisée en quatre régions (Figure H-36) :

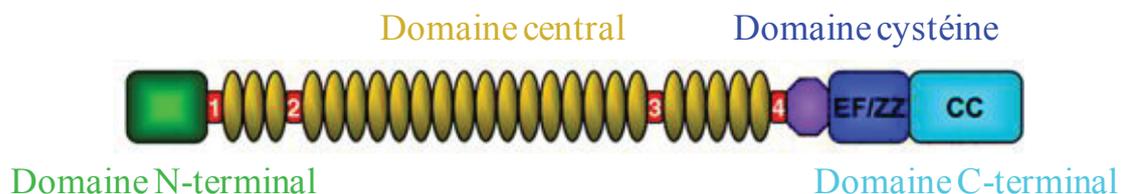


Figure H-36 : Représentation schématique des quatre domaines de la dystrophine.

(Modifié d'après Blake et al., 2002)

- Le domaine N-terminal, domaine de liaison à l'actine, composé de 240 acides aminés.
- Le domaine central, le plus long, composé de 24 unités répétées. Cette séquence est appelée « *rod domain* » car elle confère à la protéine sa propriété de flexibilité. Le « *rod domain* » s'achève par une région constituée de quatre prolines, suivie d'un domaine WW identifié comme pouvant lier d'autres protéines telles que le β -dystroglycane.

- Un domaine riche en cystéines contenant une région « *EF-hand* » similaire à celle de l' α -actinine pour lier le calcium intracellulaire. Il comprend également un domaine ZZ, composé d'une quinzaine de cystéines, semblable à celui retrouvé dans les motifs à doigt de zinc pour lier la calmoduline de manière calcium dépendante.
- Le domaine C-terminal composé de deux structures en hélice α pour former des « *coiled coil* » impliqués dans la liaison de la dystrophine avec la dystrobrevine et d'autres protéines du complexe associé à la dystrophine.

L'étude de la structure de la dystrophine met en évidence un de ses nombreux rôles, celui d'ancrage du cytosquelette à la matrice extracellulaire via le complexe protéique qui lui est associé (Ervasti et Campbell, 1993).

iii. Mutations

Plusieurs types de mutations peuvent affecter le gène de la dystrophine : délétions, duplications, mutations ponctuelles ou microdélétions. Les réarrangements importants sont retrouvés dans 60 à 65% des cas de dystrophie musculaire de Duchenne (Koenig et al., 1987), mais il n'y a pas de corrélation entre la taille de la mutation et la sévérité de la maladie (Monaco et al., 1988). Certaines mutations, comme les délétions, ne modifient pas le cadre de lecture mais provoquent quand même un phénotype DMD. Par exemple, si le domaine riche en cystéines et le domaine C-terminal sont modifiés, la dystrophine ne pourra plus se lier à son complexe associé (Bies et al., 1992). D'autres modifications provoquent un phénotype atténué. C'est le cas pour la dystrophie musculaire de Becker (BDM) qui se caractérise par des symptômes beaucoup moins sévères, une progression de la maladie plus lente et une nécrose musculaire réduite par rapport à la DMD (Mostacciuolo et al., 1987). Chez ces patients, les mutations sont des délétions ou des duplications qui ne changent pas le cadre de lecture, et qui surviennent dans des régions n'impliquant pas d'interaction avec les membres du complexe associés à la dystrophine. Ainsi dans la BDM, la dystrophine conserve une certaine fonctionnalité.

b. Le « Dystrophin-Glycoprotein-Complex » (DGC)

i. Composition

Plusieurs protéines sont associées avec la dystrophine et forment un complexe reliant les filaments d'actine à la matrice extracellulaire à travers le sarcolemme. Ce complexe associé à

Nowak, 2006). Effectivement, la fragilité membranaire engendrerait des micro-ruptures qui seraient responsables d'une entrée massive d'ions calciques du milieu extracellulaire dans le cytoplasme. Cet influx entraînerait une réduction de la production d'ATP par les mitochondries (Wrogemann et Pena, 1976), une activation des protéases et des phospholipases. Tous ces phénomènes amplifieraient le mécanisme de mort cellulaire et génèreraient une entrée de calcium encore plus importante du milieu extracellulaire par les canaux calciques de fuite qui seraient déstabilisés par ces micro-ruptures (Constantin et al., 2006). Cependant la validité de l'implication des micro-ruptures membranaires dans la DMD reste controversée car des études montrent que la tension nécessaire pour rompre le sarcolemme de fibres musculaires squelettiques de souris *mdx* n'est pas différente de celle nécessaire pour les fibres saines (Hutter et al., 1991). Dans les cardiomyocytes, la fonction mécanique de la dystrophine ne doit pas être limitée au maintien de l'intégrité du sarcolemme. Effectivement, cette protéine a aussi une localisation cytoplasmique, striée et régulière (Figure H-36) mais son rôle reste encore à éclaircir.

c. Physiopathologie dystrophique

Dans la dystrophie musculaire de Duchenne, le lien entre l'absence de dystrophine et la dégénérescence des cellules musculaires n'est pas encore bien compris. Néanmoins quatre grandes hypothèses ont été avancées pour expliquer les phénomènes de nécrose cellulaire chez les patients DMD.

i. L'hypothèse mécanique ou mécano-signalétique

La théorie de la fonction mécano-signalétique du DGC, développée dans le paragraphe précédent, suggère que les cellules déficientes en dystrophine présentent une membrane fragilisée qui laisserait transiter des molécules entre le cytoplasme et le milieu externe en raison du manque d'interaction entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Ozawa, 2010 ; Allen et al., 2010b). Cette hypothèse est basée sur le fait que des concentrations élevées de protéines cytoplasmiques spécifiques du muscle, comme la créatine kinase, ont été mesurées dans le sérum des patients DMD et dans celui des souris *mdx* (McArdle et al., 1994).

ii. L'hypothèse de la surcharge calcique

En absence de dystrophine, une dérégulation de l'homéostasie calcique est observée et se traduit par une surcharge cytoplasmique en Ca^{2+} . Au repos, la concentration calcique

intracellulaire est d'environ 100 nM pour les cellules musculaires. Un dysfonctionnement dans la régulation du calcium engendre une cascade d'événements qui aboutissent à la mort cellulaire. Cependant, la relation précise entre l'absence de dystrophine (ainsi que de son complexe) et la surcharge calcique reste encore mal comprise et ne fait pas l'unanimité (pour revue, Allen et Whitehead, 2011). En effet, certaines études montrent une augmentation globale de la concentration calcique au repos (Turner et al., 1988 ; Allen et al., 2010b), mais d'autres rapportent qu'il n'y a aucune surcharge en Ca^{2+} dans les muscles de souris *mdx* ou de patients DMD (Gailly et al., 1993).

Au niveau cardiaque, les cardiomyocytes de jeunes souris contrôles et *mdx* (8 semaines) ne montrent pas de différence de concentration calcique au repos (50 nM) (Williams et Allen, 2007a). Mais les cellules *mdx* de souris âgées (42 semaines) voient leur concentration intracellulaire en Ca^{2+} augmentée à 70 nM (Williams et Allen, 2007a).

Il existe différentes voies d'entrée possibles responsables de la surcharge calcique. Des canaux cationiques mécanosensibles, activés par l'étirement du sarcolemme, et les canaux calciques dépendants du voltage ont été proposés comme candidats participant aux perturbations de l'homéostasie calcique dans les myotubes DMD (Imbert et al., 1996 ; Imbert et al., 2001; Vandebrouck et al., 2001 ; Allen et al., 2010a). D'autres canaux, appelés TRPC (*Transient Receptor Potential Channel*) dont il existe plusieurs isoformes, seraient aussi impliqués. Cinq de ces protéines ont été retrouvées dans les fibres musculaires squelettiques normales et *mdx* (Vandebrouck et al., 2002). L'intérêt s'est porté sur l'isoforme TRPC1, localisée à la membrane, qui est un canal calcique capacitatif s'activant à la suite d'une déplétion du réticulum sarcoplasmique pour provoquer un influx de calcium vers le cytoplasme. Cette protéine participerait à la surcharge calcique dans les fibres *mdx* (Vandebrouck et al., 2002 ; Allen et al., 2010a). Au niveau cardiaque, l'expression de TRPC1 semble inchangée dans les jeunes cardiomyocytes sains et *mdx* ; cependant dans les cardiomyocytes âgés, son expression est multipliée par trois (Williams et Allen, 2007a). Ce canal jouerait donc un rôle dans la cardiomyopathie associée à la DMD.

Le réticulum sarcoplasmique pourrait être aussi impliqué dans ce phénomène de surcharge calcique. Des études ont montré un dysfonctionnement de la pompe SERCA et/ou une altération du RS à séquestrer le calcium (Lamb et Cellini, 1999). Les cellules de patients DMD montrent également une augmentation de la fuite spontanée de calcium du RS (Deval et al., 2002) suggérant une augmentation du phénomène de CICR. Mais l'expression des canaux

DHPRs et RYRs n'est pas modifiée (Culligan et al., 2002). L'autre protéine du RS qui peut être impliquée dans la fuite du calcium est le récepteur à l'IP₃. A l'état de repos, le taux basal d'IP₃ était deux à trois fois supérieur dans les cellules déficientes en dystrophine (Liberona et al., 1998), et les sparks, en partie dépendants des IP₃Rs, sont plus nombreux (Balghi et al., 2006b).

iii. L'hypothèse vasculaire

Parmi les différentes protéines appartenant au DGC, on trouve l'enzyme NOs neuronale (nNOs) musculaire. Cette enzyme permet la synthèse du monoxyde d'azote (NO) dans les cellules musculaires. Ce gaz entraîne une dilatation locale des vaisseaux sanguins, vasodilatation, qui augmente l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires au muscle lors d'un effort (Wink et al., 1995). Dans la dystrophie musculaire de Duchenne, le complexe DGC est déstabilisé et la nNOs est délocalisée, circulant librement dans le cytoplasme (Bia et al., 1999). La production de NO en serait diminuée, provoquant un manque d'oxygénation (ischémie) du muscle lors de la contraction. Ceci contribuerait à accentuer les lésions que subit la fibre musculaire (Crosbie, 2001).

iv. L'hypothèse du stress oxydatif et de l'inflammation

D'autres études favorisent une dernière hypothèse : le stress oxydatif et l'inflammation. En effet, chez les patients DMD, une augmentation de l'oxydation des protéines fut constatée (Allen et al., 2010a) et serait à l'origine de dommages sur l'ADN (Ragusa et al., 1997). Des traitements antioxydants furent testés sur la souris *mdx* et se sont révélés bénéfiques (Buetler et al., 2002). Mais lorsqu'ils sont administrés chez les patients DMD, ils ont été inefficaces (Bäckman et al., 1988). Enfin, des études ont mis en évidence une réponse inflammatoire chronique chez les patients DMD (Haslett et al., 2002) et l'utilisation d'anti-inflammatoires tels que les corticostéroïdes a donné de bons résultats se traduisant par un ralentissement de la progression de la maladie et de la perte de la faculté ambulatoire (Merlini et al., 2003).

d. Les thérapies

A ce jour, aucune thérapie n'a permis de stopper l'évolution de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Cependant différentes stratégies ont été développées pour ralentir sa progression et améliorer la qualité de vie des patients.

i. La thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à faire pénétrer le gène DYS dans les cellules d'un patient atteint de DMD pour faire réexprimer la dystrophine (Figure H-38). Deux types de thérapies géniques ont été tentés *in vivo* : l'injection intramusculaire de plasmides et l'utilisation de vecteurs viraux. Néanmoins, ces approches présentent des limites. Effectivement, il faut que les vecteurs puissent contenir le large gène de la dystrophine (2,6 millions de paires de bases), et qu'ils s'introduisent dans un maximum de fibres musculaires post-mitotiques. De plus, il est indispensable que l'expression du gène introduit persiste et échappe au système immunitaire. La méthode la plus prometteuse semble être l'infection des cellules par des vecteurs viraux défectifs pour leur réplication. L'utilisation du vecteur viral adéno-associé (AAV) est le choix le plus judicieux car il ne contient pas de gènes viraux, diminuant ainsi son pouvoir immunogénique, et il est capable de s'intégrer au génome de la cellule cible. Cependant, sa capacité d'encapsulation est réduite (5 kilobases) ce qui restreint son utilisation à la transfection du gène de la mini-dystrophine (délétion partielle du domaine central de la protéine) ou de la micro-dystrophine (délétion totale du domaine central). Les résultats expérimentaux obtenus sur les souris *mdx* sont encourageants. Effectivement, il a été montré que la dystrophine s'exprimait à la membrane des cellules musculaires et cardiaques ainsi que tout le complexe protéique associé six mois après les injections. De plus, les animaux récupèrent de la force musculaire (Sakamoto et al., 2002 ; Liu et al., 2005). En 2009, une équipe américaine a transféré par voie intramusculaire, un AAV portant un gène de la mini-dystrophine chez six personnes atteintes de DMD (Mendell et al., 2010). Les résultats ont montré que les fibres musculaires exprimant la protéine tronquée furent retrouvées chez deux des six patients. Les réponses immunitaires spécifiques à la mini-dystrophine obtenues étaient hétérogènes d'où la nécessité de mieux les comprendre et ainsi mieux les gérer pour développer de nouvelles thérapies.

ii. Le saut d'exon

La technique du saut d'exon consiste à injecter des vecteurs ne s'intégrant pas au génome, et contenant un ARN anti-sens qui va modifier l'épissage de l'ARN messager de la dystrophine. Effectivement, les patients atteints de DMD présentent des mutations ou des délétions qui affectent le cadre de lecture du gène et conduisent à la formation d'un codon-stop prématuré et donc à une dystrophine tronquée non fonctionnelle. La stratégie du saut d'exon consiste à modifier l'épissage artificiellement pour maintenir un cadre de lecture qui

aboutit à la formation d'une dystrophine plus courte mais fonctionnelle dans les muscles squelettiques et cardiaques (Lu et al., 2010). Des expériences de ce type, réalisées sur les souris *mdx*, ont utilisé un oligonucléotide anti-sens pour permettre l'épissage de l'exon 22 à 30 inclus, sautant ainsi l'exon 23 portant la mutation. Ils ont ainsi réussi à faire réexprimer la dystrophine tronquée à la membrane (Dunckley et al., 1998 ; Goyenvallée et al., 2004). Cette expression sarcolemmale serait stable et les animaux présenteraient également une récupération de leur force musculaire.

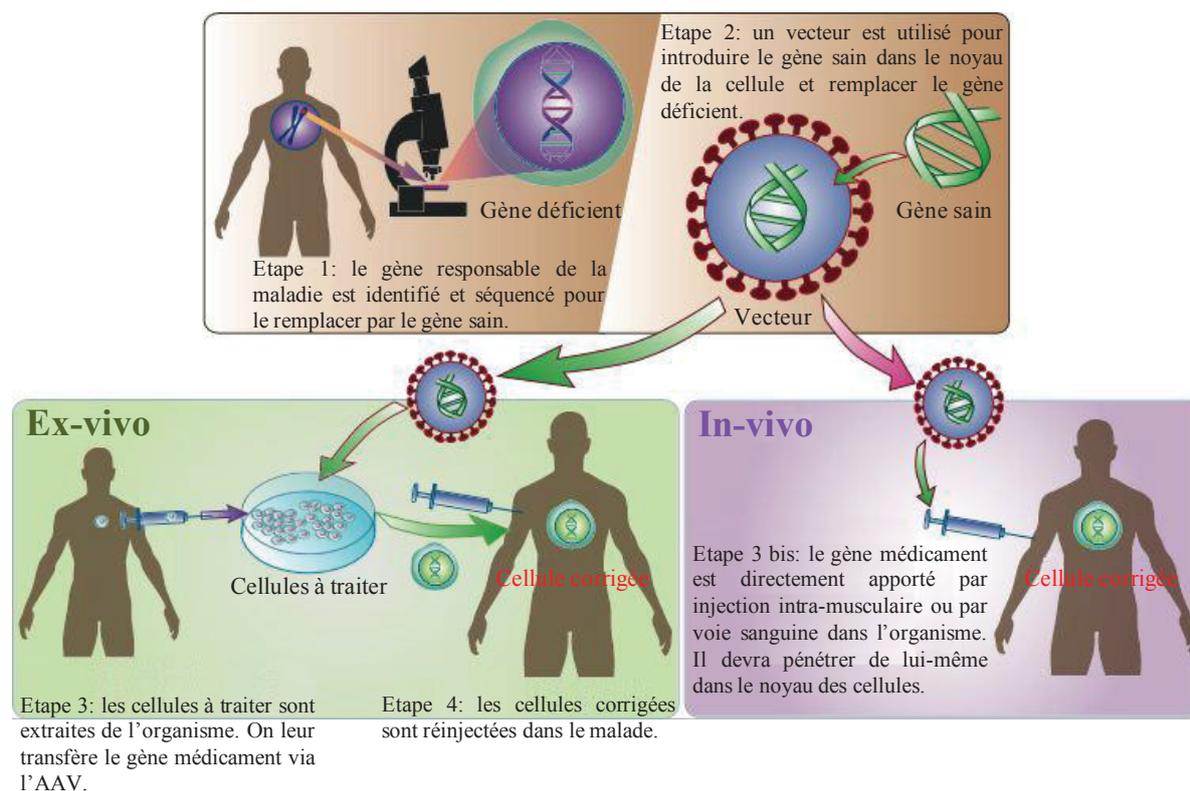


Figure H-38 : La thérapie génique. Cette technique consiste à administrer un gène « médicament » dans des cellules où le gène est défectueux ou manquant. (D'après Myoinfo, 2011)

Un essai clinique chez l'humain a utilisé l'oligonucléotide anti-sens 2-O-méthyl phosphothioate et a montré qu'un saut de l'exon 51 se produisait et permettait la réexpression de la dystrophine tronquée à la membrane vingt huit jours après l'injection unique de l'oligonucléotide dans le tibialis antérieur de quatre patients atteints de DMD (van Deutekom et al., 2007). Récemment, un essai clinique hollandais de phase I a été réalisé chez quatre personnes atteintes de DMD pour évaluer la faisabilité et la tolérance d'une injection intramusculaire d'un oligonucléotide anti-sens visant au saut de l'exon 51, le GSK2402968 et anciennement appelé PRO051, développé par la société de biotechnologie Prosensa en

collaboration avec les laboratoires GlaxoSmithKline. Les résultats ont montré que la dystrophine tronquée était exprimée dans le muscle injecté des quatre patients (Goemans et al., 2011). Un essai de phase I/II a donc été entrepris, en Suède et en Belgique, pour tester la sécurité, la pharmacocinétique et les effets cliniques et moléculaires du traitement, avec un mode d'administration non plus intramusculaire (localisé) mais sous-cutané, permettant la distribution du traitement dans l'ensemble de l'organisme (Goemans et al., 2011). Douze personnes atteintes de DMD et capables de marcher ont été traitées en sous-cutané par le GSK2402968 à quatre doses différentes, une fois par semaine, pendant cinq semaines. Puis, tous ont reçu un traitement par le GSK2402968 à la dose de 6 mg/kg pendant 12 semaines. Les résultats montrent que le traitement a été toléré et que l'expression de la dystrophine a été observée dans 60 à 100% des fibres musculaires pour 10 des 12 patients, et qu'elle est proportionnelle à la dose de GSK2402968 injectée. Les résultats obtenus au cours des 12 semaines supplémentaires ont montré une amélioration modeste du test de marche.

iii. Les thérapies pharmacologiques

Les stratégies pharmacologiques ont pour objectif d'améliorer la vie quotidienne des patients, mais elles ne permettent pas encore une guérison. Dans la dystrophie musculaire de Duchenne, la dégénérescence des fibres musculaires entraîne une perte de la masse musculaire que les chercheurs veulent compenser pour améliorer la force des personnes atteintes de DMD. Dans cette optique, différents types de composés furent utilisés : la créatine, les facteurs de croissance comme IGF-I (*Insulin Growth Factor I*), les inhibiteurs de la myostatine, les agonistes bêta-2 et les corticoïdes.

L'utilisation de corticoïdes, tels que la prednisone et le déflazacort, ralentit la progression de la maladie, augmente la masse musculaire et maintient les fonctions motrices plus longtemps. Cependant, beaucoup d'effets secondaires sont à déplorer et les modes d'action de ces agents pharmacologiques restent obscurs (Mendell et al., 1989).

La créatine activerait la SERCA et minimiserait ainsi l'augmentation du calcium intracellulaire pour améliorer la survie cellulaire (Pulido et al., 1998 ; Passaquin et al., 2002).

L'IGF-1 pourrait s'avérer efficace s'il n'avait pas un effet cardiaque délétère (DeLaughter et al., 1999). Effectivement, il stimulerait la régénération musculaire en activant la prolifération et la différenciation des cellules satellites (Engert et al., 1996). La surexpression du facteur de croissance IGF-1 dans les muscles de souris *mdx* réduit l'atteinte des fibres

musculaires et l'aspect dystrophique du muscle observé au microscope est diminué (Barton et al., 2002).

Enfin, l'emploi d'anticorps monoclonaux dirigés contre la myostatine a montré une diminution de la dégénérescence et une augmentation de la masse musculaire dans les souris *mdx* (Bogdanovich et al., 2002). Cette protéine qui appartient à la famille des TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) régule la myogenèse en réduisant la prolifération des myoblastes par répression des facteurs myogéniques (Thomas et al., 2000). La myostatine est un inhibiteur de la croissance musculaire, existant de manière endogène dans l'organisme. En bloquant l'action de la myostatine, la croissance musculaire serait alors favorisée. La société Acceleron Pharma a réalisé en 2009 un essai de phase I visant à évaluer l'innocuité d'un traitement par l'ACE-031, un inhibiteur de la myostatine, chez six femmes ménopausées saines. Sur la base des résultats encourageants obtenus au cours de cet essai, la société a démarré en 2010 un essai clinique de phase II en double aveugle, visant à évaluer l'innocuité, la tolérance et la pharmacocinétique de différentes doses d'ACE-031 administrées en sous-cutané toutes les quatre semaines pendant douze semaines, chez 88 patients atteints de DMD et traités par corticothérapie. Au bout de ces 3 mois, une extension de cette phase II pendant douze semaines supplémentaires avait été mise en place chez 76 de ces participants. Fin avril 2011, les sociétés Acceleron Pharma et Shire (associées sur les études ACE-031 depuis 2010) ont annoncé l'interruption de cette étude suite à la survenue de saignements mineurs du nez et des gencives, et la dilatation des vaisseaux sanguins de la peau. Bien que ces effets indésirables soient considérés comme non dangereux et qu'ils disparaissent avec l'arrêt du traitement, Acceleron Pharma, Shire et les agences réglementaires canadiennes ont décidé de mieux comprendre les mécanismes de ces effets avant d'entreprendre la suite des études avec l'ACE-031. En attendant, des études complémentaires sur le rat et le singe ainsi que des analyses de données obtenues sur l'homme et l'animal sont en cours (Myoinfo, 2011).

iv. La thérapie cellulaire

Contrairement aux méthodes pharmacologiques, la thérapie cellulaire est basée sur l'utilisation de cellules vivantes. L'objectif est de remplacer des cellules déficientes en dystrophine ou nécrosées par des cellules saines. Cette technique consiste à prélever des cellules soit chez le patient à traiter (autogreffe), soit chez un donneur (allogreffe). Ces cellules sont ensuite purifiées, éventuellement modifiées, puis multipliées en laboratoire. Elles sont ensuite injectées dans l'organe à traiter de la personne malade (Figure H-39). Différents

types de cellules, généralement des cellules souches adultes, sont actuellement utilisés par les chercheurs pour la thérapie cellulaire dans le cadre de la DMD, myoblastes, cellules souches sanguines spécifiques (AC113+), mésangioblastes, cellules souches dérivées du muscle (MDSC, MuStem), cellules stromales de la moelle osseuse, cellules souches adipeuses (hMADS). Cependant, les cellules souches adultes ont des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation inférieures aux cellules souches embryonnaires.

- Les myoblastes, cellules précurseurs du muscle, peuvent être obtenus de deux façons : soit ils sont prélevés dans le muscle d'un donneur sain puis transplantés chez le patient (allogreffe) qui devra alors être traité par immunosuppresseurs ; soit les myoblastes sont prélevés chez le patient, corrigés génétiquement *in vitro* puis retransplantés chez le malade (autogreffe).
- Des cellules souches sanguines (cellules hématopoïétiques) spécifiques (AC113+) peuvent se transformer en cellules musculaires. Injectées chez la souris *mdx*, ces cellules forment des fibres musculaires, colonisent le muscle endommagé et participent à sa régénération, entraînant une amélioration de la structure et de la force du muscle squelettique traité (Torrente et al., 2007).
- Les mésoangioblastes, cellules souches des parois des vaisseaux sanguins, ont fait l'objet du premier essai de thérapie cellulaire en 2003 (Sampaolesi et al., 2003). Isolés de souris donneuses, ils ont permis d'améliorer la force musculaire des souris dystrophiques. En 2006, un groupe de chercheurs franco-italien a injecté par voie intra-artérielle des mésoangioblastes chez des chiens *GRMD* qui se sont transformés en cellules musculaires, entraînant une amélioration de l'aspect microscopique des muscles ainsi qu'une amélioration significative de la motricité (Sampaolesi et al., 2006).
- Les cellules stromales de la moelle osseuse fournissent un support structural et fonctionnel aux cellules souches du sang (cellules hématopoïétiques) et sont capables de se différencier en cellules du muscle squelettique. Ces cellules s'incorporent spécifiquement dans les muscles endommagés et expriment la dystrophine humaine. Lors du congrès de Myologie en 2011, des résultats préliminaires sur l'injection de cellules souches mésenchymateuses humaines chez la souris ou le chien atteints de DMD ont montré que ces modèles sont capables d'exprimer la dystrophine humaine dans leurs muscles (Myoinfo, 2011).

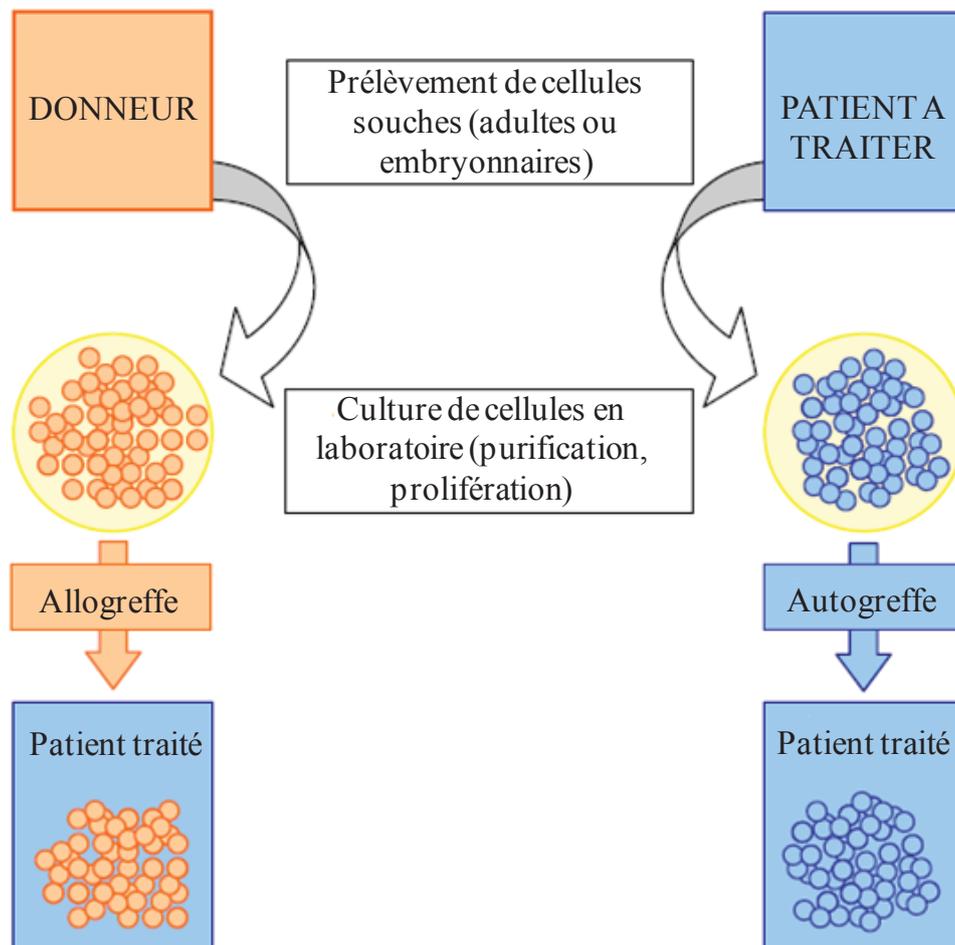


Figure H-39 : La thérapie cellulaire. Cette technique est basée sur l'utilisation de cellules souches vivantes. Ces cellules sont prélevées soit chez le patient à traiter (autogreffe), soit chez un donneur (allogreffe), puis elles sont purifiées, mises en culture pour qu'elles se multiplient, et enfin elles sont réimplantées chez le patient pour remplacer les cellules déficientes ou disparues, du fait de la pathologie.

(D'après Myoinfo, 2011)

IV- La cardiomyopathie dilatée associée à la DMD

1- La cardiomyopathie dilatée : nouveau symptôme de la DMD

La dystrophie musculaire de Duchenne touche l'ensemble des muscles de l'organisme dont le muscle cardiaque. Avec l'amélioration des traitements visant la faiblesse des muscles squelettiques, la pathologie cardiaque devient une caractéristique de plus en plus importante à prendre en considération pour augmenter l'espérance de vie des patients. En effet, 40% des patients décèdent du problème cardiaque entre 10 et 30 ans et des études ont montré que les traitements ciblant les muscles squelettiques pourraient accélérer l'altération cardiaque (Townsend et al., 2008). L'évolution de la DMD entraîne l'installation progressive d'une cardiomyopathie dilatée (CMD). Chez les patients, elle peut débuter dès l'âge de 5 ans même si aucun symptôme n'est manifeste. Effectivement, il reste difficile de détecter les premiers signes de la cardiomyopathie car les enfants sont en chaise roulante et ils ne pratiquent pas d'activité physique, par conséquent les symptômes cardiaques sont masqués. Vers 14 ans, une insuffisance cardiaque partielle est présente, provoque un essoufflement (dyspnée), et des palpitations. Puis, elle devient globale entraînant une grande fatigue chez l'enfant. Pour dépister ces troubles et mettre en œuvre un traitement adapté, la surveillance cardiaque doit être précoce et systématique. L'électrocardiogramme (ECG), la radiographie du thorax et l'échocardiographie sont les examens de base de cette surveillance.

2- Les manifestations cliniques chez le patient DMD

a. Généralités

Les complications cardiaques ne sont pas visibles avant l'âge de 10 ans, mais dès 14 ans, un tiers des patients DMD est touché et à 18 ans l'ensemble des malades présente une altération de la fonction ventriculaire gauche visible lors d'un électrocardiogramme (ECG) (D'Orsogna et al., 1988 ; Nigro et al., 1990). La faible proportion des symptômes cardiaques, avant l'âge de 18 ans, est attribuée à la charge réduite de travail demandée au cœur en raison de la perte de la faculté ambulatoire des enfants qui se retrouvent en chaise roulante (Nigro et al., 1990).

Un des premiers signes d'une atteinte cardiaque est le taux élevé de peptides natriurétiques (ANP et BNP), multiplié par 4, mesuré dans le sang des patients DMD (Kawai et al., 1990). L'ANP et le BNP sont des polypeptides sécrétés respectivement par les

cardiomyocytes atriaux et ventriculaires lors d'une distension des oreillettes et d'un étirement des ventricules.

Le deuxième paramètre qui reste encore controversé est une hypercoagulation des patients DMD. Certaines études ont montré un taux élevé des produits de dégradation du fibrinogène (Saito et al., 2001).

b. ECG

Des anomalies dans les ECG des malades sont donc visibles. Ils sont le reflet du développement de la fibrose cardiaque et de l'atteinte du système nerveux autonome du cœur (Finsterer, 2006 ; Miller et al., 1989). Néanmoins, ces caractéristiques pathologiques restent encore invisibles chez les patients de moins de 10 ans (Boland et al., 1996 ; Finsterer et Stöllberger, 2003). La plus fréquente anomalie visible sur l'ECG des patients DMD est une tachycardie sinusale qui débute au cours de l'enfance et dure jusqu'au décès (Bhattacharyya et al., 1997). Des battements auriculaires prématurés sont également fréquemment observés (Yanagisawa et al., 1992), ainsi que des foyers ectopiques et une fibrillation auriculaire. Effectivement, 40% des patients présentent sur leur ECG un intervalle PQ raccourci (Nigro et al., 1990 ; Bhattacharyya et al., 1997). Les arythmies ventriculaires sont rares aux premiers stades, mais leur incidence augmente avec la progression de la maladie (Chenard et al., 1993). En effet, une atrophie sélective et des cicatrises de la région postérobasale et du mur latéral adjacent ventriculaire se développent au cours du temps (Perloff et al., 1967). D'autres anomalies de l'ECG existent, comme un allongement de l'intervalle QT reflétant un retard de conduction intraventriculaire (Nigro et al., 1990). Selon le stade de la maladie, l'échocardiographie révèle un épaissement du myocarde dû à la fibrose, la dilatation des cavités cardiaques, la formation de thrombus, et des dysfonctions systoliques ou diastoliques, ventriculaires gauches ou droites (Brockmeier et al., 1998).

La cardiomyopathie dilatée se caractérise aussi par une atrophie myocytaire qui est comblée par une fibrose grave et sévère, et des infiltrations graisseuses dans la région postérobasale du ventricule gauche (Nishimura et al., 2001). De petites zones de fibrose peuvent être aussi occasionnellement trouvées dans le septum ventriculaire.

3- Le modèle d'étude

a. La souris *mdx*

Bien que la souris *mdx* présente un phénotype moins sévère que les patients DMD, ce modèle d'étude possède un ECG anormal, une fibrose cardiaque et un dysfonctionnement ventriculaire gauche à l'âge de 11 mois qui font de cet animal un sujet approprié pour la compréhension de la cardiomyopathie dilatée associée à la DMD (Quinlan et al., 2004). En effet, à l'âge de huit semaines la fonction systolique du ventricule gauche est normale, puis à 42 semaines elle se détériore en raison de l'installation d'une cardiomyopathie dilatée accompagnée d'une grave fibrose interstitielle qui affecte toutes les régions du ventricule gauche. Ce cœur *mdx* est dilaté avec une fréquence cardiaque réduite. Nakamura et collègues (2002) ont trouvé une augmentation de la surface ventriculaire gauche avec des modifications dystrophiques (nécrose, inflammation et fibrose). La cardiomyopathie de la souris *mdx* partage de nombreux points communs avec celle observée dans la dystrophie musculaire de Duchenne, mais il est important de souligner qu'il existe des différences. Effectivement, des études échocardiographiques ont montré que les malades ont une fibrose de la portion postérobasale du ventricule gauche alors qu'elle est uniforme chez la souris *mdx*. Par ailleurs, il semble que la fibrose soit plus étendue chez les patients (Quinlan et al., 2004).

Même si la cardiomyopathie dilatée de la souris *mdx* diffère en quelques points avec celle des patients DMD, cet animal reste un modèle d'étude prometteur. Effectivement, on peut imaginer que si des médicaments améliorent cette pathologie chez la souris, ils auront aussi un effet bénéfique chez le malade.

b. Les cardiomyocytes *mdx*

D'un point de vue cellulaire, les cardiomyocytes *mdx* ne présentent pas d'anomalie fonctionnelle à l'âge de huit semaines (Williams et Allen, 2007a). Néanmoins, à 42 semaines ces cellules possèdent au repos une concentration cytoplasmique en calcium plus élevée que dans les myocytes contrôles (de 50 nM à 70 nM) (Woolf et al., 2006 ; Williams et Allen, 2007a). Cette surcharge calcique entraîne une défaillance fonctionnelle et une nécrose par l'activation des systèmes protéolytiques (Bia et al., 1999). Mais à quoi est-elle due ? Certains éléments de réponse commencent à être apportés. Les transports (influx ou efflux) de calcium à travers le sarcolemme sont largement perturbés à cause d'une fragilité membranaire qui

augmenterait la perméabilité aux Ca^{2+} , et/ou à cause de modifications des protéines du réticulum sarcoplasmique qui changeraient le stockage, et le relargage de ce calcium.

Le DHPR est la principale voie d'entrée du calcium dans les cardiomyocytes. D'après l'étude de Woolf et collègues, ce canal présente un retard d'inactivation qui potentialiserait l'entrée de calcium dans le cytoplasme et qui diminuerait la sensibilité des protéines contractiles au Ca^{2+} . Néanmoins, d'autres études ne retrouvent pas ces modifications électrophysiologiques, et montrent plutôt une hypersensibilité du couplage excitation-contraction qui pourrait s'expliquer par des modifications du récepteur à la ryanodine de type 2 (Ullrich et al, 2009).

De la même façon, il existe une certaine controverse sur les RYR2s. Certains travaux ne révèlent aucune altération en terme de quantité protéique (Fauconnier et al., 2010 ; Sarma et al., 2010), alors que d'autres voient une augmentation de son expression (Williams et Allen, 2007a). Plusieurs études ont montré des changements au niveau de son activité. Fauconnier et collègues (2010) ont observé dans des cardiomyocytes de 4 semaines au repos que le nombre de *sparks* est doublé. En effet, quatre processus favoriseraient une fuite des récepteurs à la ryanodine : une S-nitrosylation, une déplétion en calstabile 2 dans le RS, une diminution de la NOs neuronale (nNOs) à la membrane et une augmentation d'un facteur sept de la NOs inducible (iNOs, indicateur d'une réponse inflammatoire importante) qui s'associerait avec les RYR2s (Bia et al., 1999). D'autres modifications biochimiques ont été constatées. Dans les cardiomyocytes *mdx*, les récepteurs à la ryanodine auraient une sensibilité augmentée au calcium en raison de la phosphorylation de la sérine 2808 par la PKA ce qui provoquerait sa fuite calcique (Sarma et al., 2010). Les espèces oxygénées réactives, ou ROS, participeraient également à ce processus de sensibilisation des RYR2s au calcium (Ullrich et al., 2009). Effectivement, les ROS ont un taux basal augmenté dans les cardiomyocytes *mdx* (Williams et Allen, 2007b ; Ullrich et al., 2009). Ils oxydèrent les RYR2s et participeraient aussi à l'augmentation de la sensibilité de ces récepteurs qui conduit aux fuites du calcium à travers ce canal du réticulum sarcoplasmique dans le cytoplasme.

Concernant le RS dans sa fonction de recapture du calcium, les données ne sont pas claires. Deux protéines sont indispensables pour ce mécanisme : les SERCAs et les phospholambans (PLNs). Williams et Allen (2007a) montrent au cours de leur étude que la quantité protéique de SERCA est augmentée et que celle des PLNs phosphorylés sur la sérine 16 est diminuée dans les cardiomyocytes de 42 semaines. Cela aurait pour conséquence une

diminution de la fonction des SERCA qui expliquerait le taux élevé de calcium dans le cytoplasme. Mais ces résultats n'ont pas été retrouvés par Sarma et collaborateurs (2010).

Au niveau du sarcolemme, plusieurs canaux ioniques et transporteurs pourraient être responsables de la surcharge calcique observée dans les myocytes *mdx*. Tout d'abord les canaux activés par l'étirement ou *stretched*, et principalement TRPC1 (*Transient Receptor Potential Channel 1*), seraient fortement impliqués dans la physiopathologie *mdx*. Le niveau protéique de TRPC1 serait augmenté et son inhibition par la streptomycine et la toxine de tarentule (GsMTx-4) ramènerait la concentration intracellulaire de calcium à un niveau proche de celle des cellules contrôles (Williams et Allen, 2007a). Les ROS seraient responsables de l'augmentation de l'expression de TRPC1, car ils activeraient le facteur de transcription Nf- κ B qui potentialiserait sa synthèse (Paria et al., 2003). Enfin, il existe une dernière controverse au sujet de l'activité de l'échangeur Na/Ca. Cette protéine est importante pour faire sortir le calcium de la cellule après le couplage excitation-contraction. Williams et Allen (2007a) ont montré une augmentation de son activité alors qu'Ullrich et collègues (2009) n'ont pas trouvé de différence de fonctionnement entre les cellules contrôles et *mdx*.

De nombreuses contradictions qui ouvrent aux débats, existent dans la littérature pour tenter d'expliquer la dérégulation de l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes *mdx*.

4- La prévention de la cardiomyopathie dilatée

Dans le cas de cardiomyopathies non génétiques, la thérapeutique généralement employée est l'association d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine avec des bloqueurs β -adrénergiques (Finsterer et Stöllberger, 2003). L'administration de ces médicaments chez les patients DMD présentant déjà une dysfonction ventriculaire gauche est efficace. Effectivement, la majorité des patients ont eu une amélioration voir une normalisation de leur fonction ventriculaire (Jefferies et al., 2005).

Des études ont été menées pour tenter de savoir si le développement de la cardiomyopathie dilatée chez les patients DMD peut être ralenti (McNally, 2007). 57 patients, âgés d'une dizaine d'années et présentant déjà une réduction de la fonction ventriculaire gauche, furent traités avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, le périndopril. Aucun corticostéroïdes, ni bloqueurs β -adrénergiques ne leur a été administré. Après cinq ans de traitement, 84% des malades ont vu une stabilisation dans la progression de la cardiomyopathie (Duboc et al., 2005).

Une autre étude a montré des effets préventifs voir une amélioration du dysfonctionnement cardiaque lors de l'administration d'un inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5, ou Sildénafil, chez les souris *mdx* (Adamo et al., 2010). Cette étude a mis en évidence une réduction de l'index de performance myocardique systolique et diastolique (MPI) qui est accrue chez les patients DMD (Bahler et al., 2005) et une augmentation de la vitesse d'éjection diastolique (Ea) qui est amoindrie chez les malades. Par conséquent, ce médicament pourrait se révéler d'une grande efficacité dans la démarche d'une thérapie préventive de la cardiomyopathie dilatée et dans l'amélioration de la fonction diastolique chez les patients DMD.

Néanmoins, pour le moment, aucun traitement curatif n'existe pour cette pathologie associée à la dystrophie musculaire de Duchenne. La seule alternative trouvée pour l'instant est la transplantation cardiaque. C'est pour cela qu'une détection précoce et des stratégies thérapeutiques doivent être encore développées (Jefferies et al., 2005).

V- La Microscopie de Conductance Ionique à Balayage

1- Historique

La Microscopie de Conductance Ionique à Balayage (ou le *Scanning Ion Conductance Microscopy* : le SICM) est une technique appartenant à la famille des microscopes à sonde locale (*Scanning Probe Microscopes* ou *SPM*). Ces techniques utilisent une sonde qui interagit avec l'échantillon et font généralement intervenir des forces qui ne sont significatives que lorsque la sonde et l'échantillon sont très proches, dans le domaine des distances moléculaires ou atomiques, d'où le nom utilisé de « microscopie à champs proche ». Le SICM n'entre pas dans ces catégories techniques et d'échelle. Par contre, il utilise bien une sonde (une micropipette) qui balaye l'échantillon pour suivre sa surface. Cependant en microscopie à sonde locale, le principal obstacle rencontré, lorsqu'on veut topographier la surface de cellules, est la fragilité des échantillons qui sont facilement endommagés par la sonde utilisée. C'est le cas avec la technique appelée Microscopie à Force Atomique ou AFM (*Atomic Force Microscopy*) inventée par Calvin Qate et Christoph Gerber en 1986. Avec le SICM, cet inconvénient disparaît. Il permet d'obtenir des images de haute résolution d'échantillons vivants en milieu liquide, et c'est la première méthode d'imagerie ne nécessitant pas une interaction directe avec l'échantillon pendant l'acquisition des images topographiques (Hansma et al., 1989). Il utilise une sonde d'acquisition des données qui balaye la surface des échantillons et qui fournit ainsi des informations détaillées sur leurs propriétés topographiques (Binnig et al., 1986).

Comme la technique de SICM et d'AFM ont le même objectif et possèdent des points communs, je vais donc d'abord d'écrire cette technique de microscopie de force atomique. L'AFM est un type de microscopie à très haute résolution de l'ordre de quelques fractions de nanomètres, 1000 fois mieux que la limite de diffraction optique. Cet outil est utilisé avant tout pour l'imagerie, la mesure, et la manipulation de la matière à l'échelle nanométrique. Les informations surfaciques sont recueillies par une sonde mécanique appelée *cantilever* dont l'extrémité est utilisée pour balayer la surface de l'échantillon. La pointe de la sonde est amenée à proximité de la surface du spécimen par des moteurs piézo-électriques. Les forces entre la pointe et l'échantillon conduisent à une déviation du *cantilever*, selon la loi de Hooke, qui est mesurée en utilisant un faisceau laser réfléchi par la surface supérieure du *cantilever*.

Ces variations de forces permettent de générer une image de la surface de l'échantillon. L'un des avantages majeurs de l'AFM est l'obtention d'un profil de surface en trois dimensions de la surface. En outre, les spécimens considérés par l'AFM ne nécessitent pas de traitement spécial (tel que le métal ou le carbone, étape nécessaire en microscopie électronique à balayage) qui modifierait irréversiblement ou endommagerait l'échantillon. L'AFM peut fonctionner parfaitement dans l'air ambiant ou même d'un milieu liquide. Cela rend possible l'étude des macromolécules biologiques et même des organismes vivants. Néanmoins, il reste difficile d'interpréter les images obtenues en raison de la complexité des interactions entre la sonde qui oscille et le spécimen (Putman et al., 1994) (Figure H-40).

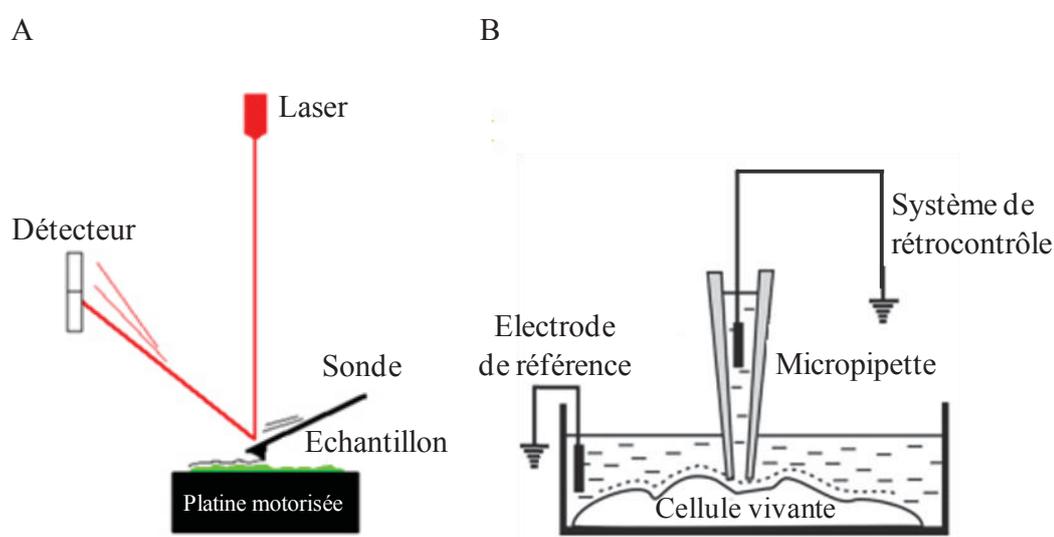


Figure H-40 : Schémas représentant les techniques d'AFM et de SICM. (A) Représentation de la technique d'AFM montrant la sonde osciller en fonction du relief de l'échantillon.(B) Représentation de la technique de SICM montrant la micropipette au dessus d'une cellule vivante. (Modifiés d'après Gorelik et al., 2002)

Cependant, l'un des artefacts majeur de cette technique est le contact du *cantilever* sur l'échantillon qui l'endommage en le rayant (Figure H-40). En SICM, la sonde est une micropipette de borosilicate qui détecte les variations de courant ionique entre le milieu et l'échantillon. Par conséquent, il n'y a aucun contact avec l'échantillon évitant sa dégradation (Figure H-40 B). L'autre avantage est la possibilité de travailler avec des cellules vivantes puisqu'il est nécessaire d'être dans un environnement ionique ce qui est compatible avec les solutions physiologiques. Les variations de courant enregistrées lors du balayage sont ensuite analysées pour restituer une image de la topographie membranaire dans le cas d'étude de cellules.

2- Le SICM : une technique polyvalente

A l'heure actuelle, les études d'altérations fonctionnelles au niveau tissulaire, cellulaire, et cytoplasmique utilisent des techniques expérimentales classiques qui sont extrêmement divergentes et qui reposent sur une combinaison de méthodes individuelles ne fournissant, habituellement, que des informations spatiales et temporelles limitées sur les paramètres d'intérêt. La microscopie de conductance ionique à balayage (SICM) est une nouvelle technique polyvalente capable d'apporter simultanément des données structurales et fonctionnelles sur les cellules vivantes mais aussi au niveau tissulaire et subcellulaire à une résolution nanométrique. Le SICM est une technologie d'imagerie multimodale qui permet l'analyse simultanée et dynamique de la morphologie membranaire et de divers paramètres fonctionnels (volume de la cellule, potentiels membranaires, contraction cellulaire, mesure de courants en canal unitaire et certains paramètres de signalisation intracellulaire) (Figure H-41).

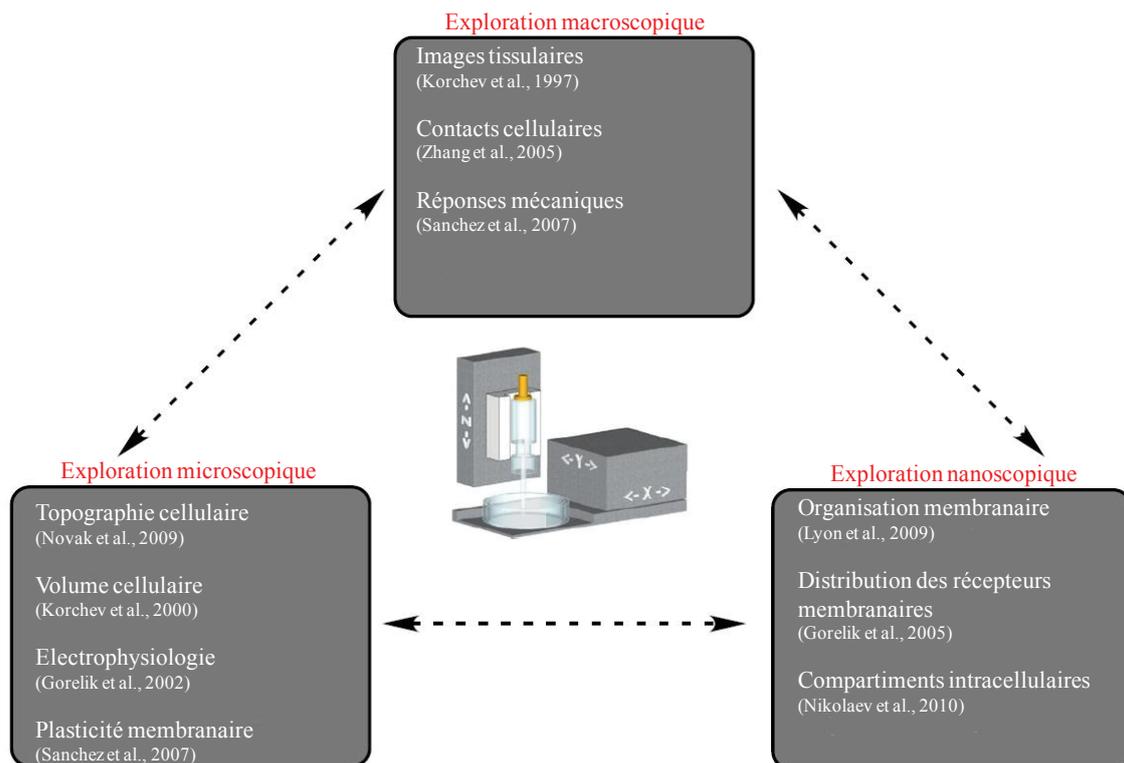


Figure H-41 : Illustration schématique de la microscopie de conductance ionique à balayage comme un outil performant d'exploration macroscopique, microscopique et nanoscopique des tissus et des cellules vivantes.

(Modifié d'après Miragoli et al., 2011)

a. Explorations macroscopiques

En 1997, Korchev et collaborateurs ont réussi à obtenir les premières images de cellules vivantes en culture, des mélanocytes de souris qui sont les cellules pigmentaires de la peau (Korchev et al., 1997a) (Figure H-42). Ils ont pu ainsi démontrer l'intérêt d'utilisation du SICM en décrivant le réseau cellulaire complexe que forment les mélanocytes sans les endommager. Ces cellules sont relativement petites, plates (Figures H-42 A et B) et présentent des structures comparables aux neurones telles que des dendrites, et des cils (Figures H-42 G et H respectivement). Du point de vue organisationnel, elles s'alignent les unes par rapport aux autres en développant des connections intercellulaires (Figures H-42 C et D) (Korchev et al., 1997a).

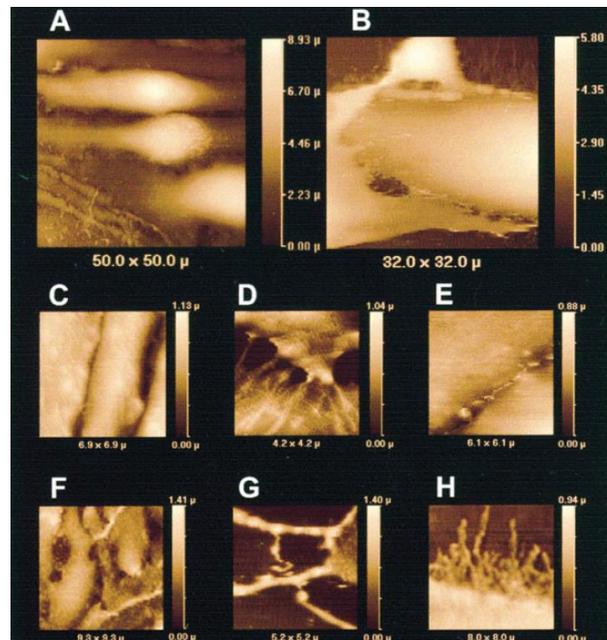


Figure H-42 : Images en microscopie de conductance ionique à balayage de lignées cellulaires de mélanocytes. Les mélanocytes sont des cellules bipolaires qui s'alignent les unes aux autres (A, C). Les zones contenant le noyau sont visibles pour les trois cellules en A (zones claires). Ces cellules ciliées (H) établissent des jonctions entre elles (B, F et G). Néanmoins, les cellules adjacentes ne sont pas adhérentes mais réalisent quand même des interactions localisées (C-E). (Modifié d'après Korchev et al., 1997a)

D'un point de vue macroscopique, les chercheurs se sont toujours intéressés aux propriétés mécaniques des cellules vivantes. Effectivement, ces fonctions sont essentielles pour la réalisation de nombreux processus physiques tels que la croissance, l'audition, l'équilibre, le toucher et la proprioception (la conscience de la position de son corps dans l'espace) (Ghazi et al., 1998). Sanchez et collaborateurs ont caractérisé en 2007 la

physiologie, la pharmacologie et la distribution membranaire des canaux mécanosensibles sur des neurones sensoriels en combinant la microscopie de conductance ionique à balayage, la technique de patch clamp, et des expériences de mesure de fluorescence calcique par microscopie (Figure H-43 A, B, et C) (Sanchez et al., 2007).

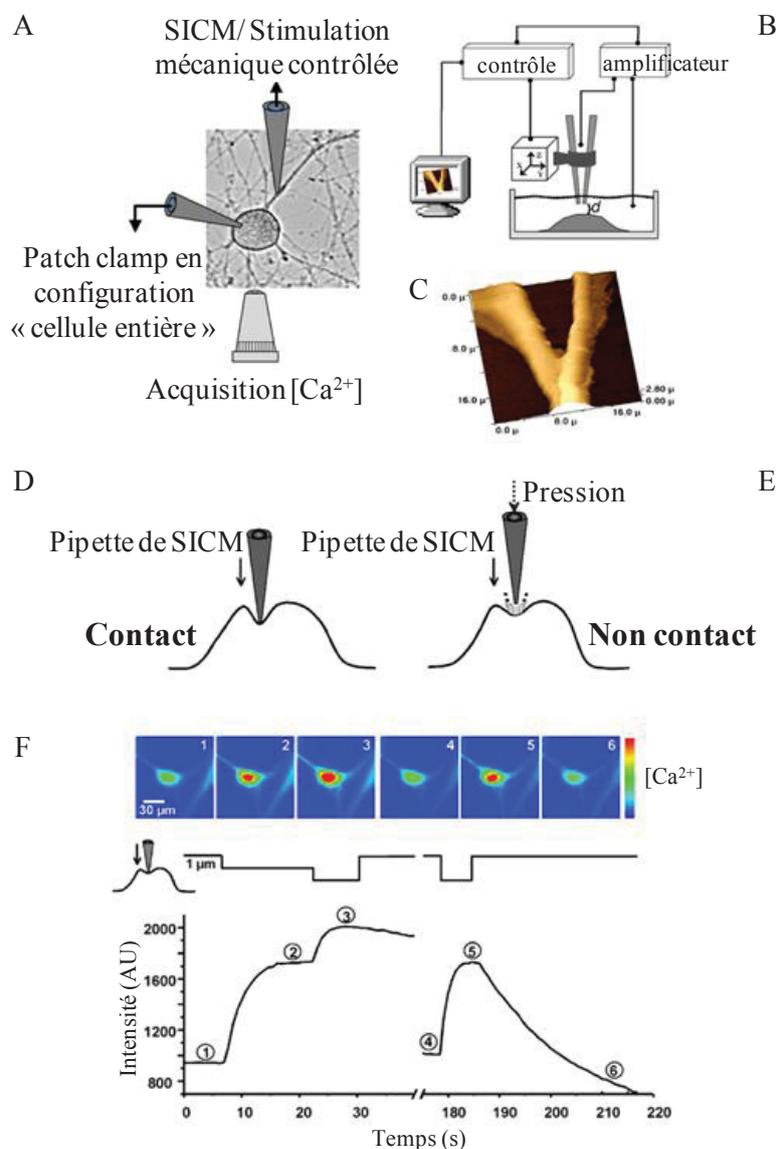


Figure H-43 : Système de stimulation mécanique des neurones sensoriels humains et acquisition des variations de calcium. Image en contraste de phase d'un neurone sensoriel humain montrant le corps cellulaire rond et le réseau dendritique (A). Une pipette (verticale) stimule mécaniquement la cellule, et une autre est utilisée pour les enregistrements de courant en patch clamp. Les expériences mesurant les variations intracellulaires de Ca²⁺ sont réalisées durant les stimulations mécaniques. Schéma illustrant le dispositif expérimental du SICM (B). Topographie, obtenue en SICM, d'une dendrite provenant d'un neurone (C). Illustrations schématiques des méthodes « en contact » (D) et « non contact » (E) utilisées lors des stimulations mécaniques. (F, haut) Images (1 à 6) montrant les variations de fluorescence de la sonde Fluo-4 dans un neurone. Le graphique montre les variations d'intensité de fluorescence en réponse à des stimulations mécaniques en mode « contact » répétées sur le corps cellulaire (F, bas). Les nombres sur le graphique correspondent à l'image de fluorescence au dessus.

(Modifié d'après Sanchez et al., 2007)

Pour stimuler mécaniquement les neurones, deux méthodes ont été utilisées. La première dite de « contact » se sert de la micropipette de SICM pour pousser la cellule (Figure H-43 D) et la seconde de « non contact » fait passer une solution à travers la pipette. Ce fluide va exercer une pression sur le corps cellulaire (Figure H-43 E). L'exemple de la figure H-43 F montre les enregistrements de fluorescence calcique réalisés suite à des stimulations mécaniques répétées en mode « contact ». Lorsque la pression de la pipette induit une dépression de 1 μm du corps cellulaire, la concentration intracellulaire en calcium augmente (image 1 à 2) et continue de s'accroître si la pipette continue de descendre de 1 μm de plus sur la cellule (image 3). Lorsque la pipette se retire, le taux de Ca^{2+} revient à la même fluorescence que celle mesurée à l'image 1 (image 4). En renouvelant l'expérience de stimulation mécanique mais en abaissant la pipette directement de 2 μm on obtient une augmentation calcique comparable à celle enregistrée à l'image 3 (image 5). Bien que cette approche ait permis à Sanchez et collaborateurs de prouver l'activation des canaux mécanosensibles par cette technique, ils ont quand même évolué vers la méthode « non-contact » pour éviter d'endommager les membranes cellulaires (Sanchez et al., 2007). Cette nouvelle fonction du SICM mise en place par cette équipe permet aujourd'hui d'envisager d'étudier les propriétés mécano-électriques de nombreuses préparations cellulaires telles que les épithélia ou les cardiomyocytes.

b. Explorations microscopiques

La microscopie de conductance ionique à balayage permet d'obtenir la topographie membranaire de cellules vivantes. Gorelik et collaborateurs (2002) ont réussi à étendre les fonctionnalités de cette technique en utilisant la pipette de SICM pour enregistrer des courants ioniques par la technique de patch clamp (Neher et Sakmann, 1976 ; Neher et al., 1978 ; Hamill et al., 1981). Cette nouvelle approche technologique est appelée « *smart-patch* ». Le balayage de la cellule est tout d'abord réalisé (Figures H-44 A et B), puis la pipette est approchée d'une zone d'intérêt pour effectuer un « *Giga-seal* » pour ensuite enregistrer des courants ioniques en configuration cellule-attachée (Figure H-44 C). Différentes préparations cellulaires furent testées : les spermatozoïdes d'oursin, des neurones, et des cardiomyocytes (Figures H-44 D, E, F, G : droite, respectivement). Gorelik et collaborateurs ont réussi à enregistrer des courants cationiques sur tous les échantillons : calciques (Figures H-44 D, E, G : gauche) et potassiques (Figure H-44 F gauche). Ils ont démontré que le « *smart-patch* » peut être utilisé pour mesurer de nombreux courants ioniques en configuration cellule-attachée à l'endroit voulu sur une large variété de types cellulaires. Cette technique peut

permettre de cartographier la densité et donc la position des canaux ioniques dans la membrane plasmique (Figure H-45) (Gu et al., 2002).

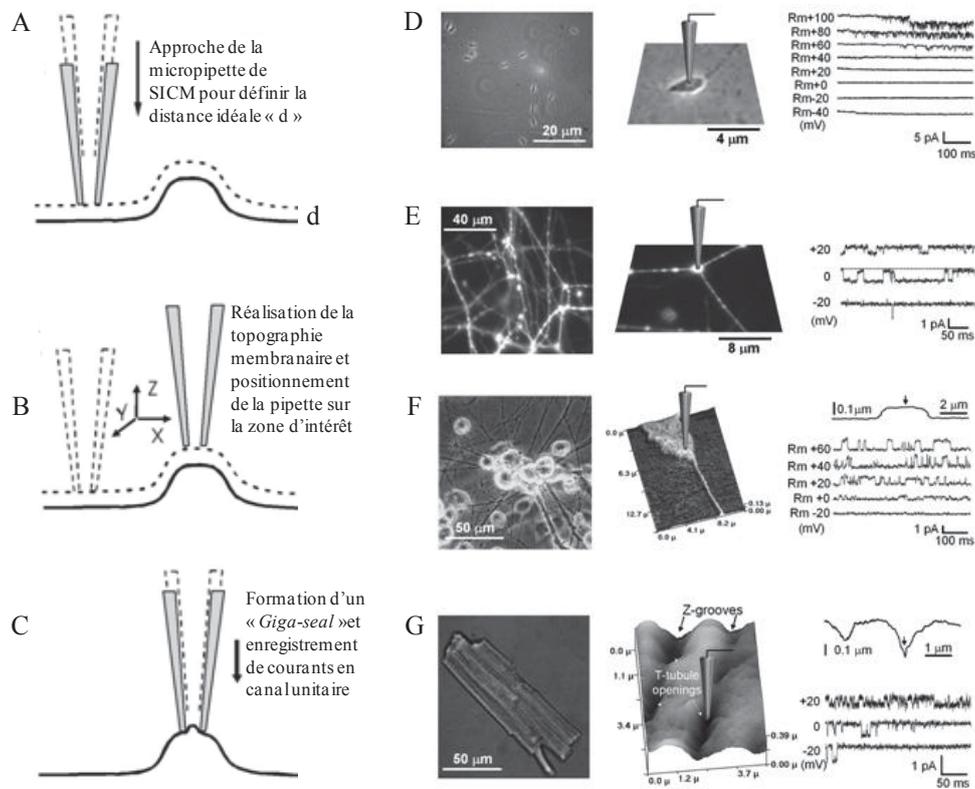


Figure H-44 : Principe du smart patch. (A) La micropipette de SICM approche de la surface cellulaire jusqu'à la distance « *d* » de référence maintenue par le système de rétrocontrôle. (B) Elle topographie la surface, puis elle est placée au dessus d'une région d'intérêt pour le patch clamp. (C) Elle est abaissée jusqu'à toucher la membrane, puis un « *giga-seal* » est réalisé pour les mesures de courant ionique. (D, E, F, G : droite respectivement) Images en microscopie optique de spermatozoïdes d'oursin, de neurites, de neurones, et d'un cardiomyocyte. (D, E, F, G : milieu) Schémas de la pipette sur les cellules. Enregistrements, en configuration cellule attachée, de courants calciques (D, E, G : gauche) et de courants potassiques (F, gauche). (Modifié d'après Gorelik et al., 2002)

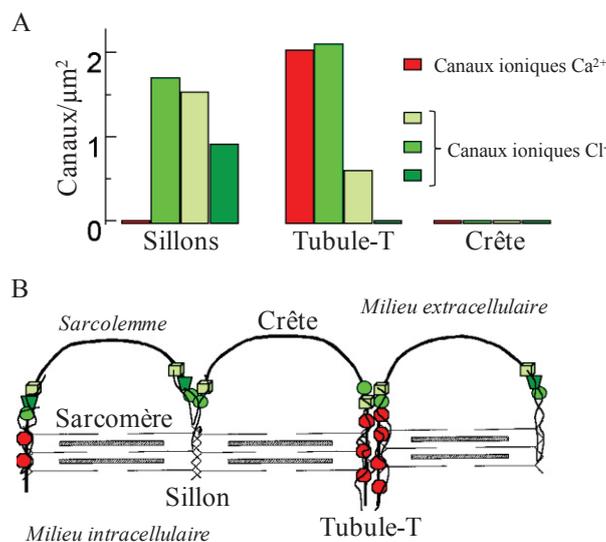


Figure H-45 : Distribution des canaux ioniques Ca²⁺ (DHPRs) et Cl⁻ dans un cardiomyocyte de rat. (A) Variation de la densité des canaux ioniques en fonction de la topographie membranaire. (B) Schématisation de leur distribution dans le sarcolemme.

(Modifié d'après Gu et al., 2002)

En 2009, Novak et collaborateurs ont mis au point un nouveau mode d'acquisition d'images par le SICM : le « *hopping mode* » expliqué dans l'Etat de l'art chapitre V paragraphe 3 (Novak et al., 2009). Ce programme permet d'obtenir des images de haute qualité grâce à ses résolutions temporelles et spatiales adaptatives. Pour tester si le « *hopping mode* » est assez rapide pour visualiser en direct les structures complexes, ils ont examiné des neurones issus de l'hippocampe (Figures H-46 A et D). C'était pour eux un vrai défi à relever car ces cellules forment un réseau tridimensionnel d'axones et de dendrites difficile à topographier pour toutes les microscopies à balayage. Le SICM révèle des structures ressemblant à des boutons synaptiques (jusqu'à 50-60 nm de diamètre) ainsi que de très fins prolongements identifiés comme des axones (Figures H-46 B, C et E). La précision et l'efficacité de ce nouveau mode d'acquisition sont maintenant reconnues et il peut servir à identifier des structures très fines dans des échantillons établissant des réseaux complexes.

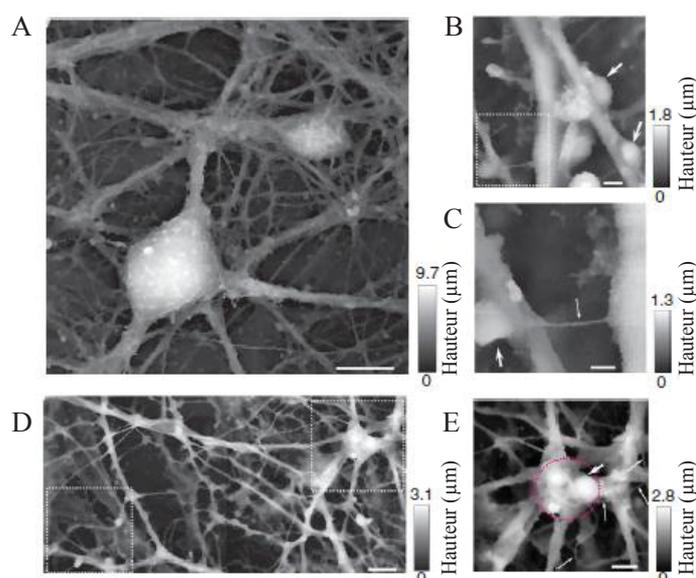


Figure H-46 : Images obtenues en SICM de neurones de l'hippocampe. (A) Image du réseau neuronal. (B) Image d'un bouton synaptique. (C) Topographie d'un autre bouton synaptique situé dans le carré en pointillés blancs dans l'image B. (D) Seconde image du réseau neuronal à un endroit différent et topographie d'un bouton synaptique (entouré par un cercle rouge) localisé dans la zone en pointillés blancs dans l'image D (E). Barres d'échelle : 10 μm (A), 1 μm (B), 500 nm (C), 5 μm (D, E). (Modifié d'après Novak et al., 2009)

c. Explorations nanoscopiques

Les maladies cardio-vasculaires sont les causes majeures de morbidité et de mortalité dans le monde. Lyon et collaborateurs (2009) se sont intéressés aux conséquences de l'insuffisance cardiaque sur la structure de la surface membranaire des cardiomyocytes qui présentent de

nombreuses anomalies fonctionnelles telles que des troubles de l'homéostasie calcique causant des arythmies (Pogwizd et Bers, 2004). Ils ont, tout d'abord, topographié le sarcolemme d'un myocyte ventriculaire sain (Figure H-47 A), puis celui d'un cœur insuffisant cardiaque (Figure H-47 B). La membrane plasmique d'une cellule normale montre une structure en crêtes et en sillons caractéristique des cardiomyocytes ventriculaires tandis que celle des malades présente des altérations avec une perte de cette organisation striée et des entrées de tubules-T. De plus, le marquage au di-8-ANEPPS révèle une diminution du réseau tubulaire expliquant les troubles de contractilité cardiaque (Figure H-47 D). Toutes ces données ont pu être quantifiées et analysées statistiquement par le calcul des ratios de tubules-T et de sillons (Z-grooves) (Figures H-47 E et F). Ainsi, le SICM combiné à du marquage et à de nouvelles méthodes d'analyse permet de réaliser une véritable exploration nanoscopique des structures intracellulaires de cardiomyocytes touchés par des pathologies mortelles (Lyon et al., 2009).

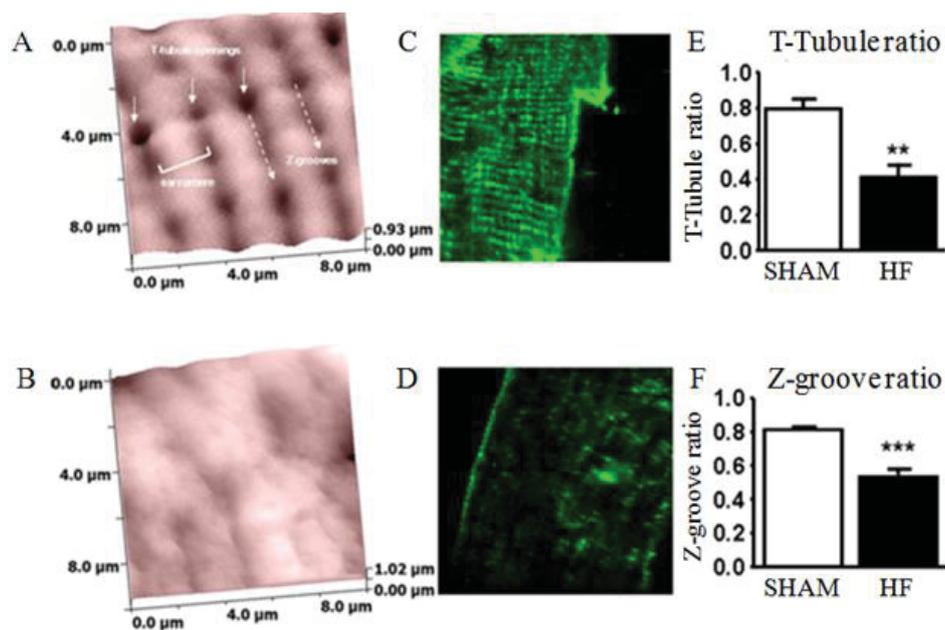


Figure H-47 : Images obtenues en SICM de la surface membranaire de cardiomyocytes de rats contrôles (SHAM, A) et en insuffisance cardiaque (HF : Heart Failure, B). Image en microscopie confocale d'une section de sarcolemme des myocytes SHAM (C) et HF (D) après marquage de la membrane par le di-8-ANEPPS. Ratio de tubules-T (E) et de sillons (z-groove, F) dans les cardiomyocytes SHAM et HF.

(Modifié d'après Lyon et al., 2009)

Etant donnée la structure membranaire des cellules ventriculaires cardiaques, il est judicieux de se demander s'il n'existerait pas sous le sarcolemme des compartiments cytoplasmiques définis où certaines protéines seraient spécifiquement localisées pour exercer

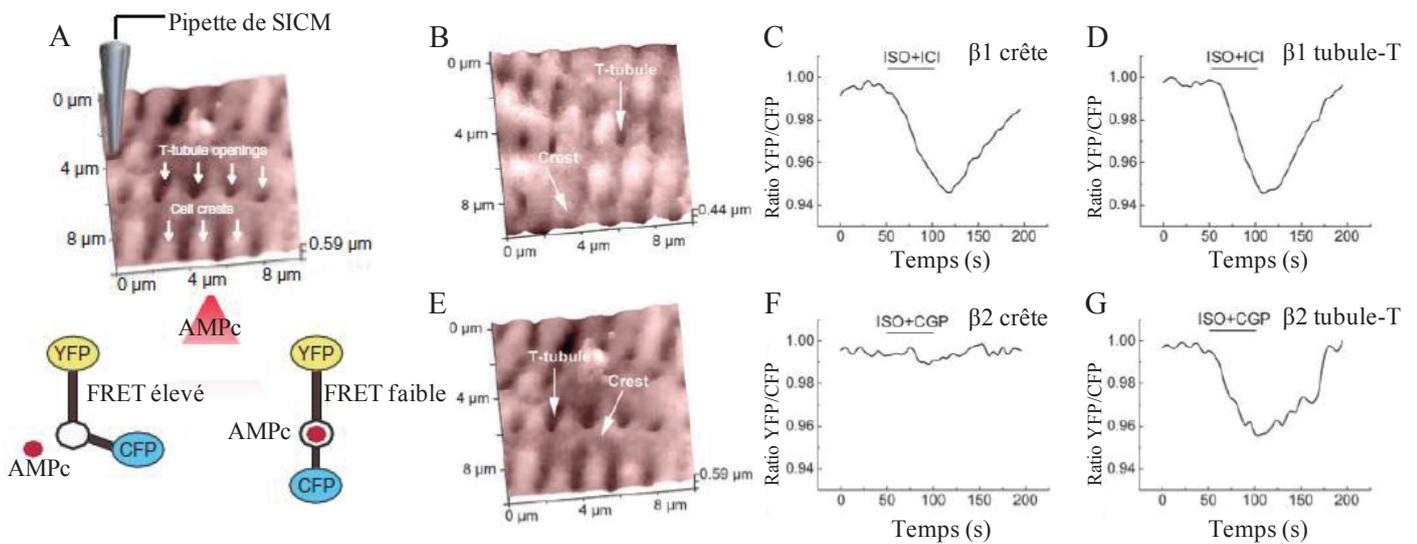
leur rôle. C'est la question à laquelle Nikolaev et collaborateurs (2010) ont tenté de répondre à propos de récepteurs β -adrénergiques qui jouent un rôle majeur dans la réponse cellulaire aux hormones catécholaminergiques (adrénaline) (Figure H-48). Pour comprendre la répartition de ces protéines à la surface des cardiomyocytes, ils ont combiné le SICM au FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) qui permet de mesurer les interactions entre deux protéines *in vivo*.

Le FRET emploie deux molécules fluorescentes différentes, un donneur et un accepteur, qui sont génétiquement fusionnées et où le pic d'émission de fluorescence du donneur doit se chevaucher avec le pic d'excitation de l'accepteur. Dans le FRET, l'énergie du donneur est transférée en partie à l'accepteur qui la réémet à sa longueur d'onde d'émission propre. Le résultat net est que le donneur émet moins d'énergie que normalement, tandis que l'accepteur émet plus d'énergie lumineuse à sa fréquence d'excitation (Figure H-48 A). Dans leur étude, Nikolaev et collaborateurs ont utilisé la sonde Epac2. Elle combine les fluorophores YFP (donneur) et CFP (accepteur) qui change de conformation en se liant à l'AMPC et permet de suivre l'activité de ces β -récepteurs. Effectivement, ces protéines produisent ce second messager lorsqu'elles sont activées par un ligand qui, dans cette expérience, est délivré par la pipette de SICM. Ainsi, en stimulant soit les crêtes, soit les tubules-T, ils calculent le ratio de fluorescence entre YFP et CFP, et déterminent où sont localisées les isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ des récepteurs adrénérgiques sur la membrane plasmique (Figures H-48 B, C, D, E, F et G). Leurs résultats montrent que les $\beta 1$ sont indifféremment placés sur les crêtes et les tubules-T (Figures H-48 C et D), alors que les $\beta 2$ seraient plus spécifiquement implantés dans les tubules-T (Figures H-48 F et G). Ainsi, il est intéressant de constater que les protéines ne sont pas uniformément réparties à la surface membranaire, et que cette compartimentation pourrait faire l'objet d'autres études pour développer des thérapies plus spécifiques.

d. Conclusion

Pour conclure, la microscopie de conductance ionique à balayage est une technique polyvalente et performante fournissant des images de hautes résolutions temporelles et spatiales de la surface de cellules vivantes. En l'associant à plusieurs autres méthodes d'études biologiques, des explorations macroscopiques, microscopiques et nanoscopiques peuvent être entreprises pour comprendre les fonctionnalités et la compartimentation cellulaires de structures, telles que des dendrites, des protéines comme les récepteurs β -adrénergiques.

Les perspectives d'exploitation du SICM sont très vastes car cette technologie peut être employée sur une très grande variété d'échantillons biologiques. C'est la raison pour laquelle notre laboratoire a décidé d'investir dans cette microscopie innovante et d'engager un projet d'étude sur les conséquences cellulaires de la cardiomyopathie dilatée associée à la dystrophie musculaire de Duchenne.



Position du problème

Position du problème

Comme cela a été décrit dans la partie « Etat de l'art », l'allongement de la durée de vie des patients atteints par la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a révélé d'autres aspects de la pathologie tels que la cardiomyopathie dilatée (CMD). Cet aspect est responsable de la mort prématurée des malades en moyenne à 25 ans. Bien que de nombreuses études ont été menées sur les patients pour définir les caractéristiques cliniques de la CMD, l'échocardiographie par exemple, peu de recherches fondamentales ont été entreprises, jusqu'à ce jour, pour déterminer les mécanismes cellulaires au niveau cardiaque. Les précédentes études concernant la DMD et menées sur le muscle squelettique, n'ont pas permis d'élucider le rôle physiologique de la dystrophine. Cependant, il a été clairement établi qu'elle constitue un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette qui lui conférerait un rôle stabilisateur des membranes. De plus, son absence conduit à une augmentation anormale du taux de calcium intracellulaire, entraînant la nécrose des cellules musculaires squelettiques. Ainsi sa disparition engendrerait la dérégulation des mécanismes membranaires participant à l'homéostasie calcique.

Actuellement il existe certaines données controversées qui montrent une fragilité du sarcolemme dans la DMD (Rowland, 1976 ; Petrof et al., 1993 ; Davies et Nowak, 2006). Des micro-ruptures pourraient être à l'origine d'une entrée massive de calcium dans le cytoplasme provoquant l'activation des mécanismes de nécrose cellulaire. Mais jusqu'à maintenant, les techniques à disposition ne permettaient pas d'explorer la surface membranaire de cellules vivantes à la recherche de perturbations architecturales. Cependant, Hansma et collaborateurs en 1989 ont eu l'idée de mettre au point une technique, la microscopie de conductance ionique à balayage (SICM), qui permet d'obtenir la topographie membranaire d'une cellule vivante. De nombreuses années d'amélioration et de perfectionnement ont été menées au Dr Yuri Korchev (1997a) et ses équipes pour permettre une commercialisation et donc une accessibilité du SICM par le plus grand nombre. Ainsi, Julia Gorelik et collaborateurs (2006) ont pu explorer la surface de cardiomyocytes ventriculaires sains de rat, et décrire une topographie organisée en crêtes et en sillons d'un intervalle de 2 μm correspondant à la taille des sarcomères intracellulaires. Ils ont également observé ces cellules, provenant de cœurs

atteints insuffisants, et ils ont pu mettre en évidence des altérations architecturales du sarcolemme telles que la perte de l'organisation en crêtes et en sillons. Il nous a donc semblé pertinent de mener des explorations similaires sur les cardiomyocytes ventriculaires de souris *mdx* âgées de 10 à 12 mois, c'est-à-dire lorsque la cardiomyopathie dilatée est installée, pour déterminer si l'hypothèse d'une modification de la membrane plasmique était observable. Ensuite, l'exploration du réseau tubulaire, structurellement en continuité avec la membrane plasmique, nous a semblé indispensable, car il constitue un élément déterminant dans le couplage excitation-contraction. Après une exploration structurale de notre modèle, une investigation fonctionnelle était nécessaire à mener pour savoir si les modifications membranaires impactaient sur les réponses calciques. Certaines études (Williams et Allen, 2007a ; Fauconnier et al ; 2010) ont mis en évidence des perturbations de l'homéostasie calcique dans les myocytes cardiaques *mdx*, nous avons voulu alors déterminer si des stimulations localisées par une solution dépolarisante engendraient des réponses calciques différentes. L'intérêt était d'interroger des tubules-T localisés pour savoir si tous sont à l'origine d'une réponse calcique d'une part, mais aussi pour déterminer les différences morphologiques et cinétiques des signaux de calcium d'autre part. De précédents travaux (Ullrich et al., 2009) ont montré que l'activité des canaux calciques de type L (DHPRs) restait inchangée dans les cardiomyocytes *mdx*. Les récepteurs à la ryanodine de type 2 (RYR2s) ont été suspectés d'être à l'origine des modifications calciques observées. Sarma et collaborateurs (2010), et Fauconnier et collaborateurs (2010) ont mis en évidence plusieurs modifications biochimiques des RYR2s qui seraient responsables d'une sensibilité accrue au Ca^{2+} des RYRs. Il nous a donc semblé pertinent d'observer les libérations spontanées et localisées de calcium dans les cellules au repos, car c'est un indice de l'activité de ces protéines. Enfin, l'organisation et la régularité des réseaux protéiques et membranaires ont été quantifiées pour connaître et confirmer les perturbations structurales observées.

Cette étude permet donc de dresser un profil des différents dommages structuraux et fonctionnels présents dans les cardiomyocytes *mdx* atteints par la CMD. Ces travaux ont pour objectif d'ouvrir à d'autres recherches plus mécanistiques sur le rôle joué par la dystrophine dans le cœur et ainsi permettre des avancées sur la compréhension globale de la cardiomyopathie dilatée associée à la DMD.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I-Matériel biologique : Cardiomyocytes ventriculaires

Les différentes expériences ont été réalisées sur les cardiomyocytes ventriculaires provenant de cœurs de souris contrôles C57BL/10 et de souris C57BL/10 *mdx*, modèle murin de la DMD (Bulfield et al., 1984). Les animaux utilisés proviennent de l'élevage mis en place dans l'animalerie de l'Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires. Ce sont des mâles âgés entre 10 et 12 mois pour correspondre au mieux à la physiopathologie de la cardiomyopathie dilatée (CMD) observée chez les patients DMD (Bostick, et al., 2010 ; Quinlan, et al., 2004).

1- Dissection

La souris est anesthésiée par une injection intrapéritonéale d'1 mL d'hydrate de chloral (60 mg/mL) héparinée (2500 unités/mL). Le cœur est rapidement prélevé par thoracotomie et disposé dans une solution physiologique de Tyrode (Annexe 1) héparinée (2500 unités/mL) à 4°C pour stopper les contractions cardiaques et limiter les conditions ischémiques. L'aorte est ensuite isolée des oreillettes, des poumons, et des amas graisseux pour être canulée à l'aide d'une aiguille ($\varnothing = 0.5$ mm). Ainsi, le sang résiduel est vidé par perfusion rétrograde des artères coronaires avec la solution de Tyrode héparinée à 4°C. Le cœur est ensuite connecté à un système de perfusion thermostaté à 37°C via la canule aortique selon la technique de Langendorff (Figure MM-1).

2- Digestion du cœur

Le cœur va être perfusé successivement par trois solutions (Annexe 1). Elles sont toutes oxygénées et chauffées à 37°C pour maintenir des conditions physiologiques viables pour le muscle cardiaque.

La première perfusion est une solution de Tyrode qui est diffusée durant cinq minutes pour que le cœur reprenne une activité contractile normale et retrouve un rythme cardiaque régulier. La deuxième perfusion est une solution de Tyrode sans calcium (0 Ca^{2+}) qui est

injectée pendant cinq minutes pour laver le cœur de son calcium afin d'arrêter les contractions et de fragiliser les connexions intercellulaires. La troisième perfusion est une solution enzymatique qui contient de la collagénase de type II (620 UI/mL, Worthington, Lakewood, NJ) et de la protéase XIV (0.104 UI/mL, Sigma). Cette solution enzymatique doit être filtrée à l'aide de filtres 0,2 μm pour limiter les contaminations fongiques et bactériennes. Elle est tout d'abord perfusée à travers le cœur pendant deux minutes, avant d'être supplémentée avec une solution de CaCl_2 pour que la concentration en calcium atteigne 50 μM . Cet ajout de calcium permet de potentialiser l'action enzymatique. La perfusion dure alors entre 10 et 20 minutes afin que les enzymes digèrent suffisamment la matrice extracellulaire sans nuire à l'intégrité cellulaire (Kabaeva et al., 2008).

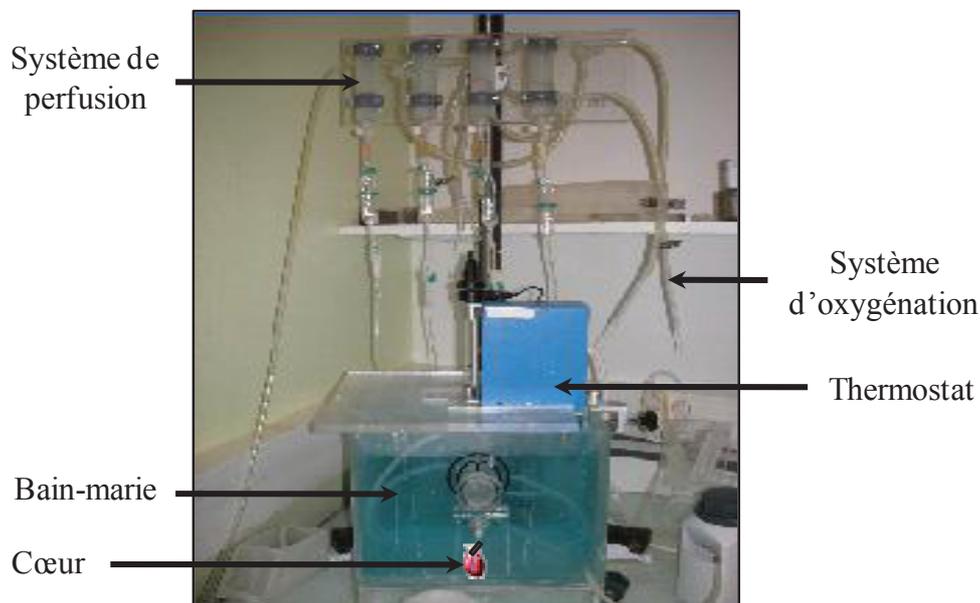


Figure MM-1 : Photographie du système de perfusion rétrograde utilisé pour digérer les cœurs de souris enzymatiquement selon la méthode de Langendorff

3- Isolement cellulaire

Lorsque la digestion enzymatique est suffisante, le cœur est débranché du système de perfusion et lavé dans plusieurs bains de solution de KB (pour Kraftbrühe, d'après Isenberg et Klöckner, 1982, Annexe 1) à 37°C pour arrêter l'action des enzymes. L'aorte, les oreillettes, et le ventricule droit sont retirés. Le ventricule gauche isolé est alors coupé en petits morceaux, puis dissocié mécaniquement à l'aide de pipettes Pasteur rodées à des diamètres décroissants. Les cardiomyocytes ventriculaires sont ainsi libérés dans la solution de KB qui est ensuite

filtrée à l'aide d'une toile à bluter (taille des pores : 150 μm) pour éliminer les fragments tissulaires et conserver uniquement les cellules cardiaques. Dix minutes de décantation sont ensuite nécessaires pour qu'un culot cellulaire se forme. Ce culot est lavé deux fois par une solution de Tyrode 0 Ca^{2+} pour repolariser les cellules vivantes et éliminer les cellules mortes. Le retour calcique est ensuite réalisé par la suspension des cellules dans un premier milieu de culture appelé « *plating* » (Annexe 1) contenant 25 μM de blebbistatine (inhibiteur de la myosine 2, Sigma). Les cardiomyocytes sont immédiatement ensemencés.

4- Ensemencement cellulaire

Les cardiomyocytes isolés sont ensemencés sur des boîtes de Pétri ($\varnothing = 35 \text{ mm}$, Nunc) à lamelle de verre collée et préalablement stérilisées aux rayons ultra-violet (UV). Comme les cardiomyocytes adhèrent difficilement à leur support, le fond des boîtes a été recouvert de matrigel (BD bioscience) qui a été dilué au $\frac{1}{2}$ dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Lonza). Les cellules sont incubées dans le milieu de « *plating* » durant au moins deux heures dans un incubateur (37°C , 5% de CO_2 et saturé en humidité) pour favoriser leur adhésion à leur support. Néanmoins, pour éviter les phénomènes de dédifférenciation qui se produisent pour les cellules cardiaques mises en culture (Lipp et Niggli, 1994 ; Louch et al., 2004), les cardiomyocytes sont utilisés dans les six heures suivant leur isolement.

II- Techniques de microscopie

1- La Microscopie de Conductance Ionique à Balayage

La microscopie de conductance ionique à balayage ou « Scanning Ion Conductance Microscopy » (SICM) est la technique que j'ai principalement utilisée durant mes trois ans de thèse. Elle a nécessité plus d'un an de mise au point au laboratoire et un stage de formation d'un mois dans le laboratoire de Julia Gorelik à Londres. C'est pourquoi elle est présentée et détaillée dans la cinquième partie de l'Etat de l'art de ce manuscrit.

2- La Microscopie confocale

a. Principe de la microscopie confocale

La microscopie confocale représente l'une des plus importantes améliorations dans le domaine de la microscopie optique. Cette technologie comprend plusieurs éléments : des lasers, des composants optiques, des dispositifs rapides de balayage, et des ordinateurs de traitement numérique des images. Elle a permis aux utilisateurs d'analyser l'intérieur d'objets microscopiques, et de les visualiser en trois dimensions. L'inconvénient principal de la microscopie à fluorescence traditionnelle est la perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permis de supprimer cet inconvénient. Effectivement, elle réalise des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et n'enregistre que la fluorescence émise dans le plan focal. Pour cela, un rayon laser exciteur pénètre dans un échantillon préalablement marqué par des fluorochromes. Il y a alors émission de rayons fluorescents provenant des différents plans de la préparation dans toute l'épaisseur de l'échantillon. Un diaphragme variable ou « *pinhole* » élimine le signal fluorescent provenant des autres plans. Les rayons d'intérêt passent alors à travers un bloc de filtrage des longueurs d'ondes, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateurs. Le signal est ensuite numérisé pour permettre la reconstitution d'images qui seront analysées.

b. Principe de la fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse induite par l'excitation d'une molécule par l'absorption de photons. Cette molécule fluorescente, appelée fluorophore ou fluorochrome, est capable d'absorber l'énergie et de la restituer rapidement ($<10^{-8}$ s) sous forme d'énergie

lumineuse (lumière d'émission). Néanmoins, une partie de l'énergie est absorbée par les autres molécules du milieu et une portion est perdue sous forme de chaleur. La diminution de l'énergie émise par rapport à l'énergie excitatrice est responsable du déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'ondes plus élevées. Ce déplacement du spectre d'émission facilite la séparation et la détection de la lumière de fluorescence qui est le signal spécifique délivré par le fluorophore (Figure MM-2).

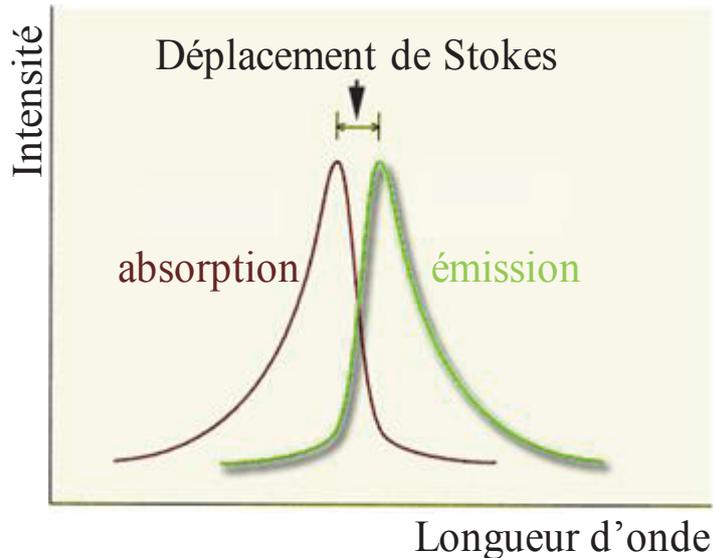


Figure MM-2 : Loi de Stokes

c. Microscope confocal Olympus FV1000

Ce système est équipé d'un microscope à fluorescence inversé Olympus IX81 motorisé. Plusieurs objectifs sont disponibles dont un x60 à huile (PLAPO) avec une ouverture numérique de 1,4 qui est utilisé pour obtenir une résolution maximale. Le dispositif est couplé à trois lasers comprenant cinq raies d'excitations : un laser Argon (458, 488 et 514 nm), un laser Hélium/Néon vert (543 nm) et un laser Hélium/Néon rouge (633 nm). Il est aussi doté d'un quatrième laser, une diode UV 405 nm, synchronisé avec le combiné laser et placé sur un second scanner, permettant ainsi la stimulation d'un échantillon sans interrompre l'acquisition du signal. La perception de la fluorescence est assurée par deux détecteurs spectraux dont la fenêtre varie entre 500 et 700 nm, et d'un détecteur équipé d'un filtre passe-haut pour la détection dans le rouge lointain. Le système est géré par le logiciel FluoView (Olympus) qui contrôle les paramètres d'excitation, d'acquisition, d'analyse et de traitement d'images (Figure MM-3).

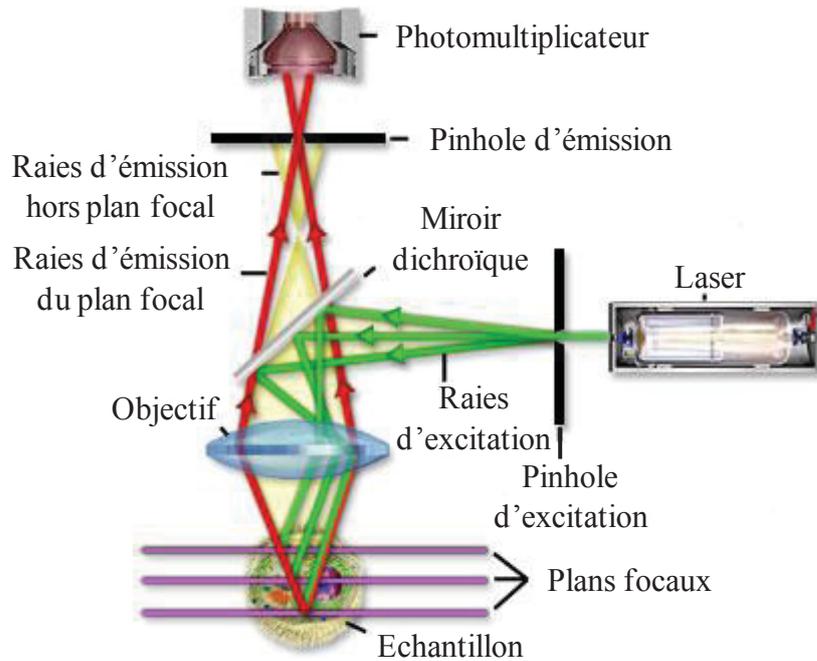


Figure MM-3 : Schéma du microscope confocal

d. Microscope confocal Bio-Rad MRC1024

Ce système est équipé d'un microscope à fluorescence inversé Olympus IX70. La résolution maximale est obtenue avec l'objectif à immersion à eau avec une ouverture numérique de 1,2 (PLAPO). Le dispositif est couplé à un laser Argon/Krypton ionisé (15 mW, Bio-Rad, MRC 1024) comprenant trois raies d'excitation : 488 nm, 568 nm et 647 nm. La fluorescence émise est filtrée par des filtres passe-bande sélectionnant les longueurs d'onde d'émission ; puis elle est captée par trois photomultiplicateurs permettant une détection simultanée ou séquentielle des signaux fluorescents. L'acquisition des signaux et le traitement des images sont réalisés à l'aide du logiciel d'acquisition Lasersharp 3.2 (Bio-Rad).

3- La Microscopie électronique à balayage

a. Principe de la microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage est une technique capable de restituer des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matières. En effet les atomes sont trop petits pour être visibles ou palpables, par conséquent leur observation est indirecte en analysant la façon dont ils perturbent un rayonnement incident. Comme les atomes cellulaires sont organisés de manière ordonnée, les

rayonnements incidents sont diffusés avec une intensité donnée dans certaines directions de l'espace. L'étude de leur répartition spatiale par diffraction diffusée permet de caractériser l'organisation de la matière.

b. Microscope électronique JSM 840A (JEOL)

Ce système est doté d'un microscope électronique à balayage conventionnel. Il est équipé des détecteurs d'électrons secondaires et d'électrons rétrodiffusés permettant de faire de l'imagerie (morphologie de surface, imagerie par contraste de numéro atomique) et de l'analyse sur la composition chimique des matériaux étudiés en fonction de la densité atomique moyenne. Les échantillons sont montés sur un plateau manuel à résolution de position de 0,25 μm . Ils peuvent être tournés sur 360°, inclinés de 90°, et être déplacés de 50 mm selon l'axe « x », de 70 mm selon l'axe « y », et de 40 mm selon l'axe « z ». La résolution spatiale à 35 kV est de 3,5 nm avec une plage de grossissement qui s'étend de 20 à 300 000 fois. Le système de microscopie électronique à balayage permet d'examiner de nombreux échantillons qui doivent être revêtus d'une matière conductrice comme l'or ou le carbone.

c. Préparation des échantillons

Les cardiomyocytes adhérant à leur boîte de Pétri de 35 mm par du matrigel dilué au ½ dans du DMEM (Lonza) sont fixés 45 minutes dans un tampon phosphate à pH 7,4 supplémenté avec 2,5% de glutaraldéhyde. Les cellules sont ensuite rincées trois fois dix minutes avec une solution de PBS (Annexe 3) puis elles sont déshydratées dans plusieurs bains successifs d'alcool à concentration croissante (deux fois à 50% durant deux minutes ; deux fois à 70% durant cinq minutes ; deux fois à 90% durant dix minutes et deux fois à 100% durant quinze minutes). Pour finir, les cardiomyocytes sont séchés avec de l'hexaméthylsilazane (HDMS) et métallisés avec un dépôt de 25 nm d'or. Les cellules sont ensuite examinées au microscope électronique à balayage 840 A à 15 kV à des grossissements 1000 et 10000.

III-Etude la topographie membranaire (SICM)

1- Dispositif expérimental

Le système est composé d'une micropipette obtenue à partir de capillaires de borosilicate d'un millimètre de diamètre extérieur et de 0,58 mm de diamètre interne par une étireuse laser (modèle P-2000, Sutter Instrument Compagny) (Figure MM-4).



Figure MM-4 : Obtention des micropipettes nécessaires à la microscopie de conductance ionique à balayage. A : Etireuse laser modèle P-2000. B : Micropipette obtenue à partir d'un capillaire de borosilicate.

(D'après le site internet www.ionscope.com)

Cette sonde est utilisée comme une interface entre le microscope et le système de contrôle qui stocke et traite les données pour restituer une représentation topographique. Une fois remplie d'une solution physiologique, elle est connectée à un amplificateur de patch clamp (200B) couplé à une Digidata 1322A (Axon Instruments), ainsi qu'à un ensemble de moteurs piézoélectriques qui contrôle ses déplacements dans les axes « x, y, z ». Ce système et l'amplificateur sont reliés au système de contrôle du SICM qui permet de maintenir la pipette toujours à la même distance de la cellule lors d'un balayage : c'est le système de rétrocontrôle (Korchev et al., 1997a, 1997b, 2000) (Figure MM-5).

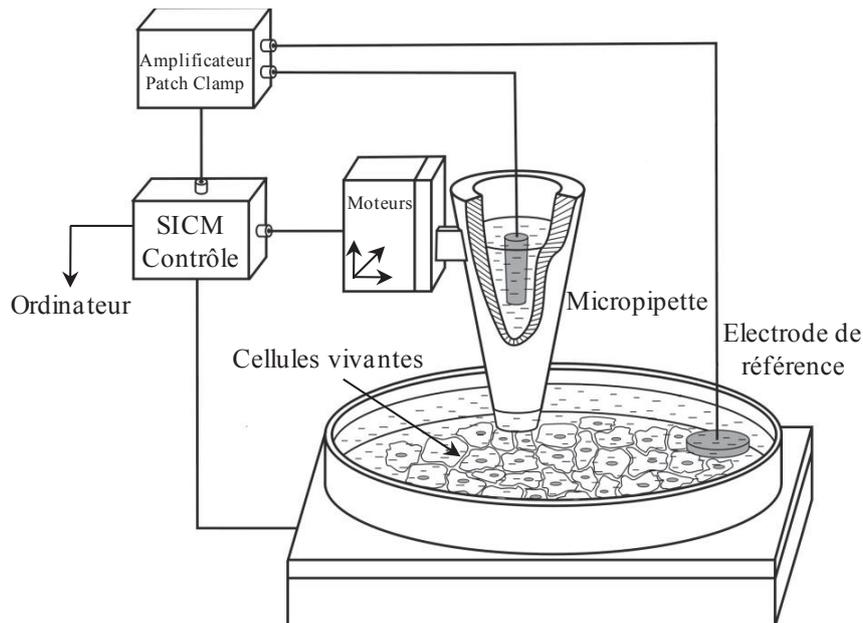


Figure MM-5 : Représentation du dispositif expérimental nécessaire à la microscopie de conductance ionique à balayage.

(Modifié d'après Korchev et al., 1997a)

2- Principe

Le principe physique utilisé dans le SICM est basé sur la résistance (R) au courant (I) passant entre la pointe de la pipette et l'échantillon (Figure MM-6). Plus la distance (d) entre la sonde et l'échantillon est faible, moins le courant est important et plus la résistance devient forte (Figure MM-6 B). Dans la pratique, la diminution du courant est d'abord infime (partie droite et plate de la courbe) puis elle s'accélère lorsqu'on se rapproche de l'échantillon (partie gauche de la courbe, Figure MM-6 B). Dès que cette réduction de I atteint 1%, le système de mesure du SICM déclare que la pipette est en « contrôle » au dessus de la cellule. Le système de rétrocontrôle asservit la position en z de la pipette à cette valeur I par les moteurs piézoélectriques, de façon à ce que le courant reste fixe. Comme le relief cellulaire est irrégulier, lors d'un balayage la hauteur de la pipette (par rapport à la surface) changera et ça se traduira par une variation significative du courant I . Ces modifications seront compensées par le système de contrôle pour maintenir constante la distance d entre la sonde et l'échantillon. Ainsi, les éventuelles variations de position en z de la pipette et donc du courant I correspondent à la topographie de la surface : la pointe suit le relief membranaire.

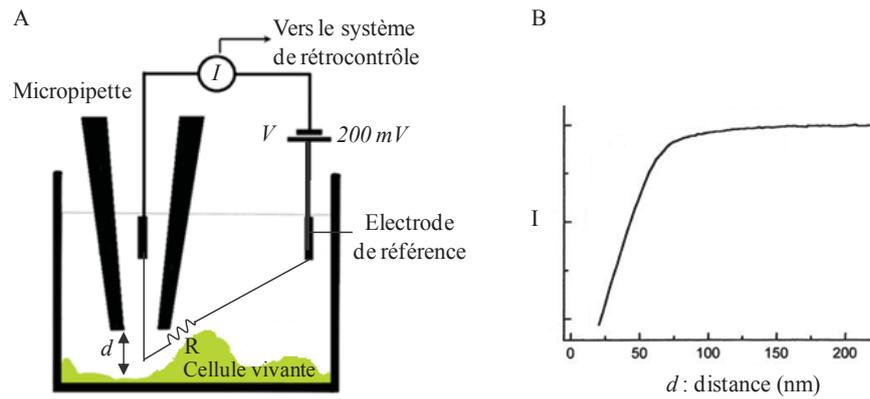


Figure MM-6 : Schémas représentant la technique de SICM. (A) Représentation de la technique de SICM montrant la micropipette traversée par un courant, I , résultant d'un potentiel imposé, V , au dessus d'une cellule vivante. (B) Variation du courant I en fonction de la distance d de la pipette à la surface cellulaire dans la technique de SICM.

(Modifiés d'après Korchev et al., 1997a)

Dans nos expériences, une fois la pipette placée au-dessus de la cellule, le balayage de la surface est réalisé selon un mode d'acquisition dérivé appelé « *hopping* » (Novak et al., 2009). Ce mode évite à la pipette de se casser lorsque de gros obstacles ou de grandes variations topographiques se présentent. Effectivement, la pipette, qui est positionnée à la distance d de référence au dessus de la membrane, remonte d'une valeur déterminée dans les paramètres d'enregistrement. Puis elle se déplace latéralement vers le premier point d'acquisition et descend vers le cardiomyocyte jusqu'à ce que le courant qui la traverse diminue d'1%. Alors le circuit de rétrocontrôle met en jeu les moteurs piézo-électriques pour qu'ils remontent la micropipette à sa position initiale. Puis elle se déplace à nouveau latéralement au point d'acquisition suivant (Figure MM-7).

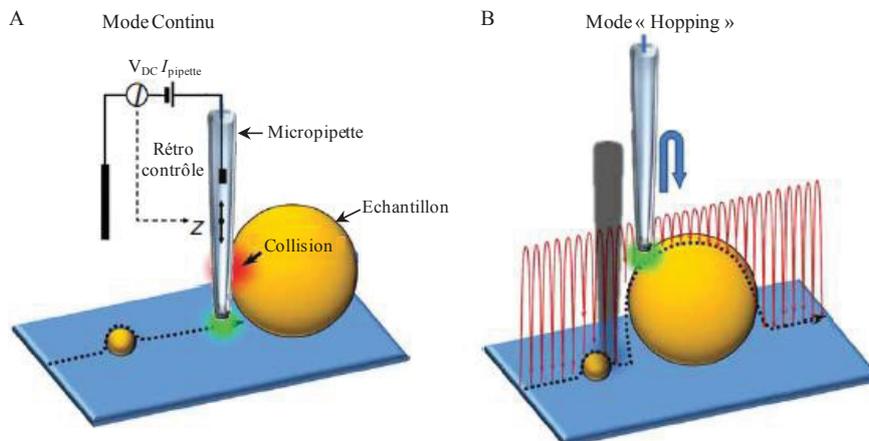


Figure MM-7 : Principe du mode d'acquisition « *hopping* » en SICM. A : Représentation d'une micropipette réalisant une topographie selon un mode de balayage continu et rentrant en collision avec un objet au dénivelé très important. B : Représentation du mode d'acquisition « *hopping* » où la micropipette est remontée à sa position de départ pour ensuite être déplacée au point d'acquisition suivant.

(Modifié d'après Novak et al., 2009)

Un autre avantage de ce mode « *hopping* » est la résolution adaptative d'acquisition des images. Avant d'être topographiée, la zone de balayage est divisée en plusieurs régions dont le relief va être préalablement évalué. Plus le dénivelé est important, plus la pipette va mettre du temps à acquérir les données pour obtenir la meilleure résolution de cette surface. Au contraire si la surface est plate, la pipette balaye rapidement à une plus faible résolution (Figure MM-8). Toutes ces variations de courant, obtenues à travers la micropipette, sont ensuite transformées en données numériques par le logiciel ScanIC Image (Ionscope) pour restituer une image de la surface du cardiomyocyte.

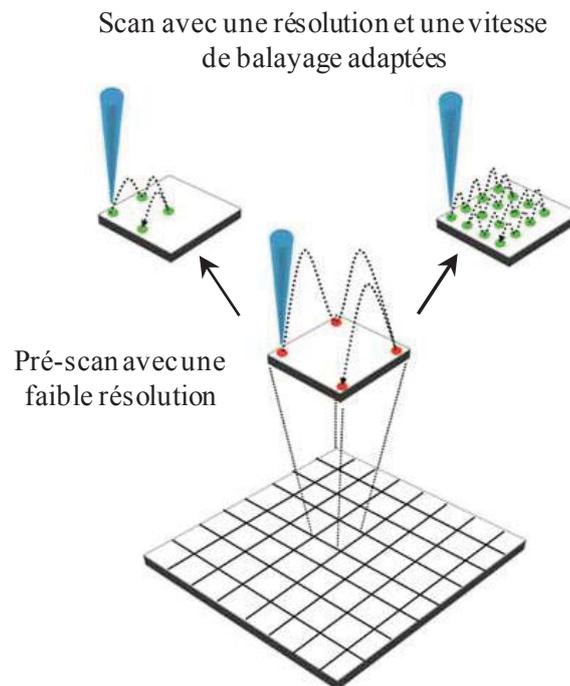


Figure MM-8 : Illustration du principe de la résolution adaptative en SICM. La zone d'intérêt est divisée en plusieurs régions de même taille (grille du bas). Avant la réalisation d'un balayage, la micropipette évalue le relief de l'échantillon dans chaque région (schéma du milieu). Les régions à faible dénivelé sont topographiées à une faible résolution (schéma en haut à gauche), tandis que celles à dénivelé important sont balayées avec une résolution élevée (schéma du haut à droite). (Modifié d'après Novak et al., 2009)

3- Milieux extracellulaires et intra-pipettes

Le paramètre principal et crucial est l'adhérence des cardiomyocytes à leur support. Pour répondre à cette exigence les boîtes de Pétri sont recouvertes de matrigel dilué au demi dans du DMEM (Lonza). Les cellules sont incubées dans une solution de Tyrode (Annexe 1) supplémentée de 100 μM de blebbistatine pour les maintenir au repos. Pour réaliser la

topographie membranaire des myocytes, une pipette de borosilicate est remplie d'une solution de Tyrode (Annexe 1) pour permettre le passage du courant.

4- Paramètres d'acquisition

Le logiciel d'acquisition ScanIC Image (version 1.9.1.0, Ionscope) est configuré pour réaliser des images de 512 par 512 pixels d'une zone d'intérêt de 15 par 15 μm selon le mode d'acquisition « *hopping* » (Novak et al., 2009). La pipette utilisée possède une résistance d'environ 100 M Ω avec un rayon interne à son extrémité de 75 nm. La durée d'un balayage peut varier entre 20 et 30 minutes en raison du principe de résolution adaptative employé par le logiciel d'acquisition.

5- Analyse des données

Plusieurs paramètres peuvent être calculés à partir des images obtenues par la technique de SICM : le Z-groove ratio et le calcul de surfaces.

a. Z-groove ratio

Le Z-groove ratio est un indice qui représente la quantité de sillons que possède une surface cellulaire. Pour l'obtenir, la longueur des sillons observée sur la topographie membranaire obtenue en SICM est divisée par la longueur théorique maximale de ces sillons sur cette même image (Gorelik et al., 2006).

b. Calcul de surfaces

Trois types de surface sont répertoriés parmi toutes les images de topographie membranaire obtenues sur les cardiomyocytes BL10 (contrôles) et *mdx* :

- surface sillonnée
- surface plate
- surface avec « nids de poule »

La proportion de chaque catégorie dans chaque image est calculée par le logiciel ScanIC Image version 1.0.0.0 (Ionscope) en divisant chaque type de surface par la superficie totale de l'image.

IV- Etude de l'activité calcique intracellulaire

1- Principe de la sonde Fluo-4-AM

La sonde Fluo-4-AM (Fluo-4-AcetoxyMethyl-ester, Invitrogen) est un dérivé chimique de chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA, et peut donc se lier spécifiquement au calcium (Figure MM-9). C'est une sonde mono excitation/mono émission utilisée pour mesurer des cinétiques rapides de variation du calcium intracellulaire, mais elle ne permet pas une mesure de la concentration cellulaire absolue de cet ion.

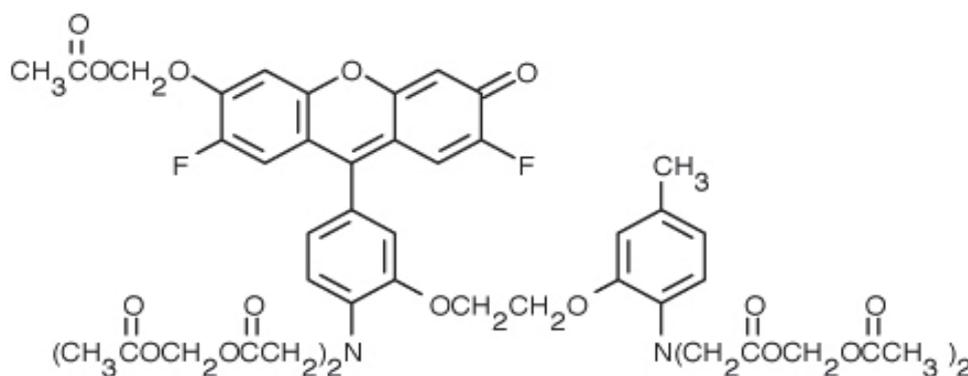


Figure MM-9 : Structure de la sonde Fluo-4-AM

Le groupement acetoxy-méthyle-ester (AM) rend le Fluo-4-AM perméant en masquant les charges négatives des groupements carboxyles de la molécule. Ainsi, la sonde peut traverser la membrane plasmique de la cellule et pénétrer dans le cytoplasme. Une fois dans le milieu intracellulaire, des estérases endogènes clivent le groupement AM et libèrent la forme carboxylée du Fluo-4 qui peut alors se lier au calcium. Pour mesurer les variations du calcium intracellulaire, la sonde doit être excitée par un laser à une longueur d'onde de 488 nm pour émettre une fluorescence à 522 nm qui est le reflet de l'activité calcique (Figure MM-10).

2- Mesure des libérations calciques lors d'une stimulation localisée

a. Système de stimulation

La technique de stimulation localisée appelée aussi microperfusion nécessite la combinaison de la microscopie de conductance ionique à balayage (SICM) et la microscopie confocale Bio-Rad MRC1024. Dans cette expérience la micropipette de SICM est utilisée pour perfuser des molécules pharmacologiques durant une seconde grâce à une pression de 100 kPa appliquée à travers le capillaire de verre.

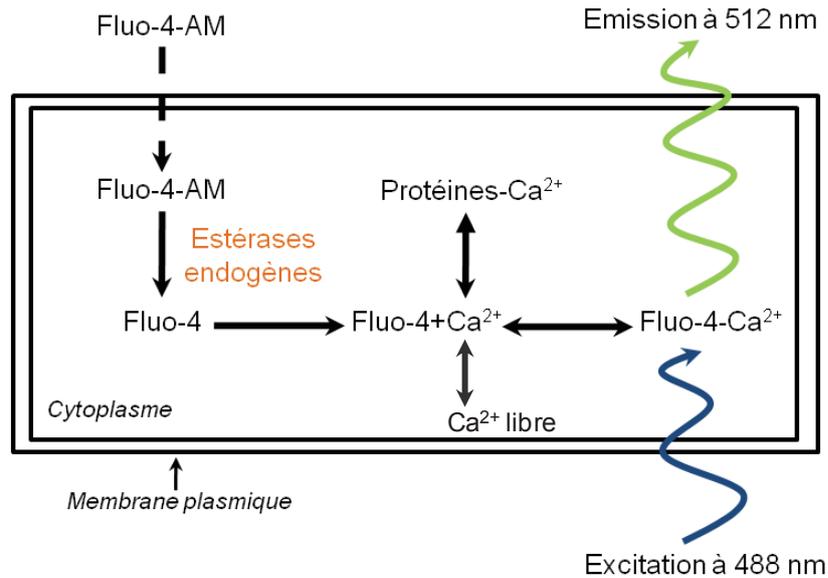


Figure MM-10 : Principe de l'entrée et de la détection de la sonde Fluo-4-AM

L'emploi du SICM permet de garder la micropipette à la même distance de la cellule. Cette distance est égale au rayon interne de l'extrémité de la pipette c'est-à-dire 90 nm (déterminé par microscopie électronique à balayage). Le deuxième avantage est la précision de localisation avec laquelle les perfusions sont appliquées. Effectivement, après avoir réalisé une image de la surface d'un cardiomyocyte, il est possible de choisir les coordonnées membranaires où sera perfusée une solution (Figure MM-11).

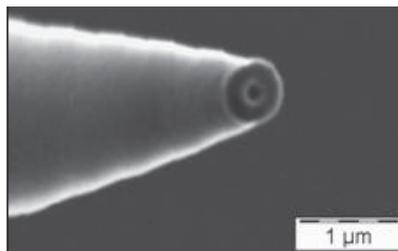


Figure MM-11 : Photographie en microscopie électronique à balayage d'une micropipette de SICM utilisée pour les microperfusions localisées

L'emploi de la microscopie confocale Bio-Rad MRC1024 permet de suivre les variations globales de fluorescence de la sonde Fluo-4. L'acquisition des données se réalise sous un objectif x60 à eau d'une ouverture numérique de 1,2. Suite à l'incubation des cellules avec du Fluo-4, la sonde est excitée à une longueur d'onde de 488 nm par un laser Argon/Krypton puis les variations de fluorescence reflétant l'activité calcique de la cellule sont détectées à 522 nm par le système d'acquisition.

b. Charge des cardiomyocytes

Les cellules sont incubées 20 minutes dans une solution physiologique toujours supplémentée de 100 μM de blebbistatine et de 6 μM de Fluo-4. Pour comprendre la relation entre l'organisation de la membrane plasmique obtenue en SICM et l'activité calcique des cardiomyocytes *mdx* lors du couplage excitation-contraction, différents milieux extracellulaires sont utilisés comprenant ou non des molécules pharmacologiques (Tableau MM-12).

Milieu extracellulaire	Molécules pharmacologiques	Concentration
Tyrode	Nifédipine	10 μM
Tyrode	Ryanodine	100 μM
Tyrode	Tétradotoxine (TTX)	10 μM
Tyrode	-	-
Tyrode 0 Ca^{2+}	-	-

Tableau MM-12 : Molécules pharmacologiques testées sur les cardiomyocytes lors des expériences de microperfusion localisées

c. Micropipette

La micropipette de SICM a deux fonctions dans les expériences de stimulations localisées. Dans un premier temps, elle est nécessaire à la réalisation d'une image de la topographie membranaire de 512 par 512 pixels représentant une surface de 15 par 15 μm sur le cardiomyocyte. Puis sous l'application d'une pression de 100 kPa, elle est utilisée pour microperfuser, durant une seconde, des solutions de Tyrode (Tyrode ou Tyrode 0 Ca^{2+}) dépolarisantes (100 mM de KCl) dans une zone membranaire localisée et choisie par l'expérimentateur (Figure MM-13). Le débit (I_0) de perfusion délivré par la pipette dépend de plusieurs facteurs (Figure MM-14) :

- Rayon interne de la pipette : r_i (μm)
- Pression appliquée à travers la pipette : ΔP (kPa)
- Viscosité de la solution intra-pipette : η (mPa.s)
- La moitié de la mesure de l'angle interne que réalise la pointe de la pipette : θ ($^\circ$)

- La durée de la microperfusion : t (s)

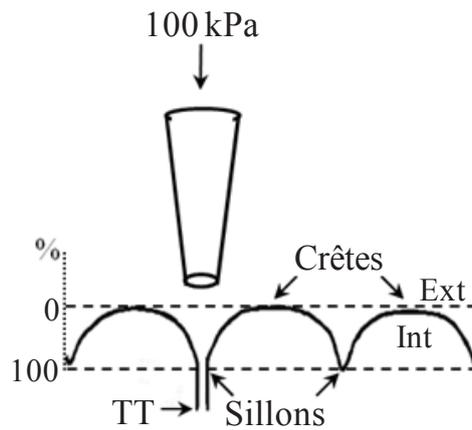


Figure MM-13 : Schéma d'une microperfusion localisée à la surface membranaire d'un cardiomyocyte



Figure MM-14 : Débit de solution sortant de la micropipette lors d'une microperfusion localisée

(Nikolaev et al., 2009)

d. Protocole d'acquisition

Le logiciel Lasersharp 3.2 (Bio-Rad) enregistre les variations de fluorescence de la sonde Fluo-4 dans une région d'intérêt de 40 par 40 μm englobant la région de balayage du SICM. L'acquisition des données est réalisée au cours du temps sous forme de courbes selon le mode « X, Y », à la vitesse d'une image toutes les 600 ms.

e. Analyse des données

L'analyse des courbes par le programme Excel 2007 a permis de calculer quatre paramètres caractérisant les réponses calciques obtenues par les stimulations localisées (Figure MM-15):

- L'amplitude maximale de fluorescence : $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$: la différence entre la fluorescence maximale (F) et la fluorescence de base (F_0) est divisée par la fluorescence de base (F_0).

- La durée du signal à la moitié de son amplitude maximale : *Full Duration at Half Maximum (FDHM, s)*
- Le temps nécessaire au signal pour atteindre son maximum : *Time To Peak (TTP, s)*
- La vitesse de montée du signal à son maximum : *Rise Rate (RR, s⁻¹)*

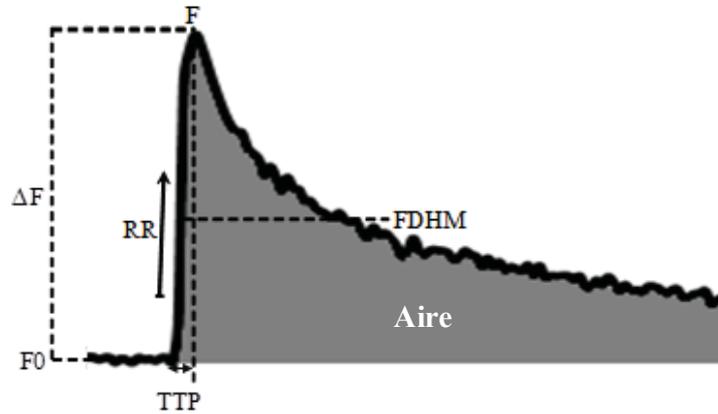


Figure MM-15 : Exemple de tracé représentant l'augmentation de calcium intracellulaire lors d'une microperfusion et les différents paramètres analysés

3- Mesure des libérations calciques spontanées

a. Principe

Les événements calciques spontanés ou « *sparks* » sont visualisés dans une cellule au repos par l'utilisation de la sonde Fluo-4-AM. Ils représentent des libérations très brèves, très localisées et physiologiques de calcium par les récepteurs à la ryanodine de type 2, situés à la membrane du réticulum sarcoplasmique en dehors de toute stimulation des cardiomyocytes.

b. Système d'acquisition

L'acquisition des données a été réalisée par le système de microscopie confocale Bio-Rad MRC1024 sous un objectif x60 à eau d'une ouverture numérique de 1,2. La sonde Fluo-4, préalablement chargée dans les cardiomyocytes au repos, est excitée à une longueur d'onde de 488 nm par un laser Argon/Krypton afin de détecter toutes variations de fluorescence dans les cellules.

c. Charge des cardiomyocytes

Les cellules cardiaques sont incubées avec 6 μM de Fluo-4-AM et 100 μM de blebbistatine dans une solution de Tyrode (Annexe 1). Le temps de charge nécessaire à l'incorporation de la sonde est d'au moins 20 minutes.

d. Protocole d'acquisition

Le logiciel Lasersharp 3.2 (Bio-Rad) enregistre les variations de fluorescence de la sonde Fluo-4 au cours du temps le long d'une ligne de balayage placée sur le cardiomyocyte. L'acquisition des données est réalisée selon le mode « X, T », à la vitesse d'une image de 512 pixels, 1 ligne toutes les 2 ms (Figure MM-16).

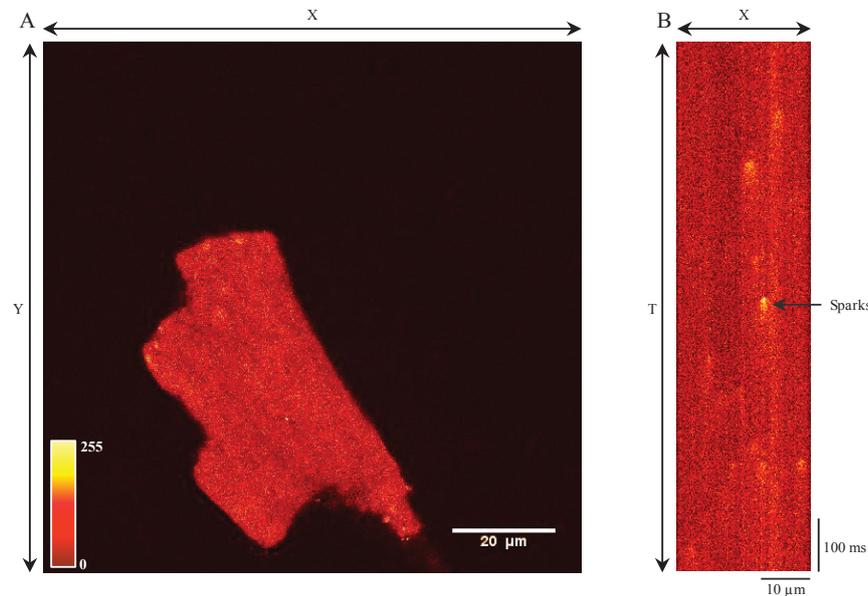


Figure MM-16 : Exemple d'acquisition selon le mode « X, T » de libérations calciques spontanées dans un cardiomyocyte au repos. A : Image de microscopie confocale (Bio-Rad) d'un cardiomyocyte chargé en Fluo-4. B : Acquisition des variations de fluorescence de la sonde Fluo-4 dans un cardiomyocyte selon le mode « X, T ».

e. Analyse des données

Les données obtenues sont analysées par le programme HARVELE (Sebille et al., 2005) développé sous le logiciel IDL 6.3. Les *sparks* sont alors identifiés sur les enregistrements et cinq paramètres d'amplitude et de cinétiques les caractérisant sont calculés :

- L'amplitude maximale de fluorescence du *sparks* : $\Delta F/F_0 = (F-F_0)/F_0$: la différence entre la fluorescence maximale (F) et la fluorescence de base (F_0) est divisée par la fluorescence de base (F_0).
- La durée du signal à la moitié de son amplitude maximale : *FDHM* (ms)
- La largeur du signal à la moitié de son amplitude maximale : *FWHM* (μm)
- Le temps de montée du signal pour atteindre son maximum : *Rise Time* (ms)
- La fréquence de *sparks* au cours du temps : Fréquence (Events.μm⁻¹.s⁻¹)

V- Techniques de marquage

1- Marquage par sonde fluorescente : le di-8-ANEPPS

a. Généralités

Le di-8-ANEPPS (di-8-butyl-amino-naphtyl-ethylene-pyridine-propyl-sulfonate ; Figure MM-17) est une sonde fluorescente qui a été développée pour détecter les variations rapides (de l'ordre de la milliseconde) du potentiel membranaire de cellules excitables (neurones, et cardiomyocytes). Il est composé de groupements aliphatiques pour s'insérer dans les environnements lipidiques tels que les membranes plasmiques, et d'un groupement sulfonique pour ne pas être internalisé dans les cellules et permettre une observation microscopique prolongée. Dans notre étude, la fonction de cette sonde a été détournée pour visualiser et analyser l'organisation structurale des tubules-T (Louch et al., 2004).

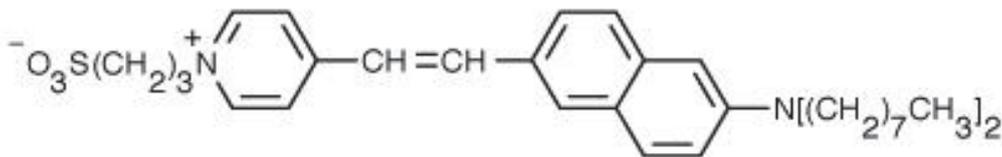


Figure MM-17 : Structure de la sonde di-8-ANEPPS

b. Protocole

Une fois les cardiomyocytes isolés et ensemencés sur des boîtes de Pétri à lamelle de verre collée, ils sont incubés durant 15 minutes avec 10 μM de di-8-ANEPPS dans un milieu riche en potassium (Annexe 3), pour conserver les cellules au repos. Les marquages de la membrane plasmique et des tubules-T sont ensuite observés au microscope à fluorescence Olympus FV1000, en excitant le di-8-ANEPPS à une longueur d'onde de 488 nm par un laser Argon/Krypton. L'acquisition de la fluorescence émise par la sonde à 620 nm se fait selon l'axe z, pour obtenir une image de 800 pixels tous les 0,3 μm sous un objectif à huile x60 d'une ouverture numérique de 1,4.

c. Analyse des données

A partir des images obtenues par le logiciel FluoView (Olympus), des grossissements sont réalisés d'une taille de 33,12 μm de largeur sur 12,65 μm de hauteur sous le programme ImageJ 1.41n. Quatre paramètres sont ensuite calculés sous IDL 6.3 :

- Le power
- Le volume ratio
- La quantité d'éléments transverses : TEs (%)
- La quantité d'éléments longitudinaux : LEs (%)

i. Transformée de Fourier et Power

La transformée de Fourier rapide (FFT) est une méthode mathématique basée sur les équations de Jean-Baptiste Joseph Fourier établies en 1822. Elle permet de transformer un signal de son espace spatial à son espace de fréquence. Elle est largement utilisée lors de traitements de signaux afin d'éliminer les éléments qui correspondent à une fréquence de bruit. La FFT permet également d'identifier des régularités dans un signal. Dans le cas d'une image (Figure MM-18 A), la régularité de formes correspondant à des striations dans la dimension spatiale se caractérise par un pic de fréquence lorsque cette image est transformée par la méthode de Fourier (Figure MM-18 B). Plus la valeur de ce pic (power) est importante, plus le réseau est régulier. De plus, la détermination de la position du pic permet de calculer le pas de régularité de ce réseau (Figure MM-18 B).

Ainsi, le power est un indice qui représente la puissance de la régularité d'un réseau. Il est calculé à partir de chaque image par la méthode de transformée de Fourier rapide (FFT : Fast Fourier Transform) en deux dimensions (2D) et est rapporté à une grille construite dont la régularité vaut 100% (IDL 6.3).

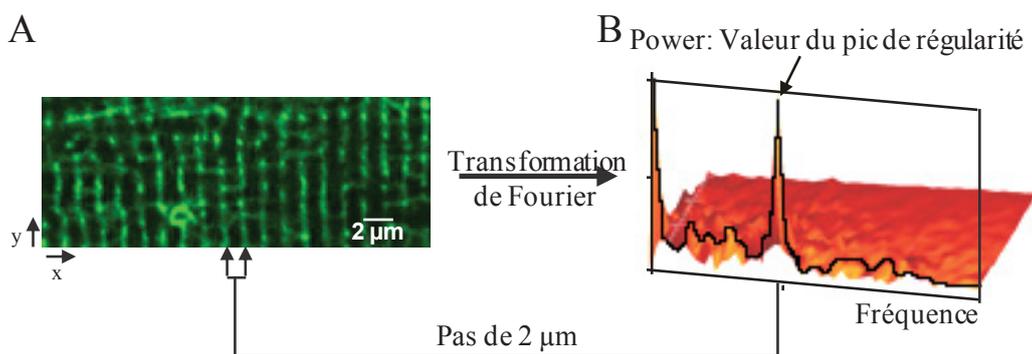


Figure MM-18 : Illustration de la méthode de transformée de Fourier. (A) Exemple d'image obtenue en microscopie confocale d'un cardiomyocyte ventriculaire dont le réseau de tubules-T est marqué au di-8-ANEPPS. (B) Transformation du signal fluorescent dans l'espace des fréquences par la FFT. Les pics représentent la régularité du réseau et sa fréquence donne la valeur du pas entre deux tubules-T.

(Obtenue au laboratoire)

ii. Volume Ratio

Le volume ratio est un index qui représente la quantité de tubules-T dans les cardiomyocytes. Pour le calculer, un seuillage est d'abord réalisé sous le logiciel ImageJ 1.41n pour déterminer sur chaque grossissement si les pixels appartiennent ou non au marquage des tubules-T par le di-8-ANEPPS. Puis une binarisation (en 0 et 1) de l'image initiale est réalisée, à partir de laquelle le volume ratio est calculé en divisant la somme des pixels contenant la valeur 1 par la somme de l'ensemble des pixels de l'image (0+1).

iii. Le réseau de tubules-T

Le réseau de tubules-T d'un cardiomyocyte est composé d'éléments transversaux (TEs) et longitudinaux (LEs) qui forment un système de conduction rapide du potentiel d'action (PA) à l'intérieur de la cellule, auprès des protéines impliquées dans le couplage d'excitation-conduction (Song et al., 2006).

Pour calculer la proportion de TEs et de LEs dans le réseau de tubules-T, deux seuillages sont réalisés pour déterminer la valeur maximale du marquage au di-8-ANEPPS selon l'axe « y » puis selon l'axe « x » sur chaque image. Ainsi une première « grille » (masque) dont la largeur des bandes est de 2 μm peut ainsi être construite selon l'axe des « y » par le logiciel IDL 6.3 (Figure MM-19 C). Elle est ensuite superposée à la représentation binaire de l'image d'origine pour calculer le nombre de pixels se trouvant sous la « grille » donc appartenant aux TEs. Puis tous ces pixels sont retirés de l'image, et une seconde grille, construite sur le même principe mais selon l'axe des « x » (Figure MM-19 D), est superposée à la représentation binaire. De la même manière, tous les pixels se trouvant sous la grille sont considérés appartenir aux LEs. Enfin le nombre de pixels, appartenant soit aux LEs soit aux TEs, est divisé par le nombre total de pixels de l'image pour obtenir la proportion de chaque élément dans le réseau de tubules-T (Figure MM-19).

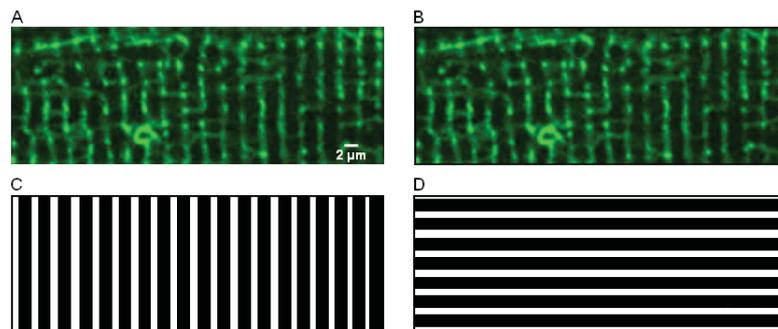


Figure MM-19 : Représentation de l'analyse des éléments longitudinaux et transversaux du réseau de tubules-T dans un cardiomyocyte. A, B : Grossissement du réseau de tubules-T d'un cardiomyocyte BL10. C : « Grille » de sélection des pixels d'intérêts selon l'axe « y ». D : « Grille » de sélection des pixels d'intérêts selon l'axe « x ».

2- Immunocytochimie

a. Principe

Cette technique permet de détecter et de visualiser une protéine au niveau cellulaire. Le marquage de la protéine d'intérêt est dit indirect car il nécessite l'utilisation d'anticorps primaires qui vont se lier spécifiquement à la cible, et d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome qui sont dirigés contre les anticorps primaires (Figure MM-20). La préparation est ensuite observée au microscope confocal à fluorescence permettant ainsi une localisation de la protéine marquée.

b. Protocole

Une fois les cardiomyocytes isolés et laissés au repos pendant deux heures dans un incubateur, les cellules sont fixées durant 1h30 avec du paraformaldéhyde (PAF) à 4% à température ambiante. Elles sont ensuite rincées trois fois au PBS (Annexe 3) puis perméabilisées durant 1h30 avec du PBS supplémenté de 0,5% Triton X-100 à température ambiante. Après avoir de nouveau rincé trois fois les myocytes au PBS, les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par une étape de saturation à l'aide de PBS-BSA 4% pendant 40 minutes à température ambiante.

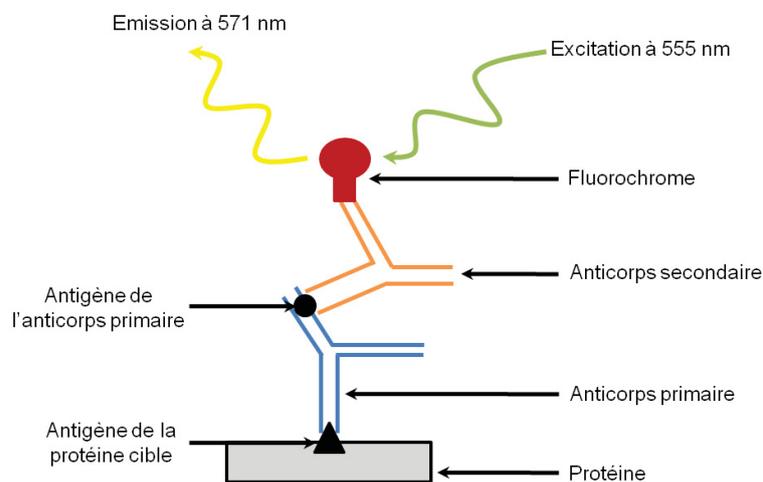


Figure MM-20 : Schéma de l'immunocytochimie indirecte

Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 4% Triton X-100 0,5% toute la nuit à 4°C. Le lendemain, elles sont rincées trois fois au PBS-BSA 4% et incubées à l'obscurité avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-BSA 4% Triton X-100 0,5% et du TOPRO-3 dilué au 1/500^{ème} pour marquer les noyaux durant 2h à

température ambiante. Après avoir été rincées trois fois au PBS-BSA 4%, les cellules sont montées sur des lamelles de verre au Mowiol (Sigma) et séchées 24 heures avant d'être conservées à 4°C.

c. Anticorps utilisés

L'analyse par immunomarquage de la désorganisation membranaire et de la répartition des protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes *mdx* nécessite l'utilisation de plusieurs anticorps :

- L'anticorps monoclonal anti-dystrophine de souris (Novocastra) dilué au 1/20^{ème} pour valider la déficience en dystrophine.
- L'anticorps monoclonal anti- α -actinine de souris (Sigma) pour déterminer une désorganisation locale des protéines contractiles.
- L'anticorps monoclonal anti-récepteur à la dihydropyridine (DHPRs) de souris α_1 (Sigma) dilué au 1/500^{ème} pour vérifier tout d'abord la présence et la localisation dans les tubules-T de ces canaux calciques impliqués dans le couplage excitation-contraction, mais aussi pour corrélérer les résultats de marquage des tubules-T par le di-8-ANEPPS.
- L'anticorps monoclonal anti-récepteur à la ryanodine (RyRs) de souris de type 2 (Ozyme) dilué au 1/50^{ème} pour visualiser la répartition de ces récepteurs canaux impliqués dans le processus de CICR et situés dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS).

L'ensemble de ces anticorps primaires a été détecté par l'anticorps secondaire Fluo 555 de chèvre anti-souris (Molecular probes, Invitrogen) dilué au 1/200^{ème}.

d. Analyse des données

Le marquage des différentes protéines (dystrophine, α -actinine, DHPRs, RyR2s) montre, en microscopie confocale à fluorescence (Olympus), une organisation en réseau. Pour évaluer la régularité de chaque immunomarquage, la méthode d'analyse par transformée de Fourier en deux dimensions est utilisée pour calculer le *power* de chaque marquage par rapport à une grille construite dont la régularité est de 100% (IDL 6.3). Les *powers* obtenus sont fonction de la fréquence spatiale selon l'axe « x » à la fréquence zéro selon l'axe « y ». Enfin, un *power* relatif est calculé en divisant la moyenne des *power* dans les conditions contrôles par la

moyenne des *power mdx*, et ceci pour chaque paramètre (voir Chapitre V, paragraphe 1-c-i du Matériels et Méthodes).

3- Marquage tissulaire

a. Protocole

i. Le cœur de souris

Une fois le cœur prélevé, il est canulé et rétro-perfusé avec une solution de Tyrode (Annexe 1) héparinée à 4°C pour le vider du sang résiduel. Il est ensuite fixé dans un tampon phosphate (Annexe 3) supplémenté de 4% de paraformaldéhyde (PAF) durant 4 heures à température ambiante. Un marquage nécessite la réalisation de coupes de tissus d'une épaisseur de 20 μm . Pour cela, une congélation du muscle cardiaque est effectuée dans de l'isopentane à -80°C. Il est indispensable qu'un protocole de cryoprotection soit appliqué au cœur pour conserver son intégrité tissulaire durant la congélation. Ainsi, après deux rinçages au PBS à 4°C, le cœur est incubé dans une succession de bains de saccharose d'1 heure, d'abord à 5% puis à 10% à température ambiante et enfin dans une solution à 25% toute la nuit à 4°C.

ii. Les muscles squelettiques de la patte de souris

Une fois que la souris a été sacrifiée par dislocation cervicale et nettoyée au savon antibactérien, tous les muscles squelettiques des pattes postérieures sont prélevés et placés dans une solution de PBS (Annexe 3) maintenue à 4°C. Ils sont ensuite fixés dans un tampon phosphate (Annexe 3) supplémenté de 3% de PAF durant 4 heures à température ambiante. Une immunohistochimie nécessite, comme pour le cœur, la réalisation de coupes de tissus d'une épaisseur de 20 μm . Pour cela, une congélation du muscle squelettique est effectuée dans de l'isopentane à -80°C après qu'un protocole de cryoprotection ait été appliqué. Ainsi, après deux rinçages au PBS à 4°C, les muscles sont incubés dans une succession de bains de saccharose d'1 heure, d'abord à 5% puis à 10% à température ambiante et enfin dans une solution à 25% toute la nuit à 4°C.

b. Coupes tissulaires

Pour réaliser des coupes de tissus d'une épaisseur de 20 μm , le cœur et les muscles squelettiques sont tout d'abord plongés dans une solution d'isopentane à -80°C durant 20 secondes pour être congelés. Puis ils sont enduits de tissu Tek pour faciliter la réalisation des

coupes au moyen d'un cryostat (Leica CM 3050). Les tranches de tissus sont alors déposées sur des lames, mises à sécher durant 24 heures à température ambiante et placées à -20°C pour être conservées.

c. Marquage au trichrome de Masson

Le kit de marquage au trichrome de Masson (Sigma) est composé de différents réactifs permettant de visualiser en microscopie à transmission le collagène et les cellules musculaires au niveau tissulaire.

Les coupes de cœur, d'une épaisseur de 20 µm et déposées sur une lame de verre, sont sorties du congélateur et réhydratées avec de l'eau désionisée. Elles sont ensuite incubées 5 minutes dans une solution de biebrich scarlet et d'acide fuchsine pour marquer d'une couleur rosée le tissu musculaire. Après avoir été rincées de nouveau avec de l'eau désionisée, elles sont placées durant 5 minutes dans un bain d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui sont des fixateurs de colorants. Les coupes sont alors disposées 5 minutes dans une solution d'aniline marquant en bleu le collagène, et rincées 2 minutes avec une solution d'acide acétique diluée à 1% puis avec de l'eau désionisée. Enfin elles sont déshydratées avec de l'alcool 70° puis conservées à 4°C.

d. Immunohistochimie des muscles squelettiques

i. Principe

Cette technique est similaire à l'immunocytochimie, excepté que la détection et la visualisation d'une structure sont réalisées au niveau tissulaire. Le marquage est également indirect et il nécessite l'utilisation d'anticorps primaires qui vont se lier spécifiquement à la cible, et d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome qui sont dirigés contre les anticorps primaires (Figure MM-20). La préparation est ensuite observée au microscope à fluorescence permettant ainsi une localisation de l'élément marqué.

ii. Protocole

Le marquage est réalisé sur les coupes tissulaires obtenues par le cryostat. Elles sont tout d'abord réhydratées dans du PBS 1X, pendant dix minutes à 4°C puis saturées dans du PBS-BSA 1%, pendant 20 minutes à température ambiante. Pour comprendre la répartition cytoplasmique des noyaux provenant de fibres musculaires squelettiques contrôles et *mdx*, les coupes de tissus ont été incubées durant 2 heures à l'obscurité avec du TOPRO-3 dilué au

1/1000^{ème} dans du PBS-BSA 4% Triton X-100 0,5% à température ambiante et en chambre humide. Puis, elles sont montées sur des lamelles de verre au Mowiol et mises à sécher 24 heures avant d'être conservées à 4°C ou d'être visualisées à une longueur d'onde de 655 nm.

VI- Méthodes statistiques

Comme les données obtenues proviennent de deux populations (contrôles et *mdx*) indépendantes et non appariées, l'outil mathématique choisi pour déterminer la significativité statistique des différences entre nos échantillons a été le test de Student (*t* test). L'égalité des variances entre les deux échantillons, évaluée par le test de Fisher-Snedecor (F-test), est la condition indispensable pour appliquer ce *t* test. Lorsque cette exigence n'est pas remplie, un test de Mann-Whitney a été appliqué.

Les résultats sont présentés selon leur moyenne \pm SEM. ns : non significatif :

■ * $P \leq 0,05$ et $> 0,01$

■ ** : $P \leq 0,01$ et $> 0,001$

■ *** : $P \leq 0,001$

Tous les tests statistiques sont effectués par le logiciel Prism 5.01 (GraphPad Software).

Résultats

Résultats

I-Avant-propos

La partie « Résultats » de ce manuscrit expose les données expérimentales obtenues pendant le travail de thèse. Des résultats préliminaires, qui n'ont pas été soumis pour publication, sont tout d'abord décrits car ils ont été obtenus lors du développement de la technique de microscopie de conductance ionique à balayage (SICM) au cours de la première année de doctorat. Puis, les résultats concernant la dystrophie musculaire de Duchenne sont présentés au travers d'un article scientifique, rédigé en anglais et présenté sous la forme où il a été soumis pour publication dans le journal *Cardiovascular Research* (1^{er} auteur). Cette partie « Résultats » s'organise donc en deux sections.

La première section décrit un ensemble de résultats préliminaires obtenus par SICM. Cette partie révèle des organisations surfaciques variées, montrant les possibilités d'application de cette technique à de nombreux types cellulaires, ainsi que les perspectives de recherche qui peuvent y être associées.

La deuxième section présente les résultats soumis à publication. Elle expose les altérations des systèmes membranaires, surfaciques et tubulaires, dans les cardiomyocytes ventriculaires provenant de souris *mdx* âgées de 10 à 12 mois (modèle d'étude de la dystrophie musculaire de Duchenne). Puis elle présente les conséquences fonctionnelles de ces perturbations au niveau de l'activité cellulaire des myocytes d'abord au repos, puis lors de stimulations mettant en jeu le couplage excitation-contraction (CEC). Enfin, la localisation et la distribution des différents acteurs du CEC sont présentées et analysées pour corrélérer les anomalies structurales et fonctionnelles observées dans les cardiomyocytes *mdx*.

Ce travail présente donc un double aspect : un aspect technique par la mise en place du SICM dans notre équipe de Physiologie et Pharmacologie des Canaux Ioniques. Effectivement, cette étape indispensable a nécessité la réalisation d'un stage d'un mois au sein du laboratoire londonien « *National Heart and Lung Institute* » sous la direction des Drs Julia Gorelik et Yuri Korchev ainsi que de leurs équipes respectives. Ce travail est aussi une

étude physiologique sur les structures membranaires et leurs fonctions dans les cardiomyocytes ventriculaires sains et *mdx*.

II- Résultats préliminaires :

Topographies membranaires de différents types cellulaires obtenues par microscopie de conductance ionique à balayage (SICM)

1- Contexte de l'étude

Dans le cadre de la mise au point à Poitiers de la microscopie de conductance ionique à balayage (SICM), plusieurs types cellulaires ont été topographiés. Les cardiomyocytes ont fait l'objet des premières expériences car la cardiomyopathie dilatée (CMD) associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est encore peu étudiée, mais aussi car la surface membranaire de ces myocytes a déjà été bien établie en conditions physiologiques et pathologiques lors d'une insuffisance cardiaque (Gorelik et al., 2006). Ainsi, il semblait donc plus aisé de retrouver les mêmes caractéristiques morphologiques sur nos cellules contrôles (C57BL/10 ou BL10) avec notre équipement (Figure R-1). Les cardiomyocytes ventriculaires de nos souris contrôles et les myocytes de rat étudiés par Gorelik et collègues (2006) présentent les mêmes particularités membranaires. Les sarcolemmes sont organisés en crêtes et en sillons (*z-grooves*) avec une régularité de 2 μm qui correspond à la taille des sarcomères intracellulaires (Figure R-1). Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de microscopie électronique à balayage de ces cellules (Figures R-1C et F). Malgré les artefacts dus au protocole de fixation chimique des échantillons, la membrane plasmique des cardiomyocytes ventriculaires provenant de souris BL10 âgées de 10 à 12 mois présente les mêmes spécificités architecturales en « *z-grooves* » que celles montrées en SICM.

Ainsi, nous avons voulu savoir si d'autres types cellulaires présentent ou non les mêmes caractéristiques surfaciques que les cardiomyocytes. Dans un même temps nous avons pu améliorer nos connaissances et notre maîtrise de la technique de microscopie de conductance ionique à balayage.

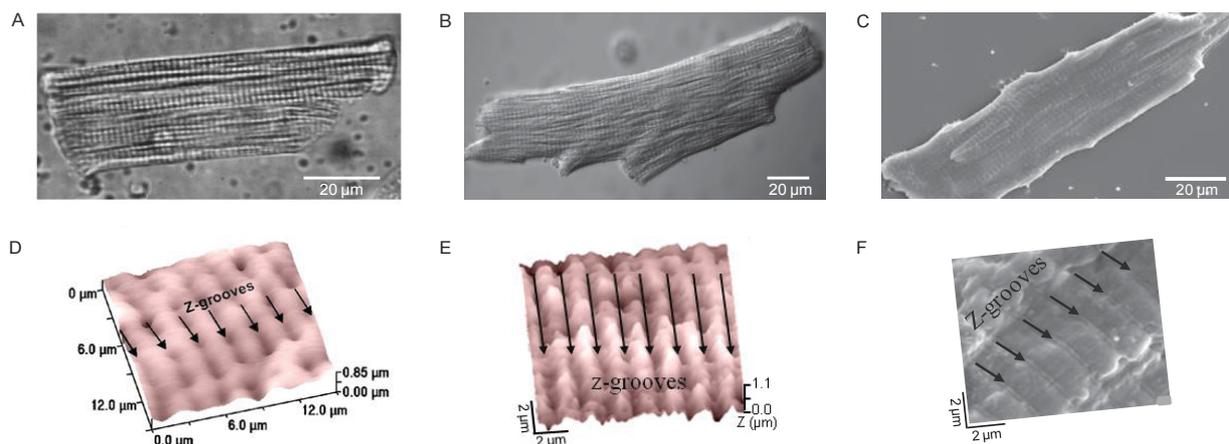


Figure R-1. Exemples de topographies membranaires, de cardiomyocytes ventriculaires, obtenues en microscopie. A et B : Images de cardiomyocytes ventriculaires, de rat (A, Gorelik et al., 2006), et de souris BL10 (B et C, réalisées au laboratoire) obtenues en microscopie optique (A et B) et en microscopie électronique à balayage (C). D et E : Topographies membranaires obtenues en microscopie de conductance ionique à balayage pour les myocytes de rat (D, Gorelik et al., 2006), et de souris (E, réalisée au laboratoire). F : Grossissement $\times 10000$ de la surface d'un cardiomyocyte ventriculaire de souris BL10. Pour les deux types cellulaires, l'organisation membranaire est similaire, en crêtes et en sillons (z-grooves, flèches noires).

2- Topographies membranaires de plusieurs types cellulaires

a. Les cellules

La dystrophie musculaire de Duchenne a été caractérisée en 1861 par Duchenne de Boulogne qui découvrit, en 1868, que ce trouble était lié aux muscles. Comme cela a été décrit précédemment dans « *l'Etat de l'art* », c'est une myopathie se traduisant par une dégénérescence progressive des muscles. Les principaux dérèglements physiologiques, nécroses des fibres musculaires et perturbations de l'homéostasie calcique, ont fait l'objet de nombreuses études au sein même de notre laboratoire (Vandebrouck et al., 2006 ; Vandebrouck et al., 2007 ; Balghi et al., 2006a et 2006b ; Mondin et al., 2009). Ces travaux ont été menés sur différents types cellulaires musculaires tels que les fibres musculaires squelettiques issues de dissociations, soient de muscles de la patte, soient du FDB (*Flexor Digitorum Brevis*), provenant de souris contrôles et *mdx*. Néanmoins, en raison des difficultés à obtenir des cellules musculaires, différents types de lignées cellulaires ont été développés au laboratoire à partir de la lignée Sol8 issue du muscle soléaire de souris. La lignée SolC1 a été obtenue à partir de la lignée Sol8 après plusieurs étapes de clonage et n'exprime pas la dystrophine. Elle a ensuite été transfectée par un vecteur rétroviral contenant le gène de la

mini-dystrophine. Ainsi, les clones obtenus exprimant la mini-dystrophine ont été nommés SolD (Marchand et al., 2004). La mini-dystrophine est une protéine de 229 kDa, codée par le gène DYS (de la dystrophine) mais celui-ci présente une délétion de 46% et ne possède plus qu'une taille de 6,3 kb. Cependant, ce trouble génétique n'affecte que le domaine central de la protéine et permet donc à cette mini-dystrophine d'être correctement localisée sous la membrane et de remplir ses fonctions en se liant à l'actine et au complexe DGC.

b. Résultats

Disposant de fibres musculaires squelettiques isolées des muscles de la patte et du FDB de souris C57BL/10, ainsi que des myoblastes SolC1, nous avons réalisé des topographies membranaires de ces types cellulaires musculaires pour déterminer s'ils présentaient ou non la même organisation membranaire que les cardiomyocytes ventriculaires contrôles (Figure R-2).

La figure R-2A représente une image de la topographie membranaire (10 μm par 10 μm) d'une fibre musculaire squelettique isolée des muscles de la patte d'une souris contrôle âgée de 4 semaines. Tout comme les cardiomyocytes ventriculaires C57BL/10, cette cellule possède une membrane dont l'organisation est orchestrée par une succession de crêtes et de sillons (*z-grooves*, traits pointillés noirs) d'un intervalle de 2 μm . A l'inverse, la topographie membranaire (15 μm par 15 μm) d'une fibre isolée du muscle FDB, montrée par la figure R-2B, ne révèle aucun agencement particulier du sarcolemme. Effectivement la membrane plasmique semble plate.

Les figures R-2C et 2D présentent les images obtenues lors d'un balayage effectué sur un myoblaste SolC1 d'abord isolé (2C), puis en division (2D). La résolution d'acquisition était plus faible pour la figure 2C, le temps d'enregistrement fut seulement d'une heure et montre une cellule qui semble isolée. Cependant, en augmentant les résolutions spatiales et temporelles, d'une à dix heures d'acquisition, le myoblaste SolC1 se révèle être en réalité en division (Figure R-2D). De plus, la surface ne présente pas de striation mais ce sont des cellules musculaires immatures qui n'ont pas encore la capacité de se contracter.

Enfin, un dernier type cellulaire nous a semblé intéressant à tester en microscopie de conductance ionique à balayage : les fibroblastes. Effectivement, ils représentent à eux seuls 70% des cellules cardiaques, et ils jouent un rôle clef dans la régulation du fonctionnement du cœur normal et au cours du remodelage cardiaque observé lors des pathologies du cœur

(Baudino et al., 2006). Celui, topographié dans les figures R-2E et 2F, est un myofibroblaste humain que les Drs Najete Benamer et Jean-François Faivre nous ont procuré. On peut observer que ce type cellulaire est très étalé, tant en longueur car deux balayages de 40 μm par 40 μm n'ont pas suffi à topographier la cellule entièrement, mais aussi en largeur par ses prolongements membranaires, comme nous le montre la flèche blanche sur l'image R-2F. Cette cellule ne présente pas non plus de striation au niveau du sarcolemme. Cela est peut-être à mettre en relation avec le fait qu'elle ne possède pas de propriétés contractiles.

3- Conclusion

Tout comme les cardiomyocytes ventriculaires, les fibres musculaires squelettiques issues des muscles des pattes de souris présentent une organisation de leur membrane plasmique en crêtes et en sillons. On pourrait supposer alors que toutes les cellules musculaires striées possèdent cet agencement de leur sarcolemme. Néanmoins, la topographie membranaire des fibres musculaires isolées du FDB est plate. Les myoblastes et les myofibroblastes ne présentent pas non plus de striation de leur membrane plasmique. Mais comparativement aux fibres du FDB, ces résultats sont moins surprenants. Effectivement, les myoblastes sont des cellules immatures n'ayant pas de propriétés contractiles tout comme les myofibroblastes qui sont des cellules à activité essentiellement sécrétoire.

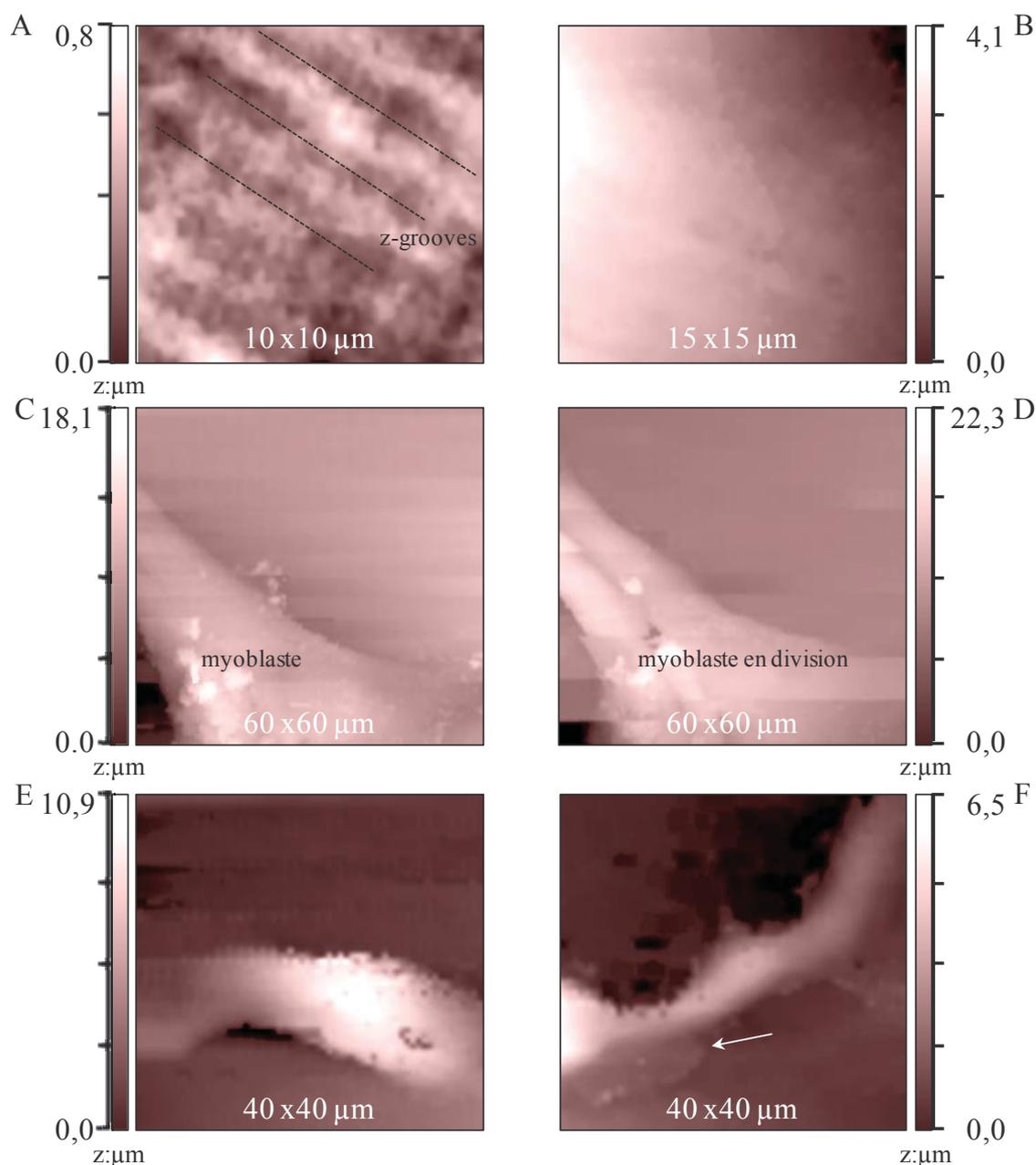


Figure R-2. Exemples de topographies membranaires obtenues en microscopie de conductance ionique à balayage (SICM) à partir de différents types cellulaires. A : Image de 10 μm par 10 μm de la surface d'une fibre musculaire squelettique, organisée en crêtes et en sillons (z-grooves, traits pointillés noirs), provenant des muscles de la patte d'une souris contrôle (C57BL/10) âgée de 4 semaines. B : Topographie membranaire plane d'une fibre musculaire squelettique isolée du FDB d'une souris contrôle âgée de 16 mois. C et D : Images d'un myoblaste SolC1 d'abord isolé (C), puis en division (D). E et F : Images d'un même myofibroblaste humain, la flèche blanche désignant un prolongement membranaire.

III-Article : Ultrastructural and functional alterations of EC coupling elements from membrane surface to depth in mdx cardiomyocytes.

1- Contexte de l'étude

Cette étude permet de dresser un profil des altérations cellulaires de la cardiomyopathie dilatée associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Ces dommages structuraux et fonctionnels sont présents dans les cardiomyocytes ventriculaires C57BL/10 *mdx*, déficients en dystrophine, qui proviennent de souris âgées de 10 à 12 mois. Les myocytes cardiaques des souris C57BL/10, exprimant la dystrophine native, ont été utilisés comme référence. Les cellules *mdx* montrent une modification locale de leur topographie membranaire, ainsi qu'une réduction de leur réseau tubulaire associée à cette perturbation. De plus, leur homéostasie calcique est perturbée au repos et durant le couplage excitation contraction. Enfin, il a été montré que l'organisation en réseau, de différentes protéines membranaires et cytoplasmiques, est localement altérée.

Les principaux résultats sont résumés comme suit :

2- Altération des systèmes membranaires

La microscopie de conductance ionique à balayage (SICM) montre que le sarcolemme des cardiomyocytes *mdx* est localement modifié. Comparativement aux cellules contrôles, leur membrane plasmique présente une perturbation dans leur organisation en crêtes et en sillons. Effectivement, les profils topographiques révèlent une perte locale de certains de ces sillons, quantifiée par le *Z-groove ratio*, associée à une disparition d'entrées de tubules-T. D'autres altérations membranaires ont été observées et furent appelées « *potholes* » (« nids de poules » en français), puisque ces structures apparaissent comme des dépressions sans forme bien identifiable sur la surface de la cellule. Elles n'ont pas été étudiées plus avant durant les travaux de thèse, mais ont été majoritairement retrouvées dans les cardiomyocytes *mdx*, confirmant une déstabilisation de l'intégrité membranaire lors de l'absence de dystrophine sous le sarcolemme.

Le réseau tubulaire des cardiomyocytes *mdx* est également touché. Une analyse en deux dimensions, par transformée de Fourier du marquage au di-8-ANEPPS, a démontré une altération de la régularité du réseau de tubules-T. De plus, une quantification des deux composantes, transversale et longitudinale, de ces tubules-T a montré une diminution de ces éléments. Or, il est connu que les tubules-T sont indispensables à la propagation du PA vers l'intérieur de la cellule pour permettre l'entrée de calcium dans le cytoplasme par les DHPRs afin d'initier la contraction. On pourrait donc s'attendre à des perturbations de l'homéostasie calcique.

3- Perturbation de l'homéostasie calcique

Au repos, les cardiomyocytes *mdx* présentent des libérations spontanées et localisées de calcium qui ont une occurrence doublée et une durée réduite, comparativement aux activités calciques observées dans les cellules contrôles.

Lors de stimulations localisées par une solution dépolarisante de Tyrode à 100 mM de KCl au moyen d'une pression de 100 kPa appliquée au travers de la pipette de SICM, les cardiomyocytes *mdx* présentent des réponses calciques différentes à celles enregistrées pour les cellules contrôles. Leur amplitude n'est pas modifiée mais leurs paramètres cinétiques révèlent des signaux plus lents et plus durables dans le temps.

4- Organisation des réseaux protéiques intracellulaires

La dystrophine est une protéine dont le marquage immunologique montre une localisation à la membrane plasmique pour les cellules musculaires. Dans les cardiomyocytes, elle est également localisée le long des tubules-T et forme un réseau strié et régulier. Dans les cellules *mdx*, ce marquage est inexistant validant ainsi notre modèle d'étude. Les immunomarquages des DHPRs et de l' α -actinine présentent des réseaux intracellulaires, striés et réguliers pour les cellules contrôles. A l'inverse, ces réseaux semblent perturbés dans les cardiomyocytes *mdx*. Toutefois, les marquages pour les récepteurs à la ryanodine paraissent inchangés entre les deux modèles. Pour évaluer la régularité de ces réseaux protéiques, mais aussi membranaires, une analyse en deux dimensions par transformée de Fourier a été réalisée sur l'ensemble des images obtenues pour chaque paramètre. Puis, des données relatives ont été obtenues pour caractériser la désorganisation des myocytes *mdx* par rapport aux cellules BL10. Les surfaces membranaires, les réseaux tubulaires, l' α -actinine, et

les DHPRs des cellules malades sont bien moins organisés, alors que, les RYR2s sont plus réguliers.

5- Conclusions

Grâce à l'utilisation de plusieurs techniques, le SICM et le marquage au di-8-ANEPPS, une modification de l'architecture membranaire a pu être clairement établie dans les cardiomyocytes ventriculaires des cellules déficientes en dystrophine. Ces éléments sont pourtant indispensables pour le phénomène d'excitation-contraction. Par l'association du SICM avec la microscopie confocale, les variations de calcium ont pu être enregistrées par une stimulation localisée avec une solution dépolarisante. Les réponses Ca^{2+} *mdx* se révèlent plus lentes et plus durables. Ainsi, ces résultats suggèrent que la diminution de tubules-T pourrait entraîner un retard dans le phénomène de CICR. Les récepteurs à la ryanodine de type 2 seraient, par la modification de leur distance aux DHPRs, à l'origine de cette altération de l'homéostasie calcique. On peut parler de RYRs « orphelins ». Effectivement, l'activité calcique au repos des myocytes est modifiée. Les *sparks* (libérations spontanées et localisées de calcium par les RYR2s) ont une fréquence doublée et une durée diminuée. De plus, les immunomarquages de ces récepteurs, ainsi que les données bibliographiques, semblent indiquer que la quantité protéique est identique (bien que cela reste controversé), renforçant ainsi la probabilité d'une régulation différente des RYR2s qui seraient plus sensibles au Ca^{2+} et qui pourraient libérer plus d'ions calciques au repos (« leaky »).

Au vue de ces résultats, la dystrophine semble jouer un rôle structural bien plus étendu que ce qui était admis jusqu'à maintenant. Effectivement, nous suggérons que la dystrophine puisse avoir un rôle de tuteur dans l'architecture des tubules-T pour, par exemple, maintenir la distance nécessaire de 12 nm entre les DHPRs et les RYR2s afin d'assurer un CICR efficace. Ainsi, son impact architectural aurait un lien important avec la régulation calcique dans les cellules cardiaques.

6- Reproduction du manuscrit

**Ultrastructural and functional alterations of EC
coupling elements from membrane surface to depth in
mdx cardiomyocytes.**

Short Title: **Alterations of EC coupling elements in *mdx* cardiomyocytes**

Charlotte Lorin, Mélanie Gueffier, Patrick Bois, Jean-François Faivre, Christian Cognard,
Stéphane Sebille.

*Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, UMR CNRS/Université de Poitiers
n°6187, Pôle Biologie Santé Bât B36, BP 633, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers,
France*

**Corresponding author: Stéphane Sebille, UMR CNRS/Université de Poitiers n°6187,
Pôle Biologie Santé, BP 633, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France, Phone : 33
549 453 767, Fax : 33 549 454 014, E-mail : stephane.sebille@univ-poitiers.fr**

Abstract

Rationale: A dilated cardiomyopathy (DCM) is associated with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). The loss of dystrophin leads to membrane instability and calcium dysregulation in skeletal muscle but effects of such a loss are not elucidated in cardiomyocytes level.

Objective: We sought to examine whether membrane and T-Tubule (TT) damages occur in ventricular myocytes from *mdx* mouse model of DMD and if so, how they impact the function of single excitation-contraction (EC) coupling elements.

Methods and Results: Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) was used to characterize the integrity loss of living *mdx* cardiomyocytes surface. 2D Fourier transform analysis of labelled internal networks (TT, alpha-actinin, DHPRs, RyR2s) was performed to evaluate internal damages. During calcium measurements, "smart microperfusions" of depolarizing solutions were applied through SICM nanopipette, stimulating single TT elements. These approaches revealed structural membrane surface (39% decreases for Z-groove ratio) and TT disorganization (21% decrease for TT ratio) in *mdx* as compared to control. These disruptions were associated with functional alterations (sixfold increase of calcium signal duration and twofold increase of sparks frequency).

Conclusions: In DCM associated with DMD, myocytes display evident membrane damages at the surface level but also in the cell depth with a disruption of TT network as observed in other cases of heart Failure (HF). These ultrastructural changes are associated with changes in the function of some EC coupling elements. Thus, these profound disruptions may play a role in calcium dysregulation through EC coupling elements perturbation and suggest a TT stabilizing role for dystrophin.

Keywords: Dilated cardiomyopathy, Duchenne muscular dystrophy, cardiomyocytes, Scanning Ion Conductance Microscopy, Excitation-contraction coupling

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD), the most common X-linked degenerative pathology, affects one in 3,500 male births. The origin of the disease is a lack of the protein dystrophin initially found under the sarcolemma of skeletal muscle cells (1). Later, dystrophin was also found expressed in smooth and cardiac muscles, providing mechanical linkage between extracellular matrix and cytoskeleton *via* dystrophin-glycoprotein complex (DGC) (2). 90% of DMD patients, in the second decade of life, present a dilated cardiomyopathy (DCM), characterized by progressive decline in cardiac contractility, ventricular dilation, and cardiac arrhythmias (3). Heart damages are the second cause of fatalities in DMD.

Internal scaffolding proteins, including DGC, are thought to participate to the protection of membranes from tearing. In the case of cardiac cells with continuous activity, it should protect cell surface from mechanical stress. In dystrophin deficiency, it has been assumed that frequency of membrane microdisruptions, due to stretches, is increased because of less structural protection from cytoskeleton (4). Like in skeletal muscle tissue, dystrophin deficiency has been linked in the heart to defective intracellular Ca^{2+} handling, leading eventually to myocyte contractile dysfunction (5). Nevertheless, it remains unclear whether calcium dysregulation in dystrophic hearts is the result of wounded membranes or/and a dysregulation of calcium transporters.

Integrity of cardiomyocytes surface has been already investigated with Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM), an innovative multimodal technique (6,7) that allows to record structural and functional parameters in intact living cells (8). Surface topography of the cardiomyocytes reveals a precise organization in grooves and domed crests between the grooves. Spacing between Z-grooves was found approximately to be 2 μm , corresponding to the predicted sarcomere length for ventricular myocytes (9). SICM was used to produce a detailed surface topography of normal and failing cardiomyocytes (10) and was proved to be a powerful tool for revealing the loss of surface integrity in pathological conditions.

In cardiomyocytes, arrangement of Ca^{2+} -handling proteins is crucial for excitation-contraction (EC) coupling. Membrane depolarization activates dihydropyridine receptors (DHPRs), mainly in transverse tubules (TT) elements. The opening of these L-type Ca^{2+} channels produces significant calcium influx in the cytoplasm. This elevation of Ca^{2+}

concentration induces release of calcium from internal stores of sarcoplasmic reticulum (SR) (11) *via* ryanodine receptors type 2 (RyR2s). A close spatial relationship between DHPRs and RyR2s, with a distance of few nanometers, has been demonstrated essential to the efficiency of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) (12).

In DMD, recent studies reveal perturbations of excitation-contraction coupling mechanisms in cardiac cells. Indeed, a "leaky" activity of RyR2s was identified and supposed to be due to S-nitrosylation, up-regulation of inducible nitric oxide synthase and enhanced protein kinase A phosphorylation (13,14). In addition, depletion of a RyR2 stabilizing protein, calstabin2, amplifies the process of leakiness (13). All these RyR2s-related biochemical modifications may contribute to uncontrolled release from the SR, triggering cardiac arrhythmias in DCM. Nevertheless, it is unknown how dystrophin absence could induce the resulting spatial re-arrangement of RyR2s surroundings.

Here we describe, with the use of innovative imaging and analysis techniques, membrane structural damages and disorganisations, from the surface to the depth of *mdx* cardiomyocytes. Experiments have been performed with the SICM to characterize the loss of integrity of cardiac cell surface in dystrophin deficiency. SICM exploration was followed by analysis of TT system staining by fluorescent di-8-ANEPPS, to evaluate disruption of this internal network. Taken together, these data provide a precise inventory of structural membrane damages of dystrophin-deficient cardiac cells. Furthermore, with the control of the SICM nanopipette, we were able to apply "smart microperfusion" of depolarizing solutions, stimulating single T-Tubule elements. This original way to induce EC coupling led us to demonstrate a very different behaviour of excitation-evoked calcium release in dystrophin deficient cardiomyocytes. Such observations of functional alterations of CICR, combined with the 2D Fourier transform analysis of internal structures and proteins networks suggested local reorganizations of EC coupling proteins in DCM, similar to damages observed in other heart failure cases. Taken together these data are suggesting that dystrophin is involved not only in maintaining the membrane integrity at the surface but also in preserving T-Tubules arrangement, as a "stake" in the depth of cardiomyocytes.

Methods

Detailed description of techniques is available in the *Online Supplements (OS) Methods*.

Enzymatic Cell Dissociation. The investigation conforms to the Guide for the *Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Animal handling and experiments protocol were granted by the local ethics board. Adult cardiac myocytes were isolated from (10 to 12 months) male C57 BL10 Scsn mice (WT). The heart was cannulated via the aorta, and mounted on a Langendorff perfusion apparatus. The heart was perfused with the enzyme solution plus 620 U/mL collagenase type 2 (Worthington, Lakewood, NJ), 0.104 U/mL protease XIV (Sigma). The left ventricle was gently triturated using Pasteur pipettes. Cells were resuspended and plated in plating media to allow attachment (*see OS Methods*).

Histology. 20 μm histological sections from hearts were examined on an Olympus MVX10 microscope after staining with Masson's trichrome (Sigma).

Scanning Ion Conductance Microscopy. SICM is a scanning probe microscopy technique in which the ion current flowing into a nanopipette is used to control the vertical (z axis) position of the pipette tip relative to the cell surface (15). Modulated ion current is fed to a DSP card, which generated a signal for the feedback loop to keep constant the separation between the sample and the nanopipette. To scan sample, nanopipette probe was driven in the x- and y-directions by the piezo stage mounted on 25-mm translation stage DC motors. Information on the lateral and vertical positions was recorded and used to generate a three-dimensional (3D) topographic image (ScanIC Image software, Ionscope). In this study the newly developed hopping probe ion conductance microscopy was used (6) (*see OS Methods*).

Z-groove Ratio Analysis. Z-groove ratio was calculated as described previously (9) (*see OS Methods*).

T-Tubule Labelling. To label T-Tubules, ventricular myocytes were incubated with 10 μM di-8-ANEPPS (Invitrogen) (10,16) and confocal images were acquired using an Olympus

confocal system (confocal FV1000 station) (9). Fluorophore was excited with 488 nm line of an argon laser.

Power spectra were computed as previously described (6). Briefly, the power spectrum of each image was computed as the magnitude of the 2D spatial Fourier transform by using the IDL 6.3 (ITTVIS France, Paris) programming language. The amplitude of the power/frequency peak is taken as an index of regular distribution of the T-Tubule network, as previously described (11) (*see OS Methods*).

Localized Microperfusion. After SICM scanning, pressure was applied through the nanopipette containing 100 mM KCL solution. This system was combined with Bio-Rad MRC 1024 confocal microscope that allows to record calcium measurements (17) (*see OS Methods*).

Immunostaining. Cells were incubated overnight at 4°C in a wet chamber with anti-dystrophin (Novacastra; 1:20), anti-DHPR (Sigma; 1:500), anti- α -actinin (Sigma; 1:500) or anti-RyR (Thermo scientific; 1:50). Cells were then incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 555-conjugated chicken anti-mouse IgG; 1:200). Immunolabelled samples were examined and confocal images were acquired using an Olympus confocal system (confocal FV-1000 station). Fluorophores were excited with the 543 nm line of the HeNe laser (for TRITC). Regularity of immunostainings distribution has been evaluated with a 2D spatial Fourier transform. Data are presented in relative power ratios: mean of peaks from *mdx* divided by mean of peaks from WT (*see OS Methods*).

Results

Membrane Topography. Ventricular myocytes from *mdx* and wild type (WT) mouse hearts were compared. Experiments were performed with hearts from 10-12 month-old mice where DCM is fully developed in *mdx* (Figure 1B) with a high degree of fibrosis as compared to WT (Figure 1A). Figure 1C and D displays examples of myocytes obtained after dissociation using a Langendorff perfusion system. Sarcomere length was calculated using 2D Fourier transform (see below) in both WT and *mdx* cardiomyocytes in our experimental conditions. The closed values obtained for WT ($2.04 \pm 0.05 \mu\text{m}$) and *mdx* ($2.06 \pm 0.06 \mu\text{m}$) showed that cardiomyocytes were not contracted after dissociation, giving an indication for a good viability for most of cells. In comparison with WT cells (Figure 2A), SICM images show a disruption of Z-groove structured as well as a different surface organization in *mdx* (Figure 2B). In control (WT), SICM scans displayed through the almost whole scanning area the characteristic scalloped shape of a cardiomyocyte surface with local and regular anchorage between membrane and intracellular cytoskeleton (8) as evidenced by line profiles (Figure 2C a, b, c). By contrast, *mdx* profiles show local disturbances with potential losses of some T-Tubule (TT) openings (Figure 2D e and f). Loss of regular Z-groove structures, length and depth, was investigated by calculating the Z-groove ratio parameter, as previously described (9), showing (Figure 2E) a lower value in *mdx* (0.46 ± 0.04 ; $n=38$ cells) as compared to WT (0.76 ± 0.05 ; $n=19$ cells) ($P < 0.05$). To go further on the evaluation of changes in topography, we measured, on every scanned area, the proportion of surfaces with grooved and flat (ungrooved) shapes (Figure 2F). Grooved surface percentage was found decreased in *mdx* ($52\% \pm 5\%$; $n=19$) as compared to WT ($78\% \pm 4\%$; $n=37$) ($P < 0.05$). Flat surface (examples of large flat areas are shown in Online Figure 2A and B) percentage was found increased in *mdx* ($36\% \pm 5\%$; $n=37$) as compared to WT ($15\% \pm 4\%$; $n=19$) ($P < 0.05$). Highly localized depressions were also observed and termed "potholes". We counted them and quantified percentage of the area of potholes in *mdx* and WT (Online Figure 2). 18 potholes (area: $1.15\% \pm 0.26\%$, $n=37$ cells) were found in *mdx* and only one in WT (area: $0.07\% \pm 0.07\%$; $n=19$ cells) ($P < 0.01$). Taken together these results brought out a different membrane organization in *mdx* cardiomyocytes.

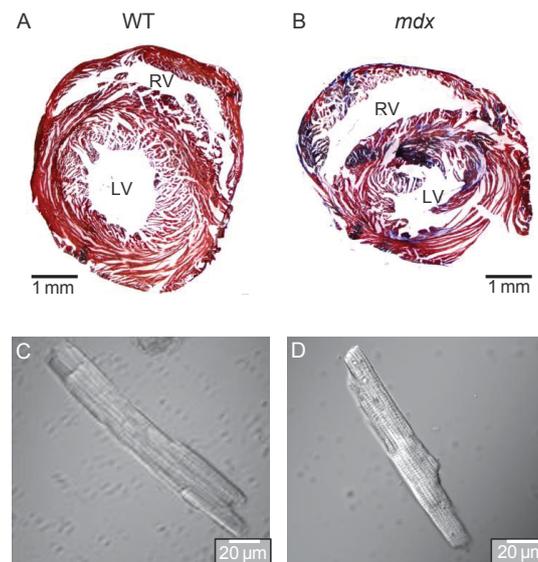


Figure 1. The *mdx* mice dilated cardiomyopathy associated with Duchenne muscular dystrophy model. Midventricular 20 μm sections from wild type (WT) mouse heart (A) and *mdx* mouse heart (B) after staining with Masson's trichrome (RV : Right Ventricle, LV : Left Ventricle). Masson's trichrome staining revealed fibrosis in *mdx* mice (blue) (B) but much less in WT heart (A). Bright field optical images of adult (10-12 month-old) mice WT (C) and *mdx* (D) ventricular cardiomyocytes.

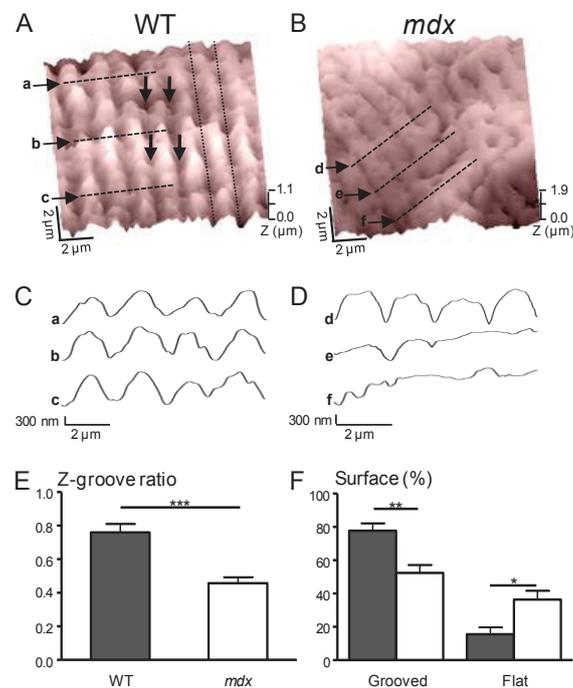


Figure 2. Surface imaging by SICM of ventricular cardiomyocytes isolated from WT and *mdx* mouse hearts. 15 x 15 μm surface images from WT (A) and *mdx* (B) cardiomyocytes. The vertical black dotted lines show Z-grooves and the black vertical arrows indicate the

location of putative TT openings (A). The black broken lines (A and B) show the location where the Z (altitude) profiles were computed from WT (represented in C: a, b, c) and *mdx* (represented in D: d, e, f) mouse cardiomyocytes. (E) Z-groove ratio in WT (n=19) and *mdx* (n=37) ventricular cardiomyocytes. (F) Ratio of the membrane surface with grooves, flat areas, in WT (solid bars, n=19) and *mdx* (open bars, n=37) cardiomyocytes. ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$ vs. wild type (WT).

TT System Network Disruptions. Surface observations suggest a loss of TT openings in *mdx* cardiomyocytes surface membranes and a potential TT network alteration. This network is a system composed of many transverse elements (TEs) and a few longitudinal elements (LEs) that form a grid allowing the rapid propagation of excitation impulse throughout myocytes (18). Disruption of TT system has already been demonstrated in several models of failing hearts (19,20). Furthermore, remodelling mechanisms were sometimes found with decreased TEs and increased LEs (18). Here TT network structure was investigated using confocal microscopy in *mdx* and WT living myocytes stained with the membrane fluorescent dye di-8-ANEPPS (Figure 3A and B). Examples of close-up views and diagram panels showed a regular grid of TT network in WT (Figure 3C and E) and some disrupted areas in the network in *mdx* cells (Figure 3D and F, red arrows). Large-scale analysis of di-8-ANEPPS images was performed to quantify differences between WT and *mdx*. First, 2D Fourier transform analysis of di-8-ANEPPS images revealed a lower regularity (measured as the peak value from power spectra, *see Methods*) of transversal network in *mdx* as compared to WT (18% reduction) (Figure 3G). Second, TT ratio was quantified as previously described (9) and was found equal to $24.6\% \pm 0.8\%$ ($n=67$) in WT and $19.5\% \pm 0.7\%$ ($n=74$) in *mdx* (Figure 3H) ($P < 0.01$). A quantitative computation of the TEs and LEs densities exhibited a decrease of the two types of network (Figure 3I and J) in *mdx*.

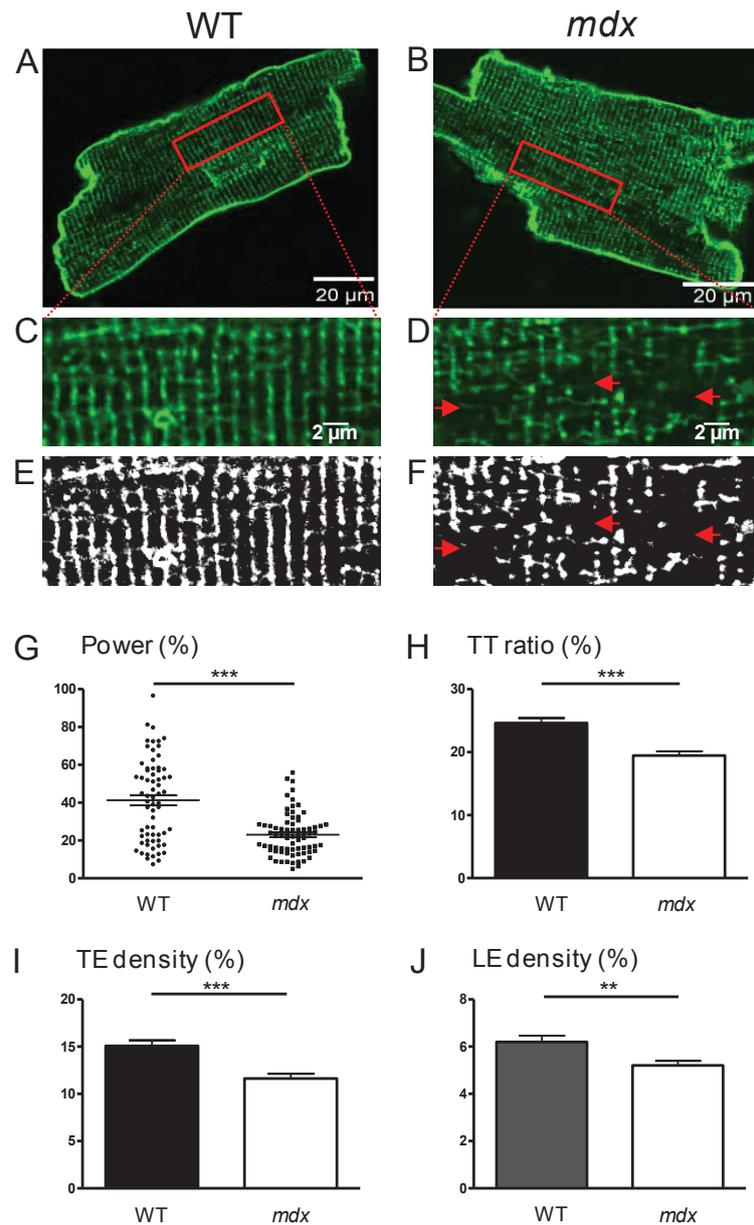


Figure 3. T-Tubules arrangements in WT and *mdx* cardiomyocytes. Confocal images obtained after staining with di-8-ANEPPS in WT (A) and *mdx* (B) cardiomyocytes. (C) and (D) Zoomed-in view (x 3.25) of crops from A and B respectively. Binary images of the selected areas indicate that the TT of *mdx* cells are significantly disrupted in some locations (red arrows in F) as compared to WT (E). (G) Power computed using 2D Fourier transform analysis (see Methods) in WT and *mdx* cardiomyocytes. Data are presented in percentage related to power calculated on a very regular staining grid. (H) TT ratio in WT and *mdx* ventricular myocytes (see Methods). Densities of transversal (TEs: I) and longitudinal elements (LEs: J) in WT and *mdx* myocytes. ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$ vs. WT, $n=67$ WT cells and $n=74$ *mdx* cells.

Local Ca²⁺ Stimulations. TT network is crucial for the propagation of excitation toward deeper regions (diades/triades) of plasma membrane to activate DHPs and to trigger CICR process. We investigated whether local excitation-calcium release coupling may be affected by the TT disruption in combining SICM measurements with local micro-perfusions. Local applications of high potassium Tyrode solution were performed onto the cell surface by a ~30 M Ω pipette under SICM control conditions and pressure of ~100 kPa. Areas of micro-perfusion were selected taking into account the relief of the surface obtained with SICM images (Figure 4A). This system was also combined with a confocal microscope that allows to record dynamic calcium measurements (by means of Fluo-4 probe) in a region of interest under the scanned membrane. Under these conditions, stimulations induced either no changes in intracellular calcium (Figure 4B a and d) or calcium transient of various intensities (Figure 4B b and c). Pressure application resulted in the delivery of ~4.4 pL/s of the high potassium Tyrode solution onto the cell surface. As previously described (17) perfusion from such a pipette is thought to be limited to a surface corresponding to the external diameter of the pipette tip (Online Figure 1). Local application of high potassium was thus estimated to ensure stimulation of a small (~ 0.25 μm^2) sarcolemmal area. This area (red dots in Figure 4A) was in the size range of T-Tubule opening (Figure 4C) and well below the size of a sarcomere. Calcium peak amplitudes ($\Delta F/F_0$) have been plotted against the relief depth (Figure 4C and 4D). When stimulation is performed onto crests, we never observed calcium increases (Figure 4D, *for figure clarity the grey disk means that one data point represents 29 ones*). When the pipette was moved down to the depth of grooves, either no calcium increase was recorded, or calcium increases were measured with signal intensity growing with depth. It has to be noticed that calcium increases observed in these conditions are not restricted to an area under the pipette but are observed in the entire cell. Hence it can be assumed that, above T-Tubule entries, and only in these locations, density of cationic voltage-dependent channels would be high enough (21) to amplify and propagate K⁺-evoked depolarisation through the sarcolemma of the whole cell. These results are in agreement with the fact that T-Tubules openings are punctuated in membrane and stimulation protocol used in our experiments would excite one single tubule element.

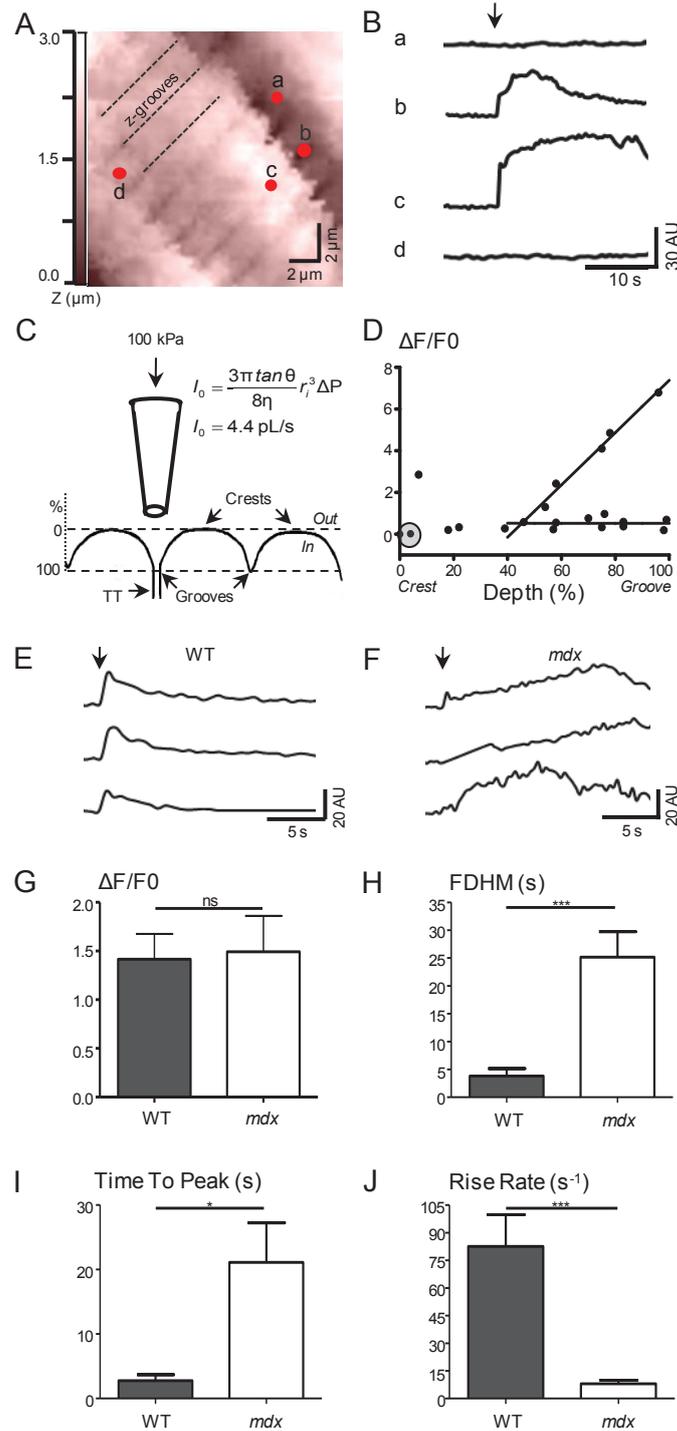


Figure 4. Localized calcium responses to “smart perfusions” in WT and mdx cardiomyocytes. Specific areas of microperfusion (red dots) taking into account the relief (altitude) of the surface obtained with SICM image from *mdx* cardiomyocytes (A). (B) Confocal recordings of intracellular calcium changes after 1 s microperfusion (black arrow indicates the beginning of the microperfusion) above the selected areas with 100 mM potassium solution. (C) Estimation of the flow rate (I_0) of solution via a used $\sim 30 \text{ M}\Omega$

micropipette (inner radius $r_i \approx 90$ nm, as estimated by electron microscopy) after a pressure application of $\Delta P = 100$ kPa. η is the viscosity of the fluid (1 mPa.s), θ is the half cone angle of the inner wall of the pipette (3°). The maximal calculated volume delivered onto the surface of the cardiomyocyte during a 1s application is 4.4 pL (see Methods). Schematic description of relative sizes of pipette and surface including perfusion distance. (D) Fluorescence peak amplitudes changes ($\Delta F/F_0$), corresponding to calcium concentration changes, as a function of depth from crest to groove. Examples of calcium increases after 1s single TT stimulation with 100 mM potassium solution (black arrows) in WT (E) and *mdx* (F) cardiomyocytes. Average amplitude and kinetics parameters: $\Delta F/F_0$ (WT: $n=17$, *mdx*: $n=22$, G), Full Duration at Half Maximum (FDHM) (WT: $n=13$, *mdx*: $n=18$, H), Time To Peak (WT: $n=17$, *mdx*: $n=22$, I), Rise Rate (WT: $n=17$, *mdx*: $n=22$, J). ***: $P < 0.001$, *: $P < 0.05$ vs. wild type (WT).

No calcium increase was observed with microperfusion in the presence of ryanodine (100 μM : $n=4$) or nifedipine (10 μM : $n=4$) (Online Figure 3). Perfusions of high potassium but without calcium Tyrode solution (100 mM K^+ , 20 mM EGTA) ($n=8$) or classical Tyrode solution (5.4 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+}) ($n=12$) were also not able to trigger intracellular calcium increases (Online Figure 3). Figures 4E and 4F display examples of calcium increases after single TT excitations in WT and *mdx* respectively. These examples show clear differences between these two conditions. A large scale analysis demonstrated no changes in signal amplitude (Figure 4G), but significant differences in kinetics parameters. Indeed, Full Duration at Half Maximum (FDHM: Figure 4H) was increased from $4 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ ($n=13$) in WT cells to $25 \text{ s} \pm 5 \text{ s}$ ($n=18$; $P < 0.001$) in *mdx* cells; Time to Peak (Figure 4I) was raised from $3 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ ($n=17$) in WT to $20 \text{ s} \pm 6 \text{ s}$ ($n=22$; $P < 0.05$) in *mdx*; Rise Rate (Figure 4J) was reduced from $83 \text{ s}^{-1} \pm 17 \text{ s}^{-1}$ ($n=17$) in WT to $8 \text{ s}^{-1} \pm 2 \text{ s}^{-1}$ ($n=22$). Hence, calcium increases were found slower with longer durations in *mdx* myocytes in our experimental conditions of local high potassium perfusion.

Spontaneous calcium events. Spontaneous calcium release events (Ca^{2+} sparks), already used as index of diastolic Ca^{2+} leak (22) were also investigated here (Figure 5). Frequency of spontaneous Ca^{2+} sparks was increased from $0.013 \pm 0.001 \text{ events} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n=59$) in WT myocytes to $0.026 \pm 0.002 \text{ events} \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n=23$; $P < 0.05$) in *mdx*. Amplitude and spatial spread of Ca^{2+} sparks were found similar in *mdx* and normal hearts, whereas their duration

were slightly reduced from $23.51 \text{ ms} \pm 1.52 \text{ ms}$ ($n=885$) in wild type myocytes to $19.09 \text{ ms} \pm 0.67 \text{ ms}$ ($n=745$; $P < 0.05$) in *mdx*.

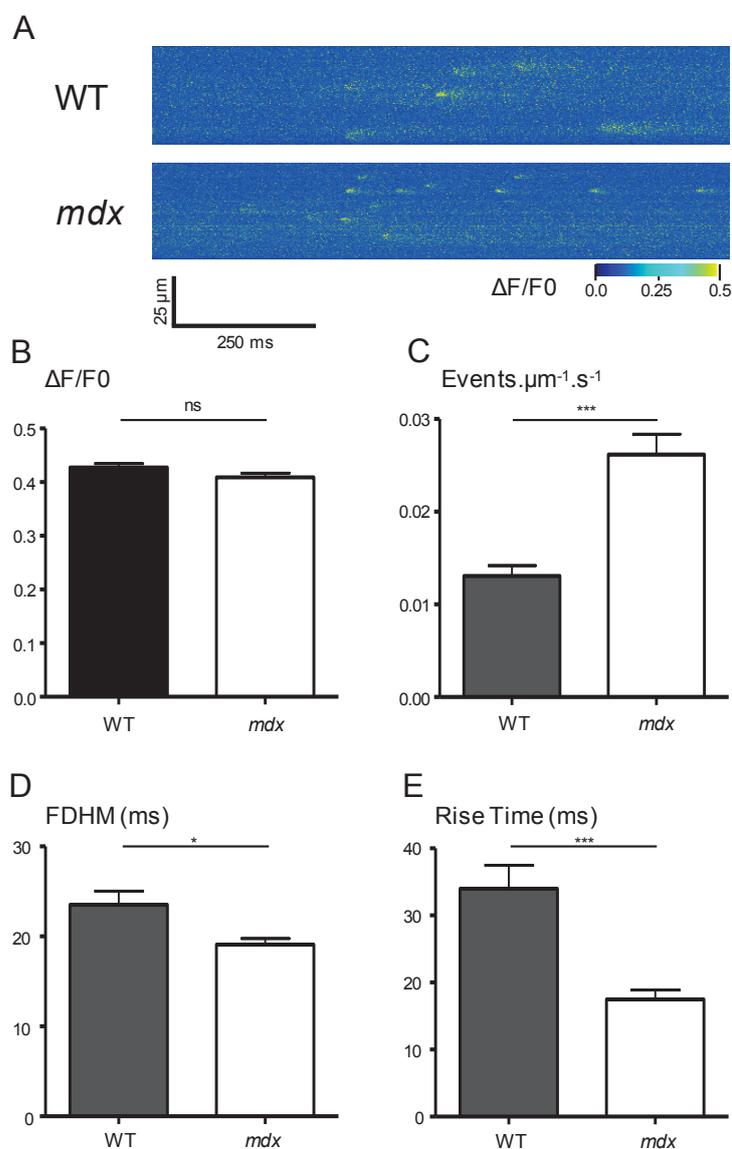


Figure 5. Calcium sparks (A) Examples of $\Delta F/F_0$ line scan images (2 ms/line; 512 pixels/line) recorded in WT (Top) and *mdx* (Bottom) cardiomyocytes. Average amplitudes and kinetics parameters of Ca^{2+} sparks: Maximal amplitude of fluorescence ($\Delta F/F_0$) (B), Events $\cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (WT: $n=59$, *mdx*: $n=23$, C), Full Duration at Half Maximum (FDHM) (D), Rise Time (E). Full Width at Half Maximum (FWHM) was not shown but the difference was not significant. WT: $n=885$, *mdx*: $n=745$). ***: $P < 0.001$, *: $P < 0.05$ vs. wild type (WT), $n=885$ WT cells and $n=745$ *mdx* cells.

Organization of intracellular networks in Dilated Cardiomyopathy. In every muscle cells, dystrophin immunostaining displays an uniform distribution on cytoplasmic side of the

lateral plasma membrane (3). In the case of cardiomyocytes, dystrophin is also observed at the intracellular level along TTs (23). Figure 6A shows a striated and regular dystrophin staining in WT cardiomyocytes. No labelling was detected for dystrophin in *mdx* myocytes (Figure 6B). Regular and striated staining for DHPRs was also observed in WT (Figure 6C) but appeared partly disrupted in *mdx* (Figure 6D), according to TT network disruption demonstrated with di-8-ANEPPS. Alpha-actinin network, which has been shown to be disrupted in cases of myocytes detubulation (9), was also found irregular in *mdx* (Figure 6F) as compared to WT (Figure 6E). Surprisingly, SR network, as reflected by RyR2s labelling, seemed to be preserved in a regular striation appearance in both WT and *mdx* (Figure 6G and H respectively). Large-scale 2D Fourier transform analysis has been performed to evaluate regularity and its power in (i) SICM images, di-8-ANEPPS labelling images, (iii) dystrophin, (iv) α -actinin, (v) RyR2s and (vi) DHPRs immunolabelling. Figure 6I displays examples of power spectra obtained along the x-axis, for each network type. In each case, a power peak was found at 0.50 ± 0.03 cycles/micron, revealing regularities of staining every 2.05 ± 0.05 micrometers. Furthermore, the amplitude of this frequency peak was used to compare WT and *mdx*. Indeed, the higher this peak, the more organized the network. Relative power ratios (mean of peaks from *mdx* divided by mean of peaks from WT) are shown in Figure 6J. Relative power of SICM images was found with a value less than 1, showing that surface is more organized in scalloped shape in WT than in *mdx* ($n=78$; $P < 0.05$). Ratios calculated for TT labelling (Di8, $n=141$; DHPRs, $n=151$; α -act, $n=300$) revealed TT disruption in *mdx* as compared to WT ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$ respectively). Relative power calculated with RyR2s ($n=162$) staining was found superior to 1, suggesting that the SR striation network organization would not be disrupted in dystrophin-deficient cells.

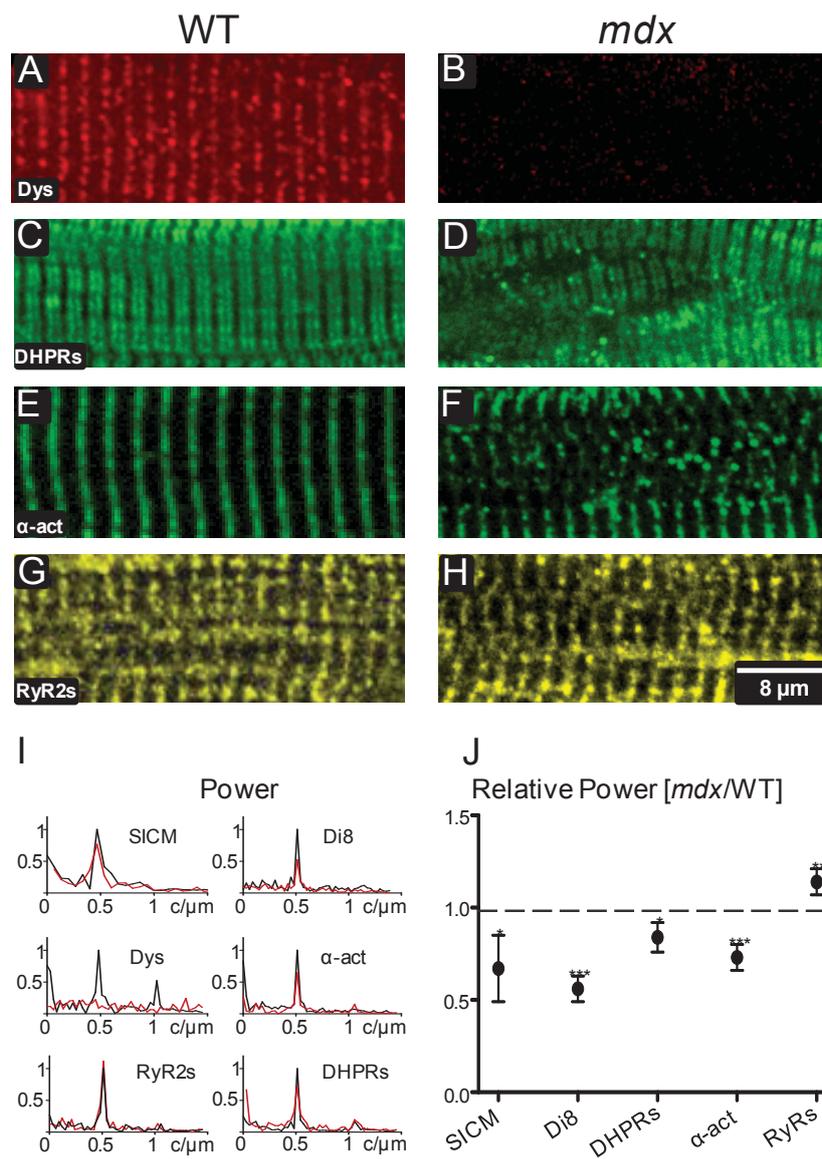


Figure 6. Differential disorganizations of surface and deeper network structures. Examples of zoomed-in view of crop confocal images from myocytes immunolabelled for dystrophin (Dys) (A and B, WT and *mdx*, respectively), DHPRs (C and D, WT and *mdx*, respectively), α -actinin (α act) (E and F, WT and *mdx*, respectively) and RyR2s (G and H, WT and *mdx*, respectively). (I) Examples of Power spectra versus spatial frequency (c/ μ m: cycle/ μ m) in the longitudinal (x) dimension, at zero frequency in the y dimension, computed by using Fourier transform analysis (see Methods) on SCIM images (SICM), di8ANEPPS staining (DI8) and Dys, α act, RyR2s and DHPRs immunolabellings (WT: black spectra, *mdx*: red spectra). Relative Power ratios (means of peak values from *mdx* divided by means of peak values from WT) were calculated in each case and reported in (J). When relative power ratio was less than unity, the *mdx* network was found less organized than the WT network. ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$ vs. wild type (WT).

Discussion

This study presents for the first time an inventory of structural damages, at the cellular level, in the DCM associated with DMD. We used SICM, a high-resolution technique on living cells, to image the external membrane structure. This technique has already been used to characterize heart damages in other cardiopathies (10,11) and it proved to be here a powerful tool to investigate membrane damages in absence of the sub-membrane dystrophin protein.

In WT, cardiomyocytes surface showed a regular architecture composed of crests and Z-grooves spaced at $\sim 2 \mu\text{m}$ intervals. These scalloped shape observations are in agreement with results from both mouse (24) and other species (rat and human) (10). In *mdx* cardiomyocytes, SICM profiles showed local disruptions with loss of regular pattern, possibly associated with a loss of T-Tubule openings. Similar observations were obtained from failing human and rat hearts (10) with also evidence for both membrane flattening and loss of Z-groove length and depth. In addition, a number of drastic and highly localized relief depressions (potholes) have been detected on the surface of dystrophin-deficient cells. It is well known that dystrophin ensures membrane integrity and mechanical stability with the membrane dystrophin-glycoprotein complex (DGC) (25). In dystrophin-deficiency, surface irregularities could be caused by the destabilization of the DGC and potholes could be signs of local fragilities or scars of membrane lesions.

Moreover, SICM technique opened the way to original experimental approaches that could not be developed otherwise. One example is the use of SICM nanopipette to apply local superfusions (which can be termed “smart perfusions” or “microperfusions” for simplicity) onto restricted surface areas. Such smart perfusions of depolarizing solutions, associated with confocal calcium measurements, revealed here original findings about the EC coupling in cardiomyocytes. Both modelling of microperfusion properties (flow rate, area) and relation of calcium increase intensities with depth led us to think that “smart perfusion” of a depolarizing solution may stimulate one single T-Tubule element. Hence, perfusion of 4.4 pL of depolarizing solution onto one T-Tubule opening may activate voltage-dependent channels localized in this tubular element. Ryanodine completely blocked this increase showing that this response is mainly due to the release of calcium from SR *via* RyRs channels through CICR mechanism. Comparison of responses obtained in WT and *mdx* revealed that *mdx* Ca^{2+} responses displayed extended duration and did not reach their

maximum as fast as in WT. Such results demonstrate drastic changes, in dystrophin-deficiency, of ryanodine receptors (RyRs) functional properties during excitation-evoked CICR. These data are in agreement with previous observations about alterations of Ca^{2+} handling in dystrophin-deficient myocytes (13,14,26). Particularly, *mdx* cardiomyocytes present an increased occurrence of Ca^{2+} sparks with a slight decrease in duration (13). This mechanism could reflect "leaky" properties of RyR2s due to an increased open probability (22). In our sparks recording experiments, we even found an amplified leaky phenomenon (more significant differences) probably because our mice were older (at least 10 month-old) at a stage where DCM is fully developed (27). Another interpretation of this increase could be the increase in calcium content inside the SR. Nevertheless in *mdx* cardiomyocytes, biochemical changes of RyR2s can occur and lead to increased sparks occurrence without necessary changes in SR content (13,14). Furthermore, in our microperfusion stimulations experiments, we did not observe higher amplitude of K^{+} -evoked calcium increase in *mdx* cells in identical stimulation conditions.

Even if these leaky properties could be linked to several biochemical modifications (13,14), alternative or complementary explanation would be proposed since disruptions in internal membrane structures were found. Indeed, remodelling of the T-tubule network observed in HF (18) leads to a dyssynchronous calcium release due to secondary CICR. In fact, it was hypothesized that RyRs properties would be changed by the loss of the neighbour T-Tubule. Thus, RyRs clusters would be "orphaned" of their close activation mechanism (calcium entry through DHPRs) (28). In the present study, alterations in the tubular network, leading to a potential "orphaned" RyRs, were demonstrated in di-8-ANEPPS loaded *mdx* cells. In mammalian cardiac myocytes, the extensive TT system consists of two types of elements, transverse (TEs) and longitudinal (LEs) elements. First, TEs occur near the Z-lines at regular intervals ($\sim 2 \mu\text{m}$). Second, LEs run from one Z-line to the next (28). In Heart Failure (HF), a detubulation with loss of TT structures or a remodelling of TT network were also found (10,18,29). Furthermore, Song and colleagues (18) highlighted a dramatic TT reorganization characterized by a loss of TEs but a gain in LEs. The observation is in general agreement with the fact that a failing heart is trying to rejuvenate by switching on early development. In our study we showed a reduction of TT density with a loss of TEs and LEs without compensation for any elements. Nevertheless disturbances observed in *mdx* ventricular cardiomyocytes were limited at small areas, contrary to failing myocytes where disorganization was extended at the entire cell.

Tubular network disruption was also confirmed by the 2D Fourier transform analysis of immunostaining images. Indeed, DHPRs network was found less organized in *mdx* slides. Moreover, α -actinin network, which has found disrupted in detubulation conditions (9), was here also clearly altered in *mdx*. Analysis of RyR2s immunostaining slides revealed a well-organized SR network, confirming that damages are restricted to TT system and not extended to other membrane network.

We assume that hearts from *mdx* mice display partial heart failure, a very interesting result for basic knowledge of dilated cardiomyopathy associated with DMD, but we do not demonstrate that this is directly due to the loss of dystrophin in cardiomyocytes. The decline in strength of body and respiratory muscles may increase the heart's load. Nevertheless, in cardiomyocytes, dystrophin is known to be present in the cell depth along the entire TT (30). It was supposed that dystrophin-laminin link along the entire T-Tubule could, in theory, permit these ramifications of the sarcolemma to function as a specialized region for signal transduction from the periphery to the center of the cardiac cells (23). Our 2D Fourier transform analysis and quantification demonstrate a regular staining of this protein with the same intervals of $\sim 2 \mu\text{m}$. Another interesting point is that, in HF, cellular distribution of dystrophin is lost in degenerating cells (30). Taking into account the tight connection between TT disturbances and the loss of dystrophin, it can be asked whether alterations of plasma membrane and its tubular system would be the consequence of this deficiency. Although extensive additional experiments (various ages of mice, molecular investigations) will be necessary to assert that the membrane structures disorganisation is the direct consequence of the dystrophin absence, our assumption is that dystrophin would have a structural role in preserving membrane architecture from the surface down to the cell depth where it would maintain tubule element integrity as a "stake". At the organ level, this staking property would be an important element for the continuous activity of normal heart muscle. Further experiments with dystrophin or minidystrophin re-expression in *mdx* cardiomyocytes would be needed to verify this hypothesis, but such a forced expression is almost impossible with the transfection techniques currently available.

Acknowledgments

Charlotte Lorin is indebted for the hospitality within National Heart and Lung Institute, and Department of Medicine (Imperial College, London) during her one month training. We thank Anne Cantereau for her expert technical assistances.

Sources of Funding

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR 6187), University of Poitiers, and the Association Française contre les Myopathies.

References List

1. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986; **323**: 646-650.
2. Ervasti JM, Kahl SD, Campbell KP. Purification of dystrophin from skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 1991; **266**: 9161-9165.
3. Ferlini A, Sewry C, Melis MA, Mateddu A, Muntoni F. X-linked dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene. *Neuromuscul.Disord.* 1999; **9**: 339-346.
4. Yasuda S, Townsend D, Michele DE, Favre EG, Day SM, Metzger JM. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* 2005; **436**: 1025-1029.
5. Jung C, Martins AS, Niggli E, Shirokova N. Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca²⁺ signalling and reactive oxygen species-generating pathways. *Cardiovasc.Res.* 2008; **77**: 766-773.
6. Novak P, Li C, Shevchuk AI, Stepanyan R, Caldwell M, Hughes S, Smart TG, Gorelik J, Ostanin VP, Lab MJ, Moss GW, Frolenkov GI, Klenerman D, Korchev YE. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat.Methods* 2009; **6**: 279-281.
7. Miragoli M, Moshkov A, Novak P, Shevchuk A, Nikolaev VO, El Hamamsy I, Potter CM, Wright P, Kadir SH, Lyon AR, Mitchell JA, Chester AH, Klenerman D, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Scanning ion conductance microscopy: a convergent high-resolution technology for multi-parametric analysis of living cardiovascular cells. *J.R.Soc.Interface* 2011; **8**: 913-925.
8. Korchev YE, Negulyaev YA, Edwards CR, Vodyanoy I, Lab MJ. Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell. *Nat.Cell Biol.* 2000; **2**: 616-619.
9. Gorelik J, Yang LQ, Zhang Y, Lab M, Korchev Y, Harding SE. A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure. *Cardiovasc.Res.* 2006; **72**: 422-429.
10. Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009; **106**: 6854-6859.

11. Ibrahim M, Al Masri A, Navaratnarajah M, Siedlecka U, Soppa GK, Moshkov A, Al Saud SA, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM. Prolonged mechanical unloading affects cardiomyocyte excitation-contraction coupling, transverse-tubule structure, and the cell surface. *FASEB J.* 2010; **24**: 3321-3329.
12. Carl SL, Felix K, Caswell AH, Brandt NR, Ball WJ, Jr., Vaghy PL, Meissner G, Ferguson DG. Immunolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J.Cell Biol.* 1995; **129**: 673-682.
13. Fauconnier J, Thireau J, Reiken S, Cassan C, Richard S, Matecki S, Marks AR, Lacampagne A. Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010; **107**: 1559-1564.
14. Sarma S, Li N, van Oort RJ, Reynolds C, Skapura DG, Wehrens XH. Genetic inhibition of PKA phosphorylation of RyR2 prevents dystrophic cardiomyopathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010; **107**: 13165-13170.
15. Korchev YE, Milovanovic M, Bashford CL, Bennett DC, Sviderskaya EV, Vodyanoy I, Lab MJ. Specialized scanning ion-conductance microscope for imaging of living cells. *J.Microsc.* 1997; **188**: 17-23.
16. Kawai M, Hussain M, Orchard CH. Excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes after formamide-induced detubulation. *Am.J.Physiol* 1999; **277**: H603-H609.
17. Sanchez D, Johnson N, Li C, Novak P, Rheinlaender J, Zhang Y, Anand U, Anand P, Gorelik J, Frolenkov GI, Benham C, Lab M, Ostanin VP, Schaffer TE, Klenerman D, Korchev YE. Noncontact measurement of the local mechanical properties of living cells using pressure applied via a pipette. *Biophys.J.* 2008; **95**: 3017-3027.
18. Song LS, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006; **103**: 4305-4310.
19. Louch WE, Bito V, Heinzl FR, Macianskiene R, Vanhaecke J, Flameng W, Mubagwa K, Sipido KR. Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules-a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc.Res.* 2004; **62**: 63-73.
20. Wei S, Guo A, Chen B, Kutschke W, Xie YP, Zimmerman K, Weiss RM, Anderson ME, Cheng H, Song LS. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ.Res.* 2010; **107**: 520-531.

21. Brette F, Orchard C. Resurgence of cardiac t-tubule research. *Physiology.(Bethesda)* 2007; **22**: 167-173.
22. Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev*. 2008; **88**: 1491-1545.
23. Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S, Schaper J. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res*. 1998; **294**: 449-460.
24. Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* 2010; **327**: 1653-1657.
25. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; **90**: 3710-3714.
26. Ullrich ND, Fanchaouy M, Gusev K, Shirokova N, Niggli E. Hypersensitivity of excitation-contraction coupling in dystrophic cardiomyocytes. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2009; **297**: H1992-H2003.
27. Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, Lorenz JN, Wenisch AS, Levin LS. Evolution of the *mdx* mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul.Disord*. 2004; **14**: 491-496.
28. Louch WE, Sejersted OM, Swift F. There goes the neighborhood: pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca²⁺ handling. *J.Biomed.Biotechnol*. 2010; **2010**: 503906.
29. Louch WE, Mork HK, Sexton J, Stromme TA, Laake P, Sjaastad I, Sejersted OM. T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *J.Physiol* 2006; **574**: 519-533.
30. Kaprielian RR, Stevenson S, Rothery SM, Cullen MJ, Severs NJ. Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium. *Circulation* 2000; **101**: 2586-2594.

Online Supplemental Material

Ultrastructural and functional alterations of EC coupling elements from membrane surface to depth in *mdx* cardiomyocytes.

Charlotte Lorin, Mélanie Gueffier, Patrick Bois, Jean-François Faivre, Christian Cognard, Stéphane Sebille

Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, UMR CNRS/Université de Poitiers n°6187, Pôle Biologie Santé Bât B36, BP 633, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France

Online Extended Methods

Enzymatic Cell Dissociation. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Animal handling and experiments protocol were granted by the local ethics board. Adult cardiac myocytes were isolated from (10 to 12 months) male C57 BL10 Scsn mice (WT) with a protocol worked out based on previous studies (1). Mice were injected intraperitoneally with a mixture of heparin (2500 units/mL) and trichloroacetaldehyde hydrate (300 mg/kg) (Sigma). The heart was removed from the chest, cannulated via the aorta, and mounted on a Langendorff perfusion apparatus. The heart was perfused with several oxygenated solutions at 37°C. The initial perfusion was Tyrode solution for 4 minutes, and then the perfusion was switched to a Ca²⁺-free Tyrode solution for 5 minutes. The heart was then perfused for 2 minutes with the enzyme solution that was 50 mL of Ca²⁺-free Tyrode solution plus 620 U/mL collagenase type 2 (Worthington, Lakewood, NJ), 0.104 U/mL protease XIV (Sigma). After 2 minutes of perfusion, the enzyme solution was supplemented with 27 µL of 100 mM CaCl₂ for 20-25 minutes. The left ventricle was removed, immersed in Kraft-Brühe solution, and gently triturated using Pasteur pipettes. Cells were resuspended and plated in plating media for 2h to allow attachment.

Plating was performed on 35-mm² Petri dishes coated with matrigel (BD Biosciences) maintained at 37°C in a moist 95% air 5% CO₂ atmosphere. After 2 h, serum-containing plating media was switched to culture media.

Solutions and Chemicals. For cell dissociation, Tyrode solution contained (in mM): 140 NaCl; 5.4 KCl; 1.8 CaCl₂; 1.8 MgCl₂; 10 Hepes; 11 Glucose; pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Kraft-Brühe medium contained (in mM): 70 KCl; 5 K-glutamic acid; 20 KH₂PO₄; 5 MgSO₄; 0.08 CaCl₂; 0.5 EGTA; 5 Creatin; 5 Na₂ATP; 20 Taurin; 10 Hepes; 10 Glucose; 4 g/L Bovine Serum Albumin (BSA); pH was adjusted to 7.2 with KOH. The culture media contained: 1X Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza); 10 µg/mL Insulin; 50 µg/mL Gentamicin; 2 mM Glutamine; 4 mM NaHCO₃; 10 mM Hepes; 0.2 % Bovine Serum Albumin; 25 µM Blebbistatin (Sigma). Plating solution is constituted of culture media plus 5 % BSA.

For T-Tubules labelling, extracellular medium contained (in mM): 120 K-glutamic acid; 25 KCl; 2 MgCl₂; 1 CaCl₂; 2 EGTA; 10 Glucose; 10 Hepes; pH was adjusted to 7.4 with Tris base.

For immunochemistry and scanning electron microscopy, Phosphate Buffer Solution (PBS) contained (in mM): 130 NaCl; 2.07 KCl; 1.5 Na₂HPO₄; 8 KH₂PO₄; pH was adjusted to 7.4 with NaOH.

For microperfusion experiments, Nifedipine and Ryanodine were purchased from Sigma and Calbiochem respectively.

Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM). Basic arrangement of the SICM for topographical imaging of living cells has previously been described (2). SICM is a scanning probe microscopy technique in which the ion current flowing into a nanopipette is used to control the vertical (z axis) position of the pipette tip relative to the cell surface. Nanopipette was connected to an Axopatch 200B patch clamp amplifier coupled to a DigiData 1322A (Axon Instruments). Modulated ion current is fed to a DSP card, which generated a signal for the feedback loop to keep constant the separation between the sample and the nanopipette. To scan sample, nanopipette probe was driven in the x- and y-directions by the piezo stage mounted on 25-mm translation stage DC motors. Information on the lateral and vertical positions was recorded and used to generate a three-dimensional (3D) topographic image

(ScanIC Image software, Ionscope). In this study the newly developed hopping probe ion conductance microscopy was used (3). At each imaging point, the pipette approaches the sample from a starting position that is above any of the surface features. The reference current is measured while the pipette is well away from the surface. The position of z-dimension actuator when the current achieves 1% reduction is recorded as the height of the sample at this imaging point. The z-dimension actuator then withdraws the pipette away from the surface and is moved laterally to the next imaging point. By continuously updating the reference current while the pipette is away from the surface, the method automatically adjusts for any slow drifts in the pipette current. The present instrument is based on an inverted optical microscope (Olympus IX70). Ionscope Ltd provided SICM imaging software for DSP card.

Nanopipettes were made from 1.00 mm outer diameter, 0.58 mm inner diameter glass microcapillaries (Intrafil) on a laser-based Brown-Flaming puller (model P-2000, Sutter Instrument Compagny). The measured nanopipette resistance was usually 100 M Ω .

Scanning Electron Microscopy. Ventricular cardiomyocytes from mouse hearts were fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4) for 45 min. Then, cells were washed three times in PBS 10 min and dehydrated in graded concentrations of ethanol. Finally, they were dried by the hexamethyl disilazane (HDMS), coated with 25 nm gold using an ion-coater and examined in a JSM, 840 A SEM.

Z-groove Ratio and Surfaces Analysis. Z-groove ratio is an index of the completeness of the Z-grooves on the surface of cardiomyocytes. To calculate Z-groove ratio, the length of Z-grooves seen on a single image obtained by SICM were divided by the total estimated Z-groove length, as if they all were present on the surface (4).

Surfaces were calculated (ScanIC Image software, Ionscope) after selection of regions of interest using according to the defined morphologic criteria (groove, flat, and pothole).

T-Tubule Imaging and Analysis. To label T-Tubules, ventricular myocytes were incubated with 10 μ M di-8-Anepps (Invitrogen) for 15 minutes. Then living cells were

washed with extracellular medium and confocal images were acquired by means of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) using an Olympus confocal system (confocal FV1000 station) (4,5). Maximal resolution was obtained with an Olympus UplanSapo x 60 oil, 1.4 numerical apertures (NA), objective lens. Fluorophore was excited with 488 nm line of an argon laser and the emitted fluorescence was detected through spectral detection channels at 522 nm for green fluorescence.

Power spectra were computed as previously described (6). Briefly, the power spectrum of each image was computed as the magnitude of the 2D spatial Fourier transform by using the IDL 6.3 (ITTVIS France, Paris) programming language. The average intensity of each image was subtracted before computing transforms to correct for differences in staining between images. Results shown are of power as a function of spatial frequency in the longitudinal (x) dimension at zero frequency in the transverse (y) dimension. The peak of the power/frequency relationship was calculated for each image and compared between the WT and the *mdx* groups. Examples of 3D representation of Fourier transforms are shown in Online Figure 4. The amplitude of the peak is taken as an index or regular distribution of the T-Tubule network, as previously described (5,7). Data are presented in percentage related to power calculated on a very regular staining grid.

Density of T-Tubule (volume ratio) was quantified by the ratio of T-Tubule fluorescence to total membrane fluorescence in the same confocal slice.

Percentages of transverse Tubule elements (TEs) and longitudinal Tubule elements (LEs) were calculated as previously described (6). Briefly, Each T-Tubule pixel was localized to be part of a continuous line extending at least 2 μm , oriented along the y-axis for TEs and along the x-axis for LEs (5).

Calcium Measurements and Analysis. For all experiments, cells were loaded for 30 minutes with Fluo-4 AM (6 μM ; Molecular, Probes) at room temperature (23°C) in Tyrode solutions with 100 μM Blebbistatin. Fluorescent images were recorded by confocal laser scanning microscopy using a Bio-Rad MRC 1024 (Bio-Rad Laboratories) equipped with a 15 mW Ar-Kr gas laser. Confocal unit was attached to an inverted microscope (Olympus IX70) and fluorescence signal collection was performed through the control software Lasersharpe 3.2 (Bio-Rad Laboratories). Fluorophore was excited with 488 nm line and the emitted

fluorescence was detected through spectral detection channels at 522 nm for green fluorescence.

Calcium sparks were identified on two-dimensional images (512 x 512 pixels) with a 60x water immersion objective (1.2 NA) and were acquired in line scan mode (x, t images: 1 line / 2 ms, 512 x 512 pixels) taking fluorescence variations along a space line as a function of time.

Sparks were analysed using the HARVELE software (8), developed in our laboratory under IDL 6.3, that automatically detects calcium release events on a series of x, t images (Figure 4). For each spark, five parameters were determined: $\Delta F/F_0$ (normalized maximum amplitude of fluorescence), rise time (RT) in ms, FWHM (full width at half maximum) in μm , FDHM (full duration at half maximum) in ms, and frequency in sparks/s.

Localized Microperfusion. For these microperfusion experiments, nanopipette resistance was usually 30 M Ω . Inner radius of such a pipette was estimated equal to about 90 nm by scanning electron microscopy (Online Figure 1). After SICM scanning of a cardiomyocytes area (15x15 μm), 100 kPa pressure was applied toward nanopipette, perfusing 4.4 pL of 100 mM KCl solution for 1 second, at chosen surface coordinates. This system was combined with Bio-Rad MRC 1024 confocal microscope that allows to record dynamic calcium measurements (by means of the calcium sensitive fluorescent Fluo-4 probe) in a region of interest (ROI) under the scanned membrane. Mean fluorescence from this area was recorded as a function of time with a 600 ms resolution. Amplitude and kinetics parameters were calculated: $\Delta F/F_0$ (normalized maximum amplitude of fluorescence), FDHM (full duration at half maximum) in s, Time To Peak in s, Rise Rate in s⁻¹.

Immunostaining of dystrophin, DHPRs, α -actinin, and RyR2s. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 h 30, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 1 h 30, and then a blocking solution of 4% BSA was applied for 1 h. Cells were incubated overnight at 4°C in a wet chamber with anti-dystrophin (Novacastra; 1:20), anti-DHPR (Sigma; 1:500), anti- α -actinin (Sigma; 1:500) or anti-RyR (Thermo scientific; 1:50), primary antibodies diluted in PBS 4% BSA and 0.5% Triton X-100. After washing out in PBS, cells were incubated for 1 h in PBS 4% BSA and 0.5% Triton X-100 with secondary antibodies

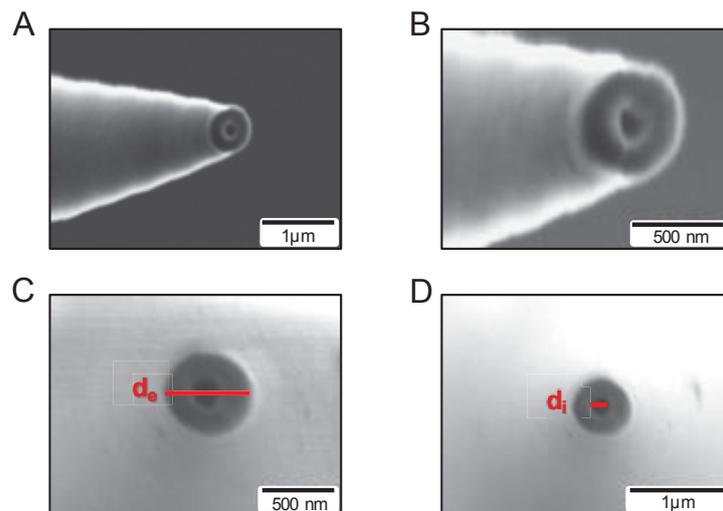
(Alexa Fluor 555-conjugated chicken anti-mouse IgG; 1:200). Immunolabelled samples were examined and confocal images were acquired by means of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) using an Olympus confocal system (confocal FV-1000 station). Maximal resolution was obtained with Olympus UplanSapo x 60 oil, 1.4 NA, objective lens. Fluorophores were excited with the 543 nm line of the HeNe laser (for TRITC). Emitted fluorescence was detected through spectral detection channels between 550-625 nm. Examples of staining images of entire cells are displayed in Online Figure 5.

Regularity of immunostainings distribution has been evaluated with a 2D spatial Fourier transform. Power spectrum of each zoomed-in view was computed as the magnitude of the 2D spatial Fourier transform (IDL 6.3). The average intensity of each image was subtracted before computing transforms to correct for differences in staining between images. The power was plotted as a function of spatial frequency in the longitudinal (x) dimension at zero frequency in the transverse (y) dimension. The peak of this power/frequency relationship was calculated for each image and compared between the WT and the *mdx* groups. The amplitude of the peak is taken as an index of distribution regularity of the staining network. Data are presented in relative power ratios: mean of peaks from *mdx* divided by mean of peaks from WT.

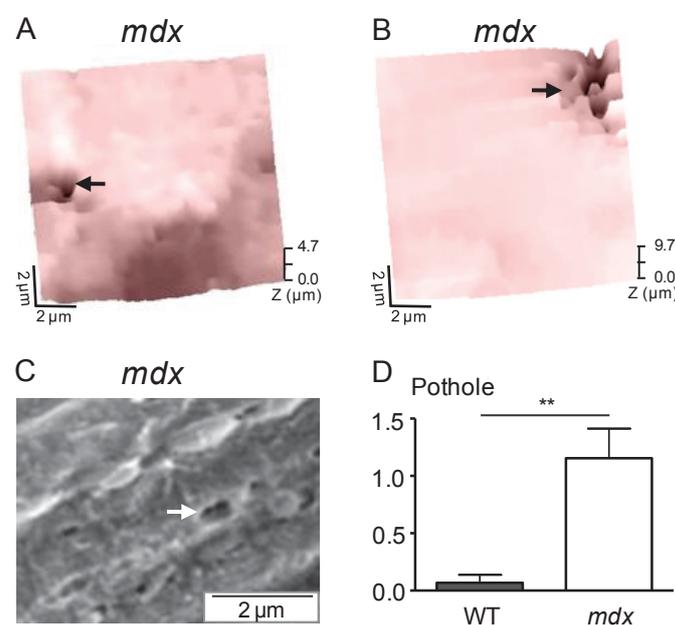
Statistical Analysis. All results are expressed as mean \pm SEM of n observations. Sets of data were compared using Student's t test. All statistical tests were performed using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software).

References list

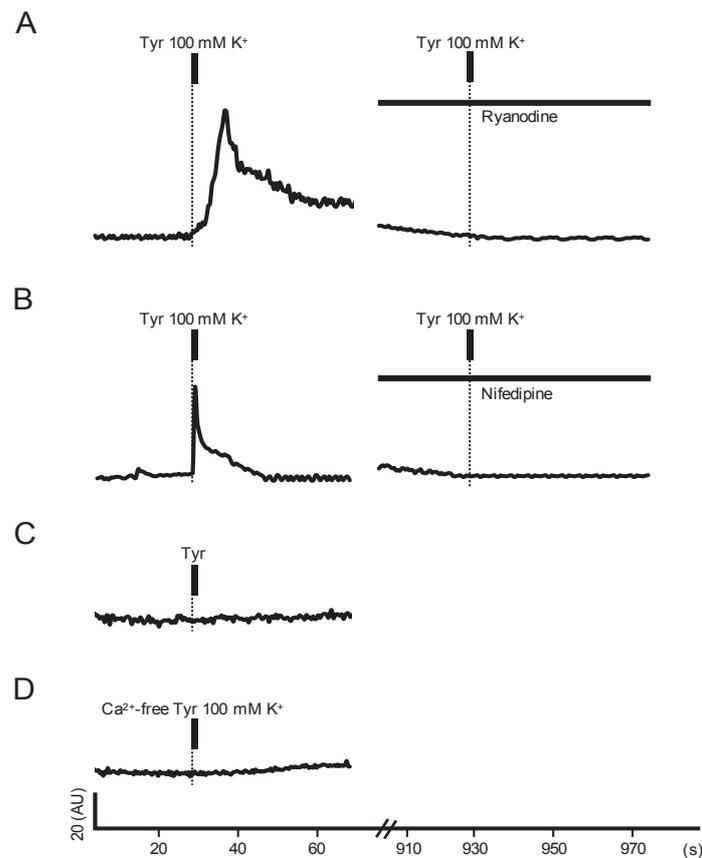
1. Kabaeva Z, Zhao M, Michele DE. Blebbistatin extends culture life of adult mouse cardiac myocytes and allows efficient and stable transgene expression. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2008; **294**: H1667-H1674.
2. Korchev YE, Bashford CL, Milovanovic M, Vodyanoy I, Lab MJ. Scanning ion conductance microscopy of living cells. *Biophys.J.* 1997; **73**: 653-658.
3. Novak P, Li C, Shevchuk AI, Stepanyan R, Caldwell M, Hughes S, Smart TG, Gorelik J, Ostanin VP, Lab MJ, Moss GW, Frolenkov GI, Klenerman D, Korchev YE. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat.Methods* 2009; **6**: 279-281.
4. Gorelik J, Yang LQ, Zhang Y, Lab M, Korchev Y, Harding SE. A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure. *Cardiovasc.Res.* 2006; **72**: 422-429.
5. Swift F, Birkeland JA, Tovsrud N, Enger UH, Aronsen JM, Louch WE, Sjaastad I, Sejersted OM. Altered Na⁺/Ca²⁺-exchanger activity due to downregulation of Na⁺/K⁺-ATPase alpha2-isoform in heart failure. *Cardiovasc.Res.* 2008; **78**: 71-78.
6. Song LS, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006; **103**: 4305-4310.
7. Ibrahim M, Al Masri A, Navaratnarajah M, Siedlecka U, Soppa GK, Moshkov A, Al Saud SA, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM. Prolonged mechanical unloading affects cardiomyocyte excitation-contraction coupling, transverse-tubule structure, and the cell surface. *FASEB J.* 2010; **24**: 3321-3329.
8. Sebillé S, Cantereau A, Vandebrouck C, Balghi H, Constantin B, Raymond G, Cognard C. Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series. *Comput.Methods Programs Biomed.* 2005; **77**: 57-70.



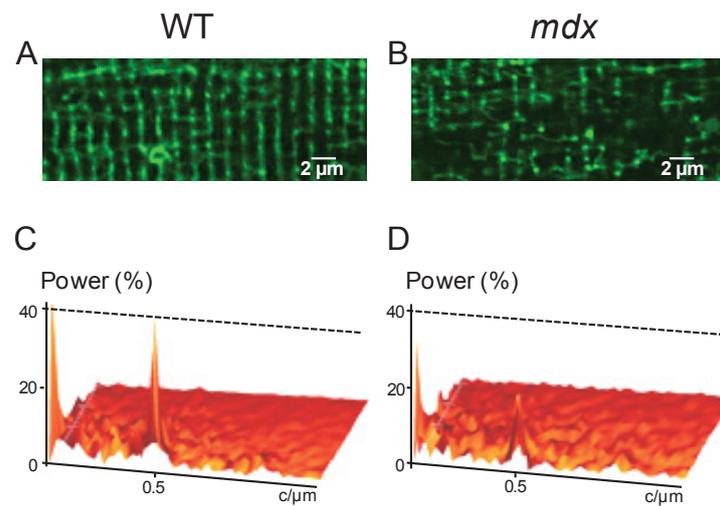
Online Figure 1. (A, B) Examples of profile zoomed-in views of a $\sim 30 \text{ M}\Omega$ nanopipette tip by Scanning Electron Microscopy. (C, D) Examples of front zoomed-in views of a $\sim 30 \text{ M}\Omega$ nanopipette by Scanning Electron Microscopy. (C) Nanopipettes external diameter was estimated at: $d_e \approx 575 \text{ nm}$, and (D) nanopipettes inner diameter was estimated at: $d_i \approx 180 \text{ nm}$.



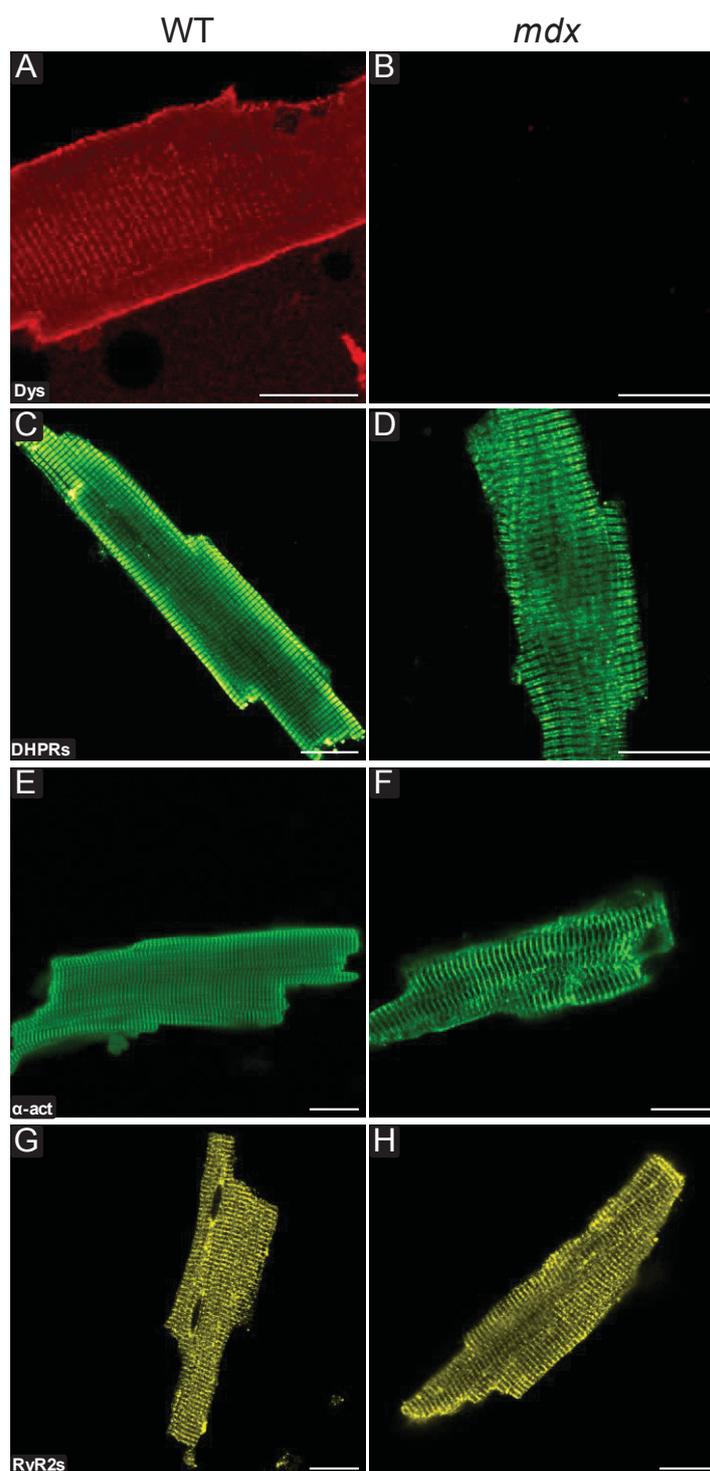
Online Figure 2. Surface imaging of ventricular cardiomyocytes isolated from *mdx* mouse hearts. $15 \times 15 \mu\text{m}$ SICM (A, B) and SEM (C) images showing potholes, indicated by black and white arrows, on the surface of *mdx* cardiomyocytes. (D) Surface ratio of potholes in WT (solid bars) and *mdx* (open bars) cardiomyocytes. Measurements were performed on 19 and 37 cardiomyocytes respectively. **: $P < 0.01$, vs. wild type (WT).



Online Figure 3. Examples of fluorescence (calcium) increases after solution application with a pressure of 100 kPa through the SICM nanopipette, which resulted in the delivery of ~ 4.4 pL/s of pipette solution onto the mouse cardiac cell surface (duration: 1s, vertical black bar). A, Loss of Ca^{2+} responses after addition of ryanodine (100 mM) in external Tyrode medium (right panel). Pipette contained 100 mM KCl Tyrode solution (Tyr 100 mM K^+). B. Same experiment than in A except ryanodine was replaced by nifedipine (10 mM). C, Experiment performed in the presence of Tyrode solution in external and intra-pipette media. D, Experiment performed in the presence of Ca^{2+} free Tyrode solution in external medium. Pipette medium contained Ca^{2+} free 100 mM KCl Tyrode solution. Such experiments were performed on several cells as follows: A: $n=4$, B: $n=4$, C: $n=12$, D: $n=8$.



Online Figure 4. Examples of zoomed-in view confocal images crops from myocytes staining with di-8-ANEPPS in WT (A) and *mdx* (B). 3D representations of power spectra versus spatial frequency ($\text{c}/\mu\text{m}$: cycle/ μm) in the longitudinal (x) dimension, at zero frequency in the y dimension, computed by using Fourier analysis (see Methods) on di-8-ANEPPS stainings in WT (C) and *mdx* (D) cardiomyocytes. Data are presented in percentage related to power calculated on a very regular staining grid.



Online Figure 5. Examples of confocal images from myocytes immunolabelled for dystrophin (Dys) (A and B), DHPRs (C and D), α -actinin (α -act) (E and F) and RyR2s (G and H). Left column: WT, right column: *mdx*. (Scale bars, 20 μ m).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale :

La mise en place de la technique de microscopie de conductance ionique à balayage (SICM) dans notre laboratoire a nécessité une période de mise au point et de tests pour acquérir les connaissances suffisantes à son fonctionnement et à son exploitation. Une fois maîtrisée, il semblait intéressant de topographier plusieurs types cellulaires, en parallèle de l'étude menée sur la cardiomyopathie dilatée (CMD) associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).

Les échantillons ont été choisis de sorte à pouvoir les comparer aux cardiomyocytes ventriculaires : fibres musculaires squelettiques de pattes ou issues du *Flexor Digitorum Brevis* (FDB), et les myoblastes, ou encore pouvant avoir une relation avec eux (myofibroblastes). Les résultats obtenus montrent que, tout comme les cardiomyocytes ventriculaires, les fibres musculaires squelettiques issues des muscles des pattes de souris présentent une organisation de leur membrane plasmique en crêtes et en sillons. Cette architecture tridimensionnelle doit être nécessaire à l'activité contractile de ces cellules. Effectivement, elles doivent propager les potentiels d'action rapidement vers les structures intercellulaires pour générer une contraction et répondre ainsi aux besoins physiologiques qui nécessitent cette activation. De plus, avec les myocytes cardiaques, elles partagent un agencement cytosquelettique similaire pour leur réseau de tubules-T, les myofibrilles, et les sarcomères (Tortora et Grabowski, 2001). Cependant, une question reste entière. Dans les cardiomyocytes et ces fibres musculaires squelettiques, quelles sont les molécules responsables de cet arrangement topographique ? Il serait donc très intéressant de mener des études sur la mise en place de cette conformation membranaire et de déterminer quels sont les protéines, les gènes, et les voies de signalisation qui conduisent à cette topographie. Différents travaux, notamment ceux de Gorelik et collaborateurs (2006) ainsi que nos expériences sur les cardiomyocytes ventriculaires de souris *mdx*, ont montré que lors de pathologies myocardiques, telles que l'insuffisance cardiaque et la cardiomyopathie dilatée associée à la dystrophie musculaire de Duchenne, la membrane plasmique perdait son agencement en crêtes et en sillons. En est-il de même pour les fibres musculaires squelettiques ? Des

topographies membranaires seraient à mener sur ces cellules, provenant par exemple de muscles issus de souris *mdx* âgée de quatre semaines. Effectivement, il est connu que, dans la DMD, ces cellules connaissent des cycles de dégradation/régénération. Ainsi, il a été déterminé que le pic de nécrose cellulaire est le plus important à l'âge d'un mois pour les souris servant de modèle d'étude à cette pathologie (Tanabe et al., 1986). En explorant la surface membranaire de ces cellules *mdx*, de nouvelles hypothèses pourraient être émises si elle s'avère déstructurée. Effectivement, on pourrait se demander si la dystrophine aurait un rôle dans la conformation tridimensionnelle du sarcolemme.

Face à ces résultats, il serait facile de généraliser cette organisation, en crêtes et en sillons, à toutes les cellules musculaires striées. Néanmoins, la microscopie de conductance ionique à balayage nous a empêché de commettre cette imprudence. Effectivement, la topographie membranaire des fibres musculaires isolées du FDB semble plutôt plate. Ce résultat suggère que cette organisation sarcolemmale sillonnée ne s'applique pas à toutes les cellules musculaires. Aucun agencement spécifique du sarcolemme n'apparaît sur les images obtenues par le SICM. N'ayant pas poussé les investigations plus loin, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses sur la raison de cette différence architecturale. Serait-il envisageable que la position anatomique du muscle FDB influence la conformation membranaire ? Effectivement, les souris s'appuyant sur ce muscle pour leurs diverses activités telles que la motricité, il est plausible que les contraintes physiques externes exercent un rôle sur l'agencement membranaire. D'autres questions se posent : puisque la fonction contractile est la même que pour les autres cellules musculaires, quels éléments physiologiques diffèrent pour générer cette différence topographique ? On pourrait également s'interroger sur le choix judicieux ou non de se servir des fibres musculaires issues du FDB pour étudier la myopathie de Duchenne puisqu'elles semblent présenter des spécificités membranaires comparées aux autres cellules.

Puisqu'il existe des différences de conformation entre les cellules musculaires striées, il nous a semblé pertinent de s'intéresser aux lignées cellulaires qui servent de modèle d'étude à la DMD. Les myoblastes ne présentent pas non plus de striation de leur membrane plasmique. Mais comparativement aux fibres du FDB, ces résultats sont moins surprenants. Effectivement, les myoblastes sont des cellules musculaires non matures. Elles ne possèdent donc pas de propriétés contractiles. Il est, ainsi, raisonnable de penser que la membrane plasmique n'a pas besoin d'une topographie particulière. Mais en est-il de même pour les myotubes ? Ces travaux restent à réaliser.

Enfin, le dernier type cellulaire qui a suscité notre curiosité est le myofibroblaste. Comme cela a déjà été préalablement expliqué, ces cellules ont un rôle déterminant dans le cœur et sont la cause de nombreux dérèglements dans les pathologies cardiaques. Tout comme les myoblastes, les myofibroblastes ne montrent pas de spécificités d'agencement membranaire lors de l'observation des images obtenues en SICM. Néanmoins, il est vrai qu'ils n'ont pas de fonction contractile mais qu'ils possèdent une activité essentiellement sécrétoire. Ainsi, ces cellules ne semblent pas nécessiter une organisation particulière de leur membrane plasmique en crêtes et en sillons. Toutefois, il serait très intéressant d'approfondir l'exploration de l'organisation tridimensionnelle de la membrane plasmique car on peut supposer qu'il existe une organisation spécifique en relation avec leur rôle cellulaire.

Ces différentes expériences topographiques ont prouvé que n'importe quelle cellule adhérente à son support peut faire l'objet d'une analyse en microscopie de conductance ionique à balayage. Bien sûr, de nombreuses questions sont soulevées suite à ces travaux, mais on sait désormais que les cellules n'ont pas une membrane uniforme et qu'une relation étroite existe entre la fonction des cellules et leur agencement membranaire.

Une fois le SICM mis au point, l'étude des cardiomyocytes ventriculaires *mdx* a pu être menée et conduire à la réalisation d'un certain nombre d'expériences qui ont permis d'écrire une publication actuellement en soumission auprès d'un journal scientifique. Cette étude présente un inventaire des dommages structuraux, au niveau cellulaire, de la cardiomyopathie dilatée (CMD) associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). L'utilisation de la microscopie de conductance ionique à balayage (SICM) a rendu possible l'exploration de l'architecture membranaire de cellules vivantes par des images de haute résolution. Cette technique, déjà exploitée par d'autres laboratoires, a permis de caractériser certaines altérations cellulaires dans l'insuffisance cardiaque (Lyon et al., 2009 ; Ibrahim et al., 2010). Ainsi, il apparaissait très intéressant d'employer cet outil pour comprendre les conséquences de l'absence de dystrophine sur la membrane plasmique dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris *mdx* âgées entre 10 et 12 mois.

La mise au point du SICM dans notre laboratoire a confirmé un agencement spécifique du sarcolemme des cellules cardiaques en crêtes et en sillons ou « *z-grooves* ». L'intervalle de 2 μm entre deux structures correspond à la longueur des sarcomères intracellulaires. Il est donc raisonnable de penser que la fonction contractile de ce type cellulaire a nécessité une

architecture et aux besoins d'une signalétique rapide. Dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris *mdx*, les topographies membranaires obtenues par SICM révèlent des modifications surfaciques du sarcolemme. Des pertes locales de sillons et d'entrées de tubules-T sont observables. De plus, des structures particulières, appelées « *potholes* », suggèrent des lésions, ont été mises en évidence. Ces altérations, qui n'ont pas fait l'objet de travaux plus poussés, sont majoritairement retrouvées chez les cellules *mdx*. Il est connu que la dystrophine assure l'intégrité membranaire et une stabilité mécanique au moyen du complexe DGC (Mokri et Engel, 1975 ; Menke et Jockusch, 1991 ; Petrof et al., 1993 ; Davies et Nowak, 2006). Dans les cellules déficientes en dystrophine, ces « *potholes* » pourraient refléter soit une fragilité membranaire accentuée, révélée par la dissociation cellulaire, soit de véritables restructurations membranaires dues à la pathologie.

Comme cela a déjà été décrit dans « *l'Etat de l'art* », la microscopie de conductance ionique à balayage peut être associée à diverses technologies pour accroître ses fonctionnalités possibles. Une de ces combinaisons est l'association du SICM avec de la microscopie confocale et un micro-injecteur de pression, pour appliquer des perfusions localisées de solution dépolarisante sur des zones préalablement sélectionnées de la membrane plasmique. Les réponses calciques globales ainsi générées permettent de comprendre la répartition des tubules-T sur le sarcolemme et de tester l'efficacité du couplage excitation-contraction. Ces expérimentations ont révélé une localisation ponctuée des tubules-T et des réponses calciques plus lentes et plus longues dans les cardiomyocytes *mdx*. Les résultats sur les libérations localisées et spontanées de calcium ainsi que de précédents travaux (Fauconnier et al., 2010) sur l'activité au repos du réticulum sarcoplasmique (RS) confirment une modification des propriétés fonctionnelles des récepteurs à la ryanodine de type 2 qui seraient à l'origine d'une fuite de Ca^{2+} du RS. Cette modification pourrait ainsi être responsable d'un couplage excitation-contraction altéré dans les cellules déficientes en dystrophine. Effectivement Sarma et collaborateurs (2010) et Fauconnier et collaborateurs (2010) ont démontré l'existence de modifications biochimiques sur ces RYR2s qui expliqueraient ces changements d'activité. Une charge accentuée en calcium du RS pourrait également expliquer ces observations. Néanmoins, comme l'amplitude des réponses calciques est la même dans les cellules contrôles et malades, il est raisonnable de penser que cette hypothèse n'est pas perspicace. La compréhension de cette altération de l'homéostasie calcique peut être complétée par un autre phénomène. Effectivement, nos travaux ont montré une diminution du volume de tubules-T ainsi qu'une

localisation qui peut être localement changée. Ces résultats sont renforcés par les marquages des réseaux protéiques déstructurés des DHPRS et de l' α -actinine. Ce remodelage pourrait être à l'origine d'une altération du couplage excitation-contraction par une sorte de découplage entre les DHPRS et les RYR2s. Ce découplage serait à l'origine de modifications micro-environnementales qui changeraient les propriétés fonctionnelles des RYR2s les rendant « orphelins » comme cela a déjà été décrit pour d'autres affections dans la littérature (Song et al., 2006).

Nous ne pouvons pas affirmer que toutes ces perturbations structurales et fonctionnelles sont dues à l'absence de dystrophine. Effectivement, vue la pathologie, il serait sensé de suggérer que la faiblesse de l'ensemble des muscles squelettiques, notamment ceux responsables de la fonction respiratoire, pourrait entraîner une augmentation de la charge cardiaque. Cela aurait pour conséquence le développement d'une insuffisance myocardique qui serait donc seulement secondaire à la maladie. Cependant, à la différence des muscles striés squelettiques, la dystrophine n'est pas seulement localisée à la membrane plasmique dans les cardiomyocytes ventriculaires (Kaprielian et al., 2000 ; Stevenson et al., 1997), elle est aussi présente le long des tubules-T. Il a été démontré que dans les cellules cardiaques dégénérées, la disparition des tubules-T entraînait celle de la dystrophine (Kaprielian et al., 2000). Vu la relation étroite qui semble exister entre ces deux éléments, on peut se demander si l'absence de dystrophine dans les cellules *mdx* n'entraînerait pas l'altération de l'ensemble des systèmes membranaires et ainsi une perturbation de l'homéostasie et de la signalisation calciques. La dystrophine jouerait un rôle de tuteur pour maintenir l'intégrité architecturale de la cellule et assurer ainsi, l'intégrité fonctionnelle.

Perspectives :

Au vue de tous ces résultats, il apparaît intéressant de se demander si ces modifications cellulaires sont la résultante de l'absence de dystrophine ou si ce n'est qu'une conséquence de l'altération physique des patients qui endommagerait le cœur. Ainsi, il serait nécessaire de procéder à la même étude mais sur des cœurs de souris d'âges différents du stade néonatal à 12 mois avec un intervalle de temps d'un mois. Effectivement, on étudierait ainsi les mécanismes qui sont à l'origine de ces altérations calciques et membranaires et on déterminerait également si les altérations physiques dues à la dystrophie musculaire de Duchenne sont la cause ou non de cardiomyopathie dilatée associée.

De plus, il semble également indispensable d'explorer les interactions moléculaires entre la dystrophine et les tubules-T. Effectivement, la présence de cette protéine au niveau de ces structures reste obscure car elle est absente dans les autres types de cellules musculaires striées. Quel est son rôle ? Comment interagit-elle ? Quels processus permettent son installation ? Comment est-elle régulée ? Et enfin son absence est-elle responsable de la déstructuration membranaire et de la désynchronisation fonctionnelle ? Quels mécanismes cellulaires de compensation sont en place pour permettre une installation progressive de cette cardiomyopathie dilatée ?

De nombreuses questions sont encore en suspens. Une technique permettrait peut être de répondre à certaines de ces interrogations. Il faudrait réexprimer la dystrophine dans ces cellules cardiaques par transfection et observer les conséquences de cette manipulation. Cependant, de nombreuses barrières existent face à ce type d'expérimentations. Effectivement, il est connu que les cardiomyocytes ventriculaires en culture subissent un processus de dédifférenciation en réexprimant certains gènes néonataux (Lipp et Niggli, 1994 ; Louch et al., 2004). Il serait alors judicieux de réaliser des transfusions directement dans le cœur pour faire exprimer cette protéine. Malheureusement, les techniques disponibles aujourd'hui ne permettent pas de réaliser avec succès ce type d'opérations.

Pour conclure, ce travail apporte, certes, plus de questions que de réponses sur la cardiomyopathie dilatée associée à la DMD. Les connaissances scientifiques restent encore limitées, mais ces recherches contribuent à ouvrir la voie sur d'autres explorations qui permettront un jour de mieux appréhender cette pathologie. Malgré tout, nous apportons un constat sur les anomalies cellulaires de souris où la CMD est installée et nous suggérons par toutes les données indirectes apportées par les différents résultats que la dystrophine jouerait un rôle de tuteur dans l'architecture membranaire plus important que celui identifié pour l'instant dans les cellules musculaires squelettiques.

Annexes

Annexes

I-Annexe 1 : Composition des milieux utilisés lors de l'isolement des cardiomyocytes de souris

Tyrode	Tyrode 0 Ca ²⁺	KB	Milieu de « plating »
■ NaCl 140 mM	■ NaCl 140 mM	■ KCl 70 mM	■ DMEM 98 %
■ KCl 5,4 mM	■ KCl 5,4 mM	■ KGlut 5 mM	■ Insul 10 µg/mL
■ CaCl ₂ 1,8 mM	■ MgCl ₂ 1,8 mM	■ KH ₂ PO ₄ 20 mM	■ Genta 50 µg/mL
■ MgCl ₂ 1,8 mM	■ Hepes 5 mM	■ MgSO ₄ 5 mM	■ Glutamine 1 %
■ Hepes 10 mM	■ Glucose 10 mM	■ CaCl ₂ 0,08 mM	■ Hepes 10 mM
■ Glucose 11 mM	■ BSA 1 g/L	■ EGTA 0,5 mM	■ NaHCO ₃ 4 mM
■ pH 7,4	■ Taurine 20 mM	■ Créatine 5 mM	■ BSA 5 %
■ Osm 323 mOsm	■ pH 7,4	■ Na ₂ ATP 5 mM	■ Blebbi 25 µM
	■ Osm 330 mOsm	■ Taurine 20 mM	
		■ Hepes 10 mM	
		■ Glucose 10 mM	
		■ BSA 4 g/L	
		■ pH 7,4	
		■ Osm 400m Osm	

BSA : Bovine Serum Albumin

Blebbi : Blebbistatine

Genta : Gentamycine

Insul : Insuline

Osm : Osmolarité

KGlu : K-glutamate

II- Annexe 2 : Composition des milieux utilisés lors de l'isolement des fibres musculaires squelettiques issues du FDB de souris

Krebs	
■ NaCl	124 mM
■ KCl	5,9 mM
■ CaCl ₂	1,5 mM
■ MgCl ₂	1,2 mM
■ Hepes	11,5 mM
■ Glucose	11,5 mM
■ pH	7,4
■ Osm	287 mOsm

III-Annexe 3 : Composition des milieux utilisés lors des expériences de marquage des cardiomyocytes ou des cœurs de souris

Milieu riche en potassium		Tampon phosphate		PBS	
■ KCl	25 mM	■ NaCl	270 mM	■ NaCl	130 mM
■ KGlu	120 mM	■ NaH ₂ PO ₄	30 mM	■ KCl	2.07 mM
■ EGTA	2 mM	■ Na m-périodate	10 mM	■ Na ₂ HPO ₄	1.5 mM
■ CaCl ₂	1 mM	■ L-Lysine	75 mM	■ KH ₂ PO ₄	8 mM
■ MgCl ₂	2 mM	■ PAF	4 %	■ pH	7.4
■ Hepes	10 mM	■ pH	7.4	■ Osm	340 mOsm
■ Glucose	10 mM				
■ pH	7.4				
■ Osm	321 mOsm				

PAF : Paraformaldéhyde

IV- Annexe 4 : Composition du milieu dépolarisant utilisé lors des mesures de libération globale de calcium dans les fibres musculaires squelettiques issues des FDB murins

Krebs 100mM K ⁺	
■ NaCl	30 mM
■ KCl	100 mM
■ CaCl ₂	1,5 mM
■ MgCl ₂	1,2 mM
■ Hepes	11,5 mM
■ Glucose	11,5 mM
■ pH	7,4
■ Osm	287 mOsm

Bibliographie

Bibliographie

-A-

Adamo, C. M., Dai, D. F., Percival, J. M., Minami, E., Willis, M. S., Patrucco, E., Froehner, S. C., & Beavo, J. A. 2010. Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 107 (44): 19079-19083.

Allen, D. G., Gervasio, O. L., Yeung, E. W., & Whitehead, N. P. 2010a. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. Can.J.Physiol Pharmacol., 88 (2): 83-91.

Allen, D. G. & Whitehead, N. P. 2011. Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? Int.J.Biochem.Cell Biol., 43 (3): 290-294.

Allen, D. G., Zhang, B. T., & Whitehead, N. P. 2010b. Stretch-induced membrane damage in muscle: comparison of wild-type and *mdx* mice. Adv.Exp.Med.Biol., 682: 297-313.

Apell, H. J. & Karlish, S. J. 2001. Functional properties of Na,K-ATPase, and their structural implications, as detected with biophysical techniques. J.Membr.Biol., 180 (1): 1-9.

Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, I., Ozawa, E., & Sugita, H. 1988. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. Nature, 333 (6176): 861-863.

Ayettey, A. S. & Navaratnam, V. 1978. The T-tubule system in the specialized and general myocardium of the rat. J.Anat., 127 (Pt 1): 125-140.

-B-

Backman, E., Nylander, E., Johansson, I., Henriksson, K. G., & Tagesson, C. 1988. Selenium and vitamin E treatment of Duchenne muscular dystrophy: no effect on muscle function. Acta Neurol.Scand., 78 (5): 429-435.

- Bahler, R. C., Mohyuddin, T., Finkelhor, R. S., & Jacobs, I. B.** 2005. Contribution of Doppler tissue imaging and myocardial performance index to assessment of left ventricular function in patients with Duchenne's muscular dystrophy. J.Am.Soc.Echocardiogr., 18 (6): 666-673.
- Balghi, H., Sebillé, S., Constantin, B., Patri, S., Thoreau, V., Mondin, L., Mok, E., Kitzis, A., Raymond, G., & Cognard, C.** 2006a. Mini-dystrophin expression down-regulates overactivation of G protein-mediated IP3 signaling pathway in dystrophin-deficient muscle cells. J.Gen.Physiol., 127 (2): 171-182.
- Balghi, H., Sebillé, S., Mondin, L., Cantereau, A., Constantin, B., Raymond, G., & Cognard, C.** 2006b. Mini-dystrophin expression down-regulates IP3-mediated calcium release events in resting dystrophin-deficient muscle cells. J.Gen.Physiol., 128 (2): 219-230.
- Balser, J. R.** 1999. Structure and function of the cardiac sodium channels. Cardiovasc.Res., 42 (2): 327-338.
- Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., & Romey, G.** 1996. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. Nature, 384 (6604): 78-80.
- BAROLDI, G., MANTERO, O., & SCOMAZZONI, G.** 1956. The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts. Circ.Res., 4 (2): 223-229.
- Barton, E. R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., & Sweeney, H. L.** 2002. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in *mdx* mice. J.Cell Biol., 157 (1): 137-148.
- Baudino, T. A., Carver, W., Giles, W., & Borg, T. K.** 2006. Cardiac fibroblasts: friend or foe? Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol., 291 (3): H1015-H1026.
- Baylor, S. M., Hollingworth, S., & Chandler, W. K.** 2002. Comparison of simulated and measured calcium sparks in intact skeletal muscle fibers of the frog. J.Gen.Physiol., 120 (3): 349-368.
- Berridge, M. J. & Irvine, R. F.** 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature, 312 (5992): 315-321.

- Bers, D. M.** 2004. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. J.Mol.Cell Cardiol., 37 (2): 417-429.
- Bhattacharyya, K. B., Basu, N., Ray, T. N., & Maity, B.** 1997. Profile of electrocardiographic changes in Duchenne muscular dystrophy. J.Indian Med.Assoc., 95 (2): 40-2, 47.
- Bia, B. L., Cassidy, P. J., Young, M. E., Rafael, J. A., Leighton, B., Davies, K. E., Radda, G. K., & Clarke, K.** 1999. Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. J.Mol.Cell Cardiol., 31 (10): 1857-1862.
- Bies, R. D., Caskey, C. T., & Fenwick, R.** 1992. An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. J.Clin.Invest, 90 (2): 666-672.
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C.** 1986. Atomic force microscope. Phys.Rev.Lett., 56 (9): 930-933.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E.** 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. Physiol Rev., 82(2): 291-329.
- Bogdanovich, S., Krag, T. O., Barton, E. R., Morris, L. D., Whittemore, L. A., Ahima, R. S., & Khurana, T. S.** 2002. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. Nature, 420(6914): 418-421.
- Boland, B. J., Silbert, P. L., Groover, R. V., Wollan, P. C., & Silverstein, M. D.** 1996. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. Pediatr.Neurol., 14(1): 7-12.
- Bonilla, E., Fischbeck, K., & Schotland, D. L.** 1981. Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. Am.J.Pathol., 104(2): 167-173.
- Bostick, B., Yue, Y., & Duan, D.** 2010. Gender influences cardiac function in the *mdx* model of Duchenne cardiomyopathy. Muscle Nerve, 42(4): 600-603.
- Brette, F. & Orchard, C.** 2003. T-Tubule Function in Mammalian Cardiac Myocytes. Circ. Res. 92; 1182-1192.

Brette, F. & Orchard, C. 2007. Resurgence of cardiac t-tubule research. Physiology.(Bethesda.), 22: 167-173.

Brillantes, A. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasova, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., & Marks, A. R. 1994. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. Cell, 77(4): 513-523.

Brittsan, A. G. & Kranias, E. G. 2000. Phospholamban and cardiac contractile function. J.Mol.Cell Cardiol., 32(12): 2131-2139.

Brockmeier, K., Schmitz, L., von Moers, A., Koch, H., Vogel, M., & Bein, G. 1998. X-chromosomal (p21) muscular dystrophy and left ventricular diastolic and systolic function. Pediatr.Cardiol., 19(2): 139-144.

Buetler, T. M., Renard, M., Offord, E. A., Schneider, H., & Ruegg, U. T. 2002. Green tea extract decreases muscle necrosis in *mdx* mice and protects against reactive oxygen species. Am.J.Clin.Nutr., 75(4): 749-753.

Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., & Moore, K. J. 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 81(4): 1189-1192.

Burdyga, T. & Wray, S. 2005. Action potential refractory period in ureter smooth muscle is set by Ca sparks and BK channels. Nature, 436(7050): 559-562.

Byers, T. J., Kunkel, L. M., & Watkins, S. C. 1991. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. J.Cell Biol., 115(2): 411-421.

-C-

Campbell, K. P. 1995. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. Cell, 80(5): 675-679.

Cannell, M. B., Cheng, H., & Lederer, W. J. 1994. Spatial non-uniformities in $[Ca^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. Biophys.J., 67(5): 1942-1956.

Carozzi, A. J., Ikonen, E., Lindsay, M. R., & Parton, R. G. 2000. Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. Traffic., 1(4): 326-341.

- Chandler, W. K. & Schneider, M. F.** 1976. Time-course of potential spread along a skeletal muscle fiber under voltage clamp. J.Gen.Physiol, 67(2): 165-184.
- Chen, J. & Chien, K. R.** 1999. Complexity in simplicity: monogenic disorders and complex cardiomyopathies. J.Clin.Invest, 103(11): 1483-1485.
- Chenard, A. A., Becane, H. M., Tertrain, F., de Kermadec, J. M., & Weiss, Y. A.** 1993. Ventricular arrhythmia in Duchenne muscular dystrophy: prevalence, significance and prognosis. Neuromuscul.Disord., 3(3): 201-206.
- Cheng, H. & Lederer, W. J.** 2008. Calcium sparks. Physiol Rev., 88(4): 1491-1545.
- Cheng, H., Lederer, W. J., & Cannell, M. B.** 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. Science, 262(5134): 740-744.
- Choi, H. S., Trafford, A. W., & Eisner, D. A.** 2000. Measurement of calcium entry and exit in quiescent rat ventricular myocytes. Pflugers Arch., 440(4): 600-608.
- Chou, J. J., Li, S., Klee, C. B., & Bax, A.** 2001. Solution structure of Ca(2+)-calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. Nat.Struct.Biol., 8(11): 990-997.
- Cohen, A. W., Combs, T. P., Scherer, P. E., & Lisanti, M. P.** 2003. Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. Am.J.Physiol Endocrinol.Metab, 285(6): E1151-E1160.
- Constantin, B., Sebille, S., & Cognard, C.** 2006. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. J.Muscle Res.Cell Motil., 27(5-7): 375-386.
- Cooper, B. J.** 1989. Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Br.Med.Bull., 45(3): 703-718.
- Coraboeuf, E., Deroubaix, E., & Coulombe, A.** 1979. Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. Am.J.Physiol, 236(4): H561-H567.
- Culligan, K. & Ohlendieck, K.** 2002. Diversity of the Brain Dystrophin-Glycoprotein Complex. J.Biomed.Biotechnol., 2(1): 31-36.

-D-

- D'Orsogna, L., O'Shea, J. P., & Miller, G.** 1988. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy. Pediatr.Cardiol., 9(4): 205-213.
- Davies, K. E. & Nowak, K. J.** 2006. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. Nat.Rev.Mol.Cell Biol., 7(10): 762-773.
- De La, P. S., Morin, S., & Koenig, J.** 1999. Characteristics of skeletal muscle in *mdx* mutant mice. Int.Rev.Cytol., 191: 99-148.
- Deconinck, A. E., Rafael, J. A., Skinner, J. A., Brown, S. C., Potter, A. C., Metzinger, L., Watt, D. J., Dickson, J. G., Tinsley, J. M., & Davies, K. E.** 1997. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. Cell, 90(4): 717-727.
- Deconinck, N., Ragot, T., Marechal, G., Perricaudet, M., & Gillis, J. M.** 1996. Functional protection of dystrophic mouse (*mdx*) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 93(8): 3570-3574.
- Delaughter, M. C., Taffet, G. E., Fiorotto, M. L., Entman, M. L., & Schwartz, R. J.** 1999. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. FASEB J., 13(14): 1923-1929.
- Demaurex, N., Schlegel, W., Varnai, P., Mayr, G., Lew, D. P., & Krause, K. H.** 1992. Regulation of Ca²⁺ influx in myeloid cells. Role of plasma membrane potential, inositol phosphates, cytosolic free [Ca²⁺], and filling state of intracellular Ca²⁺ stores. J.Clin.Invest, 90(3): 830-839.
- Deval, E., Levitsky, D. O., Marchand, E., Cantereau, A., Raymond, G., & Cognard, C.** 2002. Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchange in human myotubes: intracellular calcium rises in response to external sodium depletion are enhanced in DMD. Neuromuscul.Disord., 12(7-8): 665-673.
- Diss, J. K., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. B.** 2004. Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. Eur.Biophys.J., 33(3): 180-193.
- Dominguez, J. N., de la, R. A., Navarro, F., Franco, D., & Aranega, A. E.** 2008. Tissue distribution and subcellular localization of the cardiac sodium channel during mouse heart development. Cardiovasc.Res., 78(1): 45-52.

Duan, D., Ye, L., Britton, F., Horowitz, B., & Hume, J. R. 2000. A novel anionic inward rectifier in native cardiac myocytes. Circ.Res., 86(4): E63-E71.

Duboc, D., Meune, C., Lerebours, G., Devaux, J. Y., Vaksman, G., & Becane, H. M. 2005. Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. J.Am.Coll.Cardiol., 45(6): 855-857.

Duguez, S., Bartoli, M., & Richard, I. 2006. Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? FEBS J., 273(15): 3427-3436.

Dunckley, M. G., Manoharan, M., Villiet, P., Eperon, I. C., & Dickson, G. 1998. Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured *Mdx* muscle cells by antisense oligoribonucleotides. Hum.Mol.Genet., 7(7): 1083-1090.

-E-

Egan, T. M., Noble, D., Noble, S. J., Powell, T., Spindler, A. J., & Twist, V. W. 1989. Sodium-calcium exchange during the action potential in guinea-pig ventricular cells. J.Physiol., 411: 639-661.

Ehmsen, J., Poon, E., & Davies, K. 2002. The dystrophin-associated protein complex. J.Cell Sci., 115(Pt 14): 2801-2803.

Ellis-Davies, G. C. & Kaplan, J. H. 1994. Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca^{2+} with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 91(1): 187-191.

Emery, A. E. 1993. Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease. Neuromuscul.Disord., 3(4): 263-266.

Emery, A. E. & Emery, M. L. 1993. Edward Meryon (1809-1880) and muscular dystrophy. J.Med.Genet., 30(6): 506-511.

Engert, J. C., Berglund, E. B., & Rosenthal, N. 1996. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. J.Cell Biol., 135(2): 431-440.

Ervasti, J. M. & Campbell, K. P. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. J.Cell Biol., 122(4): 809-823.

Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., & Campbell, K. P. 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. Nature, 345(6273): 315-319.

Eyden, B. P., Watson, R. J., Harris, M., & Howell, A. 1986. Intralobular stromal fibroblasts in the resting human mammary gland: ultrastructural properties and intercellular relationships. J.Submicrosc.Cytol., 18(2): 397-408.

-F-

Fabiato, A. 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am.J.Physiol., 245(1): C1-14.

Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., Marks, A. R., & Lacampagne, A. 2010. Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 107(4): 1559-1564.

Fill, M. & Copello, J. A. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. Physiol Rev., 82(4): 893-922.

Finsterer, J. 2006. Cardiopulmonary support in duchenne muscular dystrophy. Lung, 184(4): 205-215.

Finsterer, J. & Stollberger, C. 2003. The heart in human dystrophinopathies. Cardiology, 99(1): 1-19.

Fougerousse, F., Durand, M., Suel, L., Pourquie, O., Delezoide, A. L., Romero, N. B., Abitbol, M., & Beckmann, J. S. 1998. Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. Genomics, 48(2): 145-156.

-G-

Gailly, P., Boland, B., Himpens, B., Casteels, R., & Gillis, J. M. 1993. Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (*mdx*) mice. Cell Calcium, 14(6): 473-483.

Galbiati, F., Razani, B., & Lisanti, M. P. 2001. Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. Trends Mol.Med., 7(10): 435-441.

- Gaschen, F. P., Hoffman, E. P., Gorospe, J. R., Uhl, E. W., Senior, D. F., Cardinet, G. H., III, & Pearce, L. K.** 1992. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. J.Neurol.Sci., 110(1-2): 149-159.
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I.** 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. Cell Calcium, 27(2): 97-106.
- Ghazi, A., Berrier, C., Ajouz, B., & Besnard, M.** 1998. Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. Biochimie, 80(5-6): 357-362.
- Goemans, N. M., Tulinius, M., van den Akker, J. T., Burm, B. E., Ekhart, P. F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A. A., Platenburg, G. J., Sipkens, J. A., Sitsen, J. M., Aartsma-Rus, A., van Ommen, G. J., Buyse, G., Darin, N., Verschuuren, J. J., Campion, G. V., de Kimpe, S. J., & van Deutekom, J. C.** 2011. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. N.Engl.J.Med., 364(16): 1513-1522.
- Gordienko, D. V. & Bolton, T. B.** 2002. Crosstalk between ryanodine receptors and IP(3) receptors as a factor shaping spontaneous Ca(2+)-release events in rabbit portal vein myocytes. J.Physiol, 542(Pt 3): 743-762.
- Gorelik, J., Gu, Y., Spohr, H. A., Shevchuk, A. I., Lab, M. J., Harding, S. E., Edwards, C. R., Whitaker, M., Moss, G. W., Benton, D. C., Sanchez, D., Darszon, A., Vodyanoy, I., Klenerman, D., & Korchev, Y. E.** 2002. Ion channels in small cells and subcellular structures can be studied with a smart patch-clamp system. Biophys.J., 83(6): 3296-3303.
- Gorelik, J., Yang, L. Q., Zhang, Y., Lab, M., Korchev, Y., & Harding, S. E.** 2006. A novel Z-groove index characterizing myocardial surface structure. Cardiovasc.Res., 72(3): 422-429.
- Gourdie, R. G., Wei, Y., Kim, D., Klatt, S. C., & Mikawa, T.** 1998. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 95(12): 6815-6818.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J. C., Garcia, L., & Danos, O.** 2004. [An opening in Duchenne muscular dystrophy: persistent therapeutic rescue of dystrophin by vectorized antisense mediated exon skipping in *mdx* mice]. Med.Sci.(Paris), 20(12): 1163-1165.

Green, D. R. & Reed, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science, 281(5381): 1309-1312.

Grounds, M. D. & McGeachie, J. K. 1992. Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic *mdx* mice: an autoradiographic study. Muscle Nerve, 15(5): 580-586.

Gu, Y., Gorelik, J., Spohr, H. A., Shevchuk, A., Lab, M. J., Harding, S. E., Vodyanoy, I., Klenerman, D., & Korchev, Y. E. 2002. High-resolution scanning patch-clamp: new insights into cell function. FASEB J., 16(7): 748-750.

-H-

Haak, L. L., Song, L. S., Molinski, T. F., Pessah, I. N., Cheng, H., & Russell, J. T. 2001. Sparks and puffs in oligodendrocyte progenitors: cross talk between ryanodine receptors and inositol trisphosphate receptors. J.Neurosci., 21(11): 3860-3870.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch., 391(2): 85-100.

Hansma, P. K., Drake, B., Marti, O., Gould, S. A., & Prater, C. B. 1989. The scanning ion-conductance microscope. Science, 243(4891): 641-643.

Haslett, J. N., Sanoudou, D., Kho, A. T., Bennett, R. R., Greenberg, S. A., Kohane, I. S., Beggs, A. H., & Kunkel, L. M. 2002. Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 99(23): 15000-15005.

Hirai, S., Kawasaki, H., Yaniv, M., & Suzuki, K. 1991. Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. FEBS Lett., 287(1-2): 57-61.

Hiraoka, M. & Kawano, S. 1989. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. J.Physiol, 410: 187-212.

Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., & Kunkel, L. M. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell, 51(6): 919-928.

Huser, J. & Blatter, L. A. 1997. Elementary events of agonist-induced Ca²⁺ release in vascular endothelial cells. Am.J.Physiol, 273(5 Pt 1): C1775-C1782.

Hutter, O. F., Burton, F. L., & Bovell, D. L. 1991. Mechanical properties of normal and *mdx* mouse sarcolemma: bearing on function of dystrophin. J.Muscle Res.Cell Motil., 12(6): 585-589.

-I-

Imbert, N., Vandebrouck, C., Constantin, B., Duport, G., Guillou, C., Cognard, C., & Raymond, G. 1996. Hypoosmotic shocks induce elevation of resting calcium level in Duchenne muscular dystrophy myotubes contracting in vitro. Neuromuscul.Disord., 6(5): 351-360.

Imbert, N., Vandebrouck, C., Duport, G., Raymond, G., Hassoni, A. A., Constantin, B., Cullen, M. J., & Cognard, C. 2001. Calcium currents and transients in co-cultured contracting normal and Duchenne muscular dystrophy human myotubes. J.Physiol, 534(Pt. 2): 343-355.

Inesi, G. & Sagara, Y. 1994. Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. J.Membr.Biol., 141(1): 1-6.

Irisawa, H., Brown, H. F., & Giles, W. 1993. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. Physiol Rev., 73(1): 197-227.

Isaeva, E. V. & Shirokova, N. 2003. Metabolic regulation of Ca²⁺ release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres. J.Physiol, 547(Pt 2): 453-462.

Isenberg, G. & Klockner, U. 1982. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". Pflugers Arch., 395(1): 6-18.

-J-

Jefferies, JL, B W Eidem, J W Belmont, W J Craigen, S M Ware, S D Fernbach, S R Neish, E O Smith, J A Towbin, 2005, Genetic predictors and remodeling of dilated cardiomyopathy in muscular dystrophy: *Circulation*, v. 112, p. 2799-2804.

Jentsch, TJ, V Stein, F Weinreich, A A Zdebik, 2002, Molecular structure and physiological function of chloride channels: *Physiol Rev.*, v. 82, p. 503-568.

-K-

- Kabaeva, Z., Zhao, M., & Michele, D. E.** 2008. Blebbistatin extends culture life of adult mouse cardiac myocytes and allows efficient and stable transgene expression. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol, 294(4): H1667-H1674.
- Kaupp, U. B. & Seifert, R.** 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. Annu.Rev.Physiol, 63: 235-257.
- Kawai, H., Adachi, K., Kimura, C., Nishiuchi, T., Yamasaki, Y., Tsutsui, Y., & Saito, S.** 1990. Secretion and clinical significance of atrial natriuretic peptide in patients with muscular dystrophy. Arch.Neurol., 47(8): 900-904.
- KISCH, B.** 1951. Physiological aspects of electron microscopy of the heart. Exp.Med.Surg., 9(2-4): 333-373.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M.** 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell, 50(3): 509-517.
- Korchev, Y. E., Bashford, C. L., Milovanovic, M., Vodyanoy, I., & Lab, M. J.** 1997a. Scanning ion conductance microscopy of living cells. Biophys.J., 73(2): 653-658.
- Korchev, Y. E., Milovanovic, M., Bashford, C. L., Bennett, D. C., Sviderskaya, E. V., Vodyanoy, I., & Lab, M. J.** 1997b. Specialized scanning ion-conductance microscope for imaging of living cells. J.Microsc., 188(Pt 1): 17-23.
- Korchev, Y. E., Negulyaev, Y. A., Edwards, C. R., Vodyanoy, I., & Lab, M. J.** 2000. Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell. Nat.Cell Biol., 2(9): 616-619.
- Kornegay, J. N., Sharp, N. J., Bogan, D. J., Van Camp, S. D., Metcalf, J. R., & Schueler, R. O.** 1994. Contraction tension and kinetics of the peroneus longus muscle in golden retriever muscular dystrophy. J.Neurol.Sci., 123(1-2): 100-107.
- Kostin, S., Scholz, D., Shimada, T., Maeno, Y., Mollnau, H., Hein, S., & Schaper, J.** 1998. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. Cell Tissue Res., 294(3): 449-460.

- Lacampagne, A., Fauconnier, J., & Richard, S.** 2008. [Ryanodine receptor and heart disease]. *Med.Sci.(Paris)*, 24(4): 399-405.
- Lacolley et al.**, 2007. *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*. Editions John Libbey Eurotext. Nouvelle édition.
- Lamb, G. D. & Cellini, M. A.** 1999. High intracellular [Ca²⁺] alters sarcoplasmic reticulum function in skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J.Physiol*, 519 Pt 3: 815-827.
- Leite, M. F., Thrower, E. C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A. M., Ehrlich, B. E., & Nathanson, M. H.** 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100(5): 2975-2980.
- Liberona, J. L., Powell, J. A., Shenoi, S., Petherbridge, L., Caviedes, R., & Jaimovich, E.** 1998. Differences in both inositol 1,4,5-trisphosphate mass and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors between normal and dystrophic skeletal muscle cell lines. *Muscle Nerve*, 21(7): 902-909.
- Lin, P., Yao, Y., Hofmeister, R., Tsien, R. Y., & Farquhar, M. G.** 1999. Overexpression of CALNUP (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi. *J.Cell Biol.*, 145(2): 279-289.
- Lipp, P., Egger, M., & Niggli, E.** 2002. Spatial characteristics of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release events triggered by L-type Ca²⁺ current and Na⁺ current in guinea-pig cardiac myocytes. *J.Physiol*, 542(Pt 2): 383-393.
- Lipp, P., Laine, M., Tovey, S. C., Burrell, K. M., Berridge, M. J., Li, W., & Bootman, M. D.** 2000. Functional InsP₃ receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr.Biol.*, 10(15): 939-942.
- Lipp, P., Mechmann, S., & Pott, L.** 1987. Effects of calcium release from sarcoplasmic reticulum on membrane currents in guinea pig atrial cardioballs. *Pflugers Arch.*, 410(1-2): 121-131.
- Lipp, P. & Niggli, E.** 1994. Modulation of Ca²⁺ release in cultured neonatal rat cardiac myocytes. Insight from subcellular release patterns revealed by confocal microscopy. *Circ.Res.*, 74(5): 979-990.

Liu, M., Yue, Y., Harper, S. Q., Grange, R. W., Chamberlain, J. S., & Duan, D. 2005. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young *mdx* muscle from contraction-induced injury. Mol.Ther., 11(2): 245-256.

Long, C. S. 1996. Autocrine and Paracrine Regulation of Myocardial Cell Growth in Vitro The TGFbeta Paradigm. Trends Cardiovasc.Med., 6(7): 217-226.

Lopatin, A. N. & Nichols, C. G. 2001. Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). J.Mol.Cell Cardiol., 33(4): 625-638.

Louch, W. E., Bito, V., Heinzl, F. R., Macianskiene, R., Vanhaecke, J., Flameng, W., Mubagwa, K., & Sipido, K. R. 2004. Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules-a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. Cardiovasc.Res., 62(1): 63-73.

Louch, W. E., Sejersted, O. M., & Swift, F. 2010. There goes the neighborhood: pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca²⁺ handling. J.Biomed.Biotechnol., 2010: 503906.

Lu, Q. L., Yokota, T., Takeda, S., Garcia, L., Muntoni, F., & Partridge, T. 2011. The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. Mol.Ther., 19(1): 9-15.

Lukyanenko, V., Subramanian, S., Gyorke, I., Wiesner, T. F., & Gyorke, S. 1999. The role of luminal Ca²⁺ in the generation of Ca²⁺ waves in rat ventricular myocytes. J.Physiol., 518 (Pt 1): 173-186.

Lyon, A. R., MacLeod, K. T., Zhang, Y., Garcia, E., Kanda, G. K., Lab, M. J., Korchev, Y. E., Harding, S. E., & Gorelik, J. 2009. Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 106(16): 6854-6859.

-M-

Mackenzie, L., Bootman, M. D., Laine, M., Berridge, M. J., Thuring, J., Holmes, A., Li, W. H., & Lipp, P. 2002. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca(2+) signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. J.Physiol., 541(Pt 2): 395-409.

- Marchand, E., Constantin, B., Balghi, H., Claudepierre, M. C., Cantereau, A., Magaud, C., Mouzou, A., Raymond, G., Braun, S., & Cognard, C.** 2004. Improvement of calcium handling and changes in calcium-release properties after mini- or full-length dystrophin forced expression in cultured skeletal myotubes. Exp.Cell Res., 297(2): 363-379.
- Markham, W. O.** 1861. Remarks on the Cause of Closure of the Valves of the Heart. Med.Chir Trans., 44: 43-50.
- Marks, A. R.** 2000. Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. Circ.Res., 87(1): 8-11.
- McArdle, A., Edwards, R. H., & Jackson, M. J.** 1994. Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient *mdx* mouse. Muscle Nerve, 17(12): 1378-1384.
- McNally, E. M.** 2007. New approaches in the therapy of cardiomyopathy in muscular dystrophy. Annu.Rev.Med., 58: 75-88.
- Mendell, J. R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., Malik, V., Coley, B., Clark, K. R., Li, J., Xiao, X., Samulski, J., McPhee, S. W., Samulski, R. J., & Walker, C. M.** 2010. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. N.Engl.J.Med., 363(15): 1429-1437.
- Mendell, J. R., Moxley, R. T., Griggs, R. C., Brooke, M. H., Fenichel, G. M., Miller, J. P., King, W., Signore, L., Pandya, S., Florence, J., & .** 1989. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. N.Engl.J.Med., 320(24): 1592-1597.
- Merlini, L., Cicognani, A., Malaspina, E., Gennari, M., Gnudi, S., Talim, B., & Franzoni, E.** 2003. Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. Muscle Nerve, 27(2): 222-227.
- Miller, G., D'Orsogna, L., & O'Shea, J. P.** 1989. Autonomic function and the sinus tachycardia of Duchenne muscular dystrophy. Brain Dev., 11(4): 247-250.
- Miragoli, M., Moshkov, A., Novak, P., Shevchuk, A., Nikolaev, V. O., El Hamamsy, I., Potter, C. M., Wright, P., Kadir, S. H., Lyon, A. R., Mitchell, J. A., Chester, A. H., Klenerman, D., Lab, M. J., Korchev, Y. E., Harding, S. E., & Gorelik, J.** 2011. Scanning

ion conductance microscopy: a convergent high-resolution technology for multi-parametric analysis of living cardiovascular cells. J.R.Soc.Interface, 8(60): 913-925.

Monaco, A. P. & Kunkel, L. M. 1988. Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. Adv.Hum.Genet., 17: 61-98.

Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., & Kunkel, L. M. 1986. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature, 323(6089): 646-650.

Mondin, L., Balghi, H., Constantin, B., Cognard, C., & Sebille, S. 2009. Negative modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression prevents dystrophin-deficient muscle cells death. Am.J.Physiol Cell Physiol, 297(5): C1133-C1145.

Monteith, G. R., Wanigasekara, Y., & Roufogalis, B. D. 1998. The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. J.Pharmacol.Toxicol.Methods, 40(4): 183-190.

Mostacciuolo, M. L., Lombardi, A., Cambissa, V., Danieli, G. A., & Angelini, C. 1987. Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy. Hum.Genet., 75(3): 217-220.

Mulle, C., Benoit, P., Pinset, C., Roa, M., & Changeux, J. P. 1988. Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 85(15): 5728-5732.

Myoinfo 2011. Avancées dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Département d'information sur les maladies neuromusculaires de l'AFM, Évry.

-N-

Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., Uberfuhr, P., & Steinbeck, G. 1996. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. Circulation, 93(1): 168-177.

Nakamura, A., Yoshida, K., Takeda, S., Dohi, N., & Ikeda, S. 2002. Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of *mdx* mice. FEBS Lett., 520(1-3): 18-24.

Neher, E. & Sakmann, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature, 260(5554): 799-802.

Neher, E., Sakmann, B., & Steinbach, J. H. 1978. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. Pflugers Arch., 375(2): 219-228.

Nigro, G., Comi, L. I., Politano, L., & Bain, R. J. 1990. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. Int.J.Cardiol., 26(3): 271-277.

Nikolaev, V. O., Moshkov, A., Lyon, A. R., Miragoli, M., Novak, P., Paur, H., Lohse, M. J., Korchev, Y. E., Harding, S. E., & Gorelik, J. 2010. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. Science, 327(5973): 1653-1657.

Nishimura, T., Yanagisawa, A., Sakata, H., Sakata, K., Shimoyama, K., Ishihara, T., Yoshino, H., & Ishikawa, K. 2001. Thallium-201 single photon emission computed tomography (SPECT) in patients with duchenne's progressive muscular dystrophy: a histopathologic correlation study. Jpn.Circ.J., 65(2): 99-105.

Novak, P., Li, C., Shevchuk, A. I., Stepanyan, R., Caldwell, M., Hughes, S., Smart, T. G., Gorelik, J., Ostanin, V. P., Lab, M. J., Moss, G. W., Frolenkov, G. I., Klenerman, D., & Korchev, Y. E. 2009. Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. Nat.Methods, 6(4): 279-281.

-O-

Ohlendieck, K. & Campbell, K. P. 1991. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from *mdx* mice. J.Cell Biol., 115(6): 1685-1694.

Oosthoek, P. W., Viragh, S., Lamers, W. H., & Moorman, A. F. 1993a. Immunohistochemical delineation of the conduction system. II: The atrioventricular node and Purkinje fibers. Circ.Res., 73(3): 482-491.

Oosthoek, P. W., Viragh, S., Mayen, A. E., van Kempen, M. J., Lamers, W. H., & Moorman, A. F. 1993b. Immunohistochemical delineation of the conduction system. I: The sinoatrial node. Circ.Res., 73(3): 473-481.

Ozawa, E. 2010. Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. Proc.Jpn.Acad.Ser.B Phys.Biol.Sci., 86(8): 798-821.

-P-

Paria, B. C., Malik, A. B., Kwiatek, A. M., Rahman, A., May, M. J., Ghosh, S., & Tirupathi, C. 2003. Tumor necrosis factor-alpha induces nuclear factor-kappaB-dependent TRPC1 expression in endothelial cells. J.Biol.Chem., 278(39): 37195-37203.

Passaquin, A. C., Renard, M., Kay, L., Challet, C., Mokhtarian, A., Wallimann, T., & Rugg, U. T. 2002. Creatine supplementation reduces skeletal muscle degeneration and enhances mitochondrial function in *mdx* mice. Neuromuscul.Disord., 12(2): 174-182.

Perloff, J. K., Roberts, W. C., de, L. A., Jr., & O'Doherty, D. 1967. The distinctive electrocardiogram of Duchenne's progressive muscular dystrophy. An electrocardiographic-pathologic correlative study. Am.J.Med., 42(2): 179-188.

Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., & Sweeney, H. L. 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 90(8): 3710-3714.

Pogwizd, S. M. & Bers, D. M. 2004. Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure. Trends Cardiovasc.Med., 14(2): 61-66.

Powell, J. A., Carrasco, M. A., Adams, D. S., Drouet, B., Rios, J., Muller, M., Estrada, M., & Jaimovich, E. 2001. IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. J.Cell Sci., 114(Pt 20): 3673-3683.

Powell, J. A., Molgo, J., Adams, D. S., Colasante, C., Williams, A., Bohlen, M., & Jaimovich, E. 2003. IP3 receptors and associated Ca²⁺ signals localize to satellite cells and to components of the neuromuscular junction in skeletal muscle. J.Neurosci., 23(23): 8185-8192.

Proenza, C., O'Brien, J., Nakai, J., Mukherjee, S., Allen, P. D., & Beam, K. G. 2002. Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the alpha(1S) (Ca(V)1.1) II-III loop. J.Biol.Chem., 277(8): 6530-6535.

Protasi, F. 2002. Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. Front Biosci., 7: d650-d658.

Pulido, S. M., Passaquin, A. C., Leijendekker, W. J., Challet, C., Wallimann, T., & Ruegg, U. T. 1998. Creatine supplementation improves intracellular Ca²⁺ handling and survival in *mdx* skeletal muscle cells. FEBS Lett., 439(3): 357-362.

Putman, C. A., van der Werf, K. O., de Grooth, B. G., van Hulst, N. F., & Greve, J. 1994. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy. Biophys.J., 67(4): 1749-1753.

-Q-

Quinlan, J.G., H S Hahn, B L Wong, J N Lorenz, A S Wenisch, L S Levin, 2004, Evolution of the *mdx* mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings: Neuromuscul.Disord., v. 14, p. 491-496.

-R-

Ragusa, R. J., Chow, C. K., & Porter, J. D. 1997. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul.Disord., 7(6-7): 379-386.

Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M., & Pozzan, T. 1992. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. Nature, 358(6384): 325-327.

Rowland, L. P. 1976. Pathogenesis of muscular dystrophies. Arch.Neurol., 33(5): 315-321.

-S-

Saito, T., Takenaka, M., Miyai, I., Yamamoto, Y., Matsumura, T., Nozaki, S., & Kang, J. 2001. Coagulation and fibrinolysis disorder in muscular dystrophy. Muscle Nerve, 24(3): 399-402.

Sakamoto, M., Yuasa, K., Yoshimura, M., Yokota, T., Ikemoto, T., Suzuki, M., Dickson, G., Miyagoe-Suzuki, Y., & Takeda, S. 2002. Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into *mdx* mice as a transgene. Biochem.Biophys.Res.Comm., 293(4): 1265-1272.

Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J. L., Galvez, B. G., Barthelemy, I., Perani, L., Mantero, S., Guttinger, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., Cusella De Angelis, M. G., Torrente, Y., Bordignon, C., Bottinelli, R., & Cossu, G. 2006. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. Nature, 444(7119): 574-579.

Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M. A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M. G., Campbell, K. P., Bottinelli, R., & Cossu, G. 2003. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. Science, 301(5632): 487-492.

Sanchez, D., Anand, U., Gorelik, J., Benham, C. D., Bountra, C., Lab, M., Klenerman, D., Birch, R., Anand, P., & Korchev, Y. 2007. Localized and non-contact mechanical stimulation of dorsal root ganglion sensory neurons using scanning ion conductance microscopy. J.Neurosci.Methods, 159(1): 26-34.

Sanguinetti, M. C. & Jurkiewicz, N. K. 1990. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. J.Gen.Physiol, 96(1): 195-215.

Santana, L. F., Cheng, H., Gomez, A. M., Cannell, M. B., & Lederer, W. J. 1996. Relation between the sarcolemmal Ca²⁺ current and Ca²⁺ sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. Circ.Res., 78(1): 166-171.

Sarma, S., Li, N., van Oort, R. J., Reynolds, C., Skapura, D. G., & Wehrens, X. H. 2010. Genetic inhibition of PKA phosphorylation of RyR2 prevents dystrophic cardiomyopathy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 107(29): 13165-13170.

Sebille, S., Cantereau, A., Vandebrouck, C., Balghi, H., Constantin, B., Raymond, G., & Cognard, C. 2005. Calcium sparks in muscle cells: interactive procedures for automatic detection and measurements on line-scan confocal images series. Comput.Methods Programs Biomed., 77(1): 57-70.

Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A., & Massague, J. 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. Cell, 117(2): 211-223.

Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., & Dascal, N. 1991. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. Science, 253(5027): 1553-1557.

Snyders, D. J. 1999. Structure and function of cardiac potassium channels. Cardiovasc.Res., 42(2): 377-390.

Soeller, C. & Cannell, M. B. 1999. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. Circ.Res., 84(3): 266-275.

Solaro, R. J. & Rarick, H. M. 1998. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. Circ.Res., 83(5): 471-480.

Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S., & Lisanti, M. P. 1996. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. J.Biol.Chem., 271(25): 15160-15165.

Song, L. S., Guatimosim, S., Gomez-Viquez, L., Sobie, E. A., Ziman, A., Hartmann, H., & Lederer, W. J. 2005. Calcium biology of the transverse tubules in heart. Ann.N.Y.Acad.Sci., 1047: 99-111.

Song, L. S., Sobie, E. A., McCulle, S., Lederer, W. J., Balke, C. W., & Cheng, H. 2006. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 103(11): 4305-4310.

Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., & Suzuki, K. 1989. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. J.Biol.Chem., 264(33): 20106-20111.

Sorimachi, H., Toyama-Sorimachi, N., Saido, T. C., Kawasaki, H., Sugita, H., Miyasaka, M., Arahata, K., Ishiura, S., & Suzuki, K. 1993. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. J.Biol.Chem., 268(14): 10593-10605.

Spurney, C. F., Knobloch, S., Pistilli, E. E., Nagaraju, K., Martin, G. R., & Hoffman, E. P. 2008. Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are

associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. Neuromuscul.Disord., 18(5): 371-381.

Stemerman, M. B., Pitlick, F. A., & Dembitzer, H. M. 1976. Electron microscopic immunohistochemical identification of endothelial cells in the rabbit. Circ.Res., 38(3): 146-156.

Stern, M. D. & Cheng, H. 2004. Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle? Cell Calcium, 35(6): 591-601.

Sun, X. H., Protasi, F., Takahashi, M., Takeshima, H., Ferguson, D. G., & Franzini-Armstrong, C. 1995. Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. J.Cell Biol., 129(3): 659-671.

-T-

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T., & . 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. Nature, 339(6224): 439-445.

Tanabe, T., Beam, K. G., Adams, B. A., Niidome, T., & Numa, S. 1990. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. Nature, 346(6284): 567-569.

Tanabe, Y., Esaki, K., & Nomura, T. 1986. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. Acta Neuropathol., 69(1-2): 91-95.

Tarroni, P., Rossi, D., Conti, A., & Sorrentino, V. 1997. Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. J.Biol.Chem., 272(32): 19808-19813.

Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., & Kambadur, R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J.Biol.Chem., 275(51): 40235-40243.

Torrente, Y., Belicchi, M., Marchesi, C., Dantona, G., Cogiamanian, F., Pisati, F., Gavina, M., Giordano, R., Tonlorenzi, R., Fagiolari, G., Lamperti, C., Porretti, L., Lopa, R., Sampaolesi, M., Vicentini, L., Grimoldi, N., Tiberio, F., Songa, V., Baratta, P.,

Prelle, A., Forzenigo, L., Guglieri, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., Mouly, V., Butler-Browne, G. S., Comi, G. P., Biondetti, P., Moggio, M., Gaini, S. M., Stocchetti, N., Priori, A., D'Angelo, M. G., Turconi, A., Bottinelli, R., Cossu, G., Rebull, P., & Bresolin, N. 2007. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. Cell Transplant., 16(6): 563-577.

Tortora, G., Grabowski, S. R 2001. Principes d'anatomie et de physiologie. Deboeck Université. Ref Type : Generic.

Townsend, D., Yasuda, S., Li, S., Chamberlain, J. S., & Metzger, J. M. 2008. Emergent dilated cardiomyopathy caused by targeted repair of dystrophic skeletal muscle. Mol. Ther., 16(5): 832-835.

Turner, P. R., Westwood, T., Regen, C. M., & Steinhardt, R. A. 1988. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. Nature, 335(6192): 735-738.

-v-

Ullrich, ND, M Fanchaouy, K Gusev, N Shirokova, E Niggli, 2009, Hypersensitivity of excitation-contraction coupling in dystrophic cardiomyocytes: Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol, v. 297, p. H1992-H2003.

-v-

Valentine, B. A., Winand, N. J., Pradhan, D., Moise, N. S., de Lahunta, A., Kornegay, J. N., & Cooper, B. J. 1992. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. Am.J.Med.Genet., 42(3): 352-356.

van Deutekom, J. C., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Frankhuizen, W. S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J. T., Koop, K., van der Kooi, A. J., Goemans, N. M., de Kimpe, S. J., Ekhart, P. F., Venneker, E. H., Platenburg, G. J., Verschuuren, J. J., & van Ommen, G. J. 2007. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. N.Engl.J.Med., 357(26): 2677-2686.

Vandebrouck, A., Ducret, T., Basset, O., Sebille, S., Raymond, G., Ruegg, U., Gailly, P., Cognard, C., & Constantin, B. 2006. Regulation of store-operated calcium entries and

mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. FASEB J., 20(1): 136-138.

Vandebrouck, A., Sabourin, J., Rivet, J., Balghi, H., Sebille, S., Kitzis, A., Raymond, G., Cognard, C., Bourmeyster, N., & Constantin, B. 2007. Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. FASEB J., 21(2): 608-617.

Vandebrouck, C., Duport, G., Cognard, C., & Raymond, G. 2001. Cationic channels in normal and dystrophic human myotubes. Neuromuscul.Disord., 11(1): 72-79.

Vandebrouck, C., Imbert, N., Constantin, B., Duport, G., Raymond, G., & Cognard, C. 2002. Normal calcium homeostasis in dystrophin-expressing facioscapulohumeral muscular dystrophy myotubes. Neuromuscul.Disord., 12(3): 266-272.

Volpe, P., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Salviati, G. 1986. Role of inositol 1,4,5-trisphosphate in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. FEBS Lett., 197(1-2): 1-4.

-W-

Wade, R. H., Chretien, D., & Job, D. 1990. Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate? J.Mol.Biol., 212(4): 775-786.

Williams, I. A. & Allen, D. G. 2007a. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from *mdx* mice. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol, 292(2): H846-H855.

Williams, I. A. & Allen, D. G. 2007b. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient *mdx* mice. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol, 293(3): H1969-H1977.

Wink, D. A., Cook, J. A., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M. C., & Mitchell, J. B. 1995. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. Toxicol.Lett., 82-83: 221-226.

Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., & Jones, L. R. 1991. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. J.Biol.Chem., 266(17): 11144-11152.

Woodcock, E. A., Matkovich, S. J., & Binah, O. 1998. Ins(1,4,5)P₃ and cardiac dysfunction. *Cardiovasc.Res.*, 40(2): 251-256.

Woolf, P. J., Lu, S., Cornford-Nairn, R., Watson, M., Xiao, X. H., Holroyd, S. M., Brown, L., & Hoey, A. J. 2006. Alterations in dihydropyridine receptors in dystrophin-deficient cardiac muscle. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 290(6): H2439-H2445.

Wrogemann, K. & Pena, S. D. 1976. Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet*, 1(7961): 672-674.

-X-

Xu,J, Z Zhou, L Zeng, Y Huang, W Zhao, C Cheng, M Xu, Y Xie, Y Mao, 2001, Cloning, expression and characterization of a novel human REPS1 gene: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1522, p. 118-121.

-Y-

Yanagisawa,A, M Miyagawa, M Yotsukura, T Tsuya, C Shirato, T Ishihara, T Aoyagi, K Ishikawa, 1992, The prevalence and prognostic significance of arrhythmias in Duchenne type muscular dystrophy: *Am.Heart J.*, v. 124, p. 1244-1250.

-Z-

Zhang,Z, D Lewis, C Strock, G Inesi, M Nakasako, H Nomura, C Toyoshima, 2000, Detailed characterization of the cooperative mechanism of Ca(2+) binding and catalytic activation in the Ca(2+) transport (SERCA) ATPase: *Biochemistry*, v. 39, p. 8758-8767.

Zhou,J, A Jeron, B London, X Han, G Koren, 1998, Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes: *Circ.Res.*, v. 83, p. 806-814.

Résumé

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une myopathie génétique récessive qui se caractérise par l'absence d'une protéine sous membranaire, la dystrophine. Elle se traduit par la dégénérescence progressive des muscles squelettiques et cardiaques. Particulièrement, le myocarde développe une cardiomyopathie caractérisée par une dilatation des ventricules et une réduction du volume d'éjection systolique qui conduisent à une mort prématurée des patients en moyenne à 25 ans. Actuellement, peu de données existent sur les causes menant à cette pathologie. Toutefois, de nombreux travaux sur la DMD suggèrent que l'absence de dystrophine, comme dans les fibres musculaires squelettiques, contribue à fragiliser l'intégrité membranaire et provoque une dérégulation de canaux ioniques menant à une surcharge calcique intracellulaire dans les cardiomyocytes.

Ce travail fut entrepris pour dresser un bilan des dommages structuraux et fonctionnels des cardiomyocytes ventriculaires issus de souris *mdx*, modèles d'étude de la DMD. Des expériences, réalisées au moyen de la microscopie de conductance ionique à balayage (SICM), montrent une altération du sarcolemme se traduisant par une perte locale de l'organisation en crêtes et en sillons. De plus, une réduction et une modification du réseau de tubules-T accompagnent ces dommages membranaires. D'un point de vue fonctionnel, en combinant le SICM avec la microscopie confocale, les activités calciques au repos et suite à des stimulations dépolarisantes ont été enregistrées et analysées. Les résultats ont révélé une occurrence doublée des phénomènes de libérations calciques spontanées, et un ralentissement du mécanisme d'excitation-contraction. Ainsi, l'ensemble de nos données expérimentales montre que les récepteurs à la ryanodine de type 2, avec des propriétés biochimiques et fonctionnelles modifiées, participent à ces dérégulations dans les cellules malades.

Nous ne pouvons affirmer que toutes ces désorganisations topographiques et fonctionnelles sont dues à l'absence de la dystrophine. Cependant, nous suggérons que cette protéine pourrait jouer un rôle de tuteur qui maintiendrait l'intégrité membranaire et tubulaire pour ainsi assurer l'homéostasie calcique des cellules cardiaques. Elle interviendrait donc dans l'architecture cellulaire de façon bien plus importante que celle révélée pour l'instant dans les fibres musculaires squelettiques.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a sex-linked recessive progressive disease characterized by the loss of the sub-membrane protein dystrophin. This fatal disease leads to degeneration of skeletal and cardiac muscles. 90% of DMD patients present a dilated cardiomyopathy (DCM) characterized by ventricular dilation and progressive decline in cardiac contractility that lead to patients mortality around 25 years old. Several researches suggest that dystrophin-deficient cells show membrane instability and, in the heart, calcium dysregulation leading to cardiac arrhythmias. Actually, it remains unclear whether these disruptions in dystrophic hearts are a result of wounded membranes caused by dystrophin deficiency or/and calcium transporters alterations.

We described membrane structural damages and disorganisations, from the surface to the depth, of cardiomyocytes from the *mdx* mouse model of DMD. Experiments have been performed with Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) to characterize the loss of integrity of cardiomyocytes surface in dystrophin deficiency. Furthermore, functional approach revealed modifications of sparks which displayed doubled frequency at rest and an excitation-induced calcium release involved in Excitation-Contraction (EC) coupling slower in *mdx* cardiomyocytes. Thus, our experimental data show that ryanodine receptors, with drastic changes in functional properties, are involved in these dysregulations in dystrophin-deficient cardiomyocytes.

We cannot assert that the loss of dystrophin is entirely responsible for structural and functional disruptions. However, we propose that, in the heart, dystrophin would play a “staking” role involved in maintaining the plasma membrane integrity not only at the cell surface but also in preserving T-Tubules structure in the depth of cardiomyocytes. In this way, calcium homeostasis would be preserved.

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une myopathie génétique récessive qui se caractérise par l'absence d'une protéine sous membranaire, la dystrophine. Elle se traduit par la dégénérescence progressive des muscles squelettiques et cardiaques. Particulièrement, le myocarde développe une cardiomyopathie caractérisée par une dilatation des ventricules et une réduction du volume d'éjection systolique qui conduisent à une mort prématurée des patients en moyenne à 25 ans. Actuellement, peu de données existent sur les causes menant à cette pathologie. Toutefois, de nombreux travaux sur la DMD suggèrent que l'absence de dystrophine, comme dans les fibres musculaires squelettiques, contribue à fragiliser l'intégrité membranaire et provoque une dérégulation de canaux ioniques menant à une surcharge calcique intracellulaire dans les cardiomyocytes. Ce travail fut entrepris pour dresser un bilan des dommages structuraux et fonctionnels des cardiomyocytes ventriculaires issus de souris *mdx*, modèles d'étude de la DMD. Des expériences, réalisées au moyen de la microscopie de conductance ionique à balayage (SICM), montrent une altération du sarcolemme se traduisant par une perte locale de l'organisation en crêtes et en sillons. De plus, une réduction et une modification du réseau de tubules-T accompagnent ces dommages membranaires. D'un point de vue fonctionnel, en combinant le SICM avec la microscopie confocale, les activités calciques au repos et suite à des stimulations dépolarisantes ont été enregistrées et analysées. Les résultats ont révélé une occurrence doublée des phénomènes de libérations calciques spontanées, et un ralentissement du mécanisme d'excitation-contraction. Ainsi, l'ensemble de nos données expérimentales montre que les récepteurs à la ryanodine de type 2, avec des propriétés biochimiques et fonctionnelles modifiées, participent à ces dérégulations dans les cellules malades. Nous ne pouvons affirmer que toutes ces désorganisations topographiques et fonctionnelles sont dues à l'absence de la dystrophine. Cependant, nous suggérons que cette protéine pourrait jouer un rôle de tuteur qui maintiendrait l'intégrité membranaire et tubulaire pour ainsi assurer l'homéostasie calcique des cellules cardiaques. Elle interviendrait donc dans l'architecture cellulaire de façon bien plus importante que celle révélée pour l'instant dans les fibres musculaires squelettiques.

Mots clés : DMD, dystrophine, cardiomyopathie dilatée, souris *mdx*, cardiomyocytes ventriculaires isolés, tubules-T, calcium, sparks, couplage excitation-contraction, récepteurs à la ryanodine, SICM, topographie membranaire, microperfusion, fluorescence, imagerie confocale.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a sex-linked recessive progressive disease characterized by the loss of the sub-membrane protein dystrophin. This fatal disease leads to degeneration of skeletal and cardiac muscles. 90% of DMD patients present a dilated cardiomyopathy (DCM) characterized by ventricular dilation and progressive decline in cardiac contractility that lead to patients mortality around 25 years old. Several researches suggest that dystrophin-deficient cells show membrane instability and, in the heart, calcium dysregulation leading to cardiac arrhythmias. Actually, it remains unclear whether these disruptions in dystrophic hearts are a result of wounded membranes caused by dystrophin deficiency or/and calcium transporters alterations. We described membrane structural damages and disorganisations, from the surface to the depth, of cardiomyocytes from the *mdx* mouse model of DMD. Experiments have been performed with Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) to characterize the loss of integrity of cardiomyocytes surface in dystrophin deficiency. Furthermore, functional approach revealed modifications of sparks which displayed doubled frequency at rest and an excitation-induced calcium release involved in Excitation-Contraction (EC) coupling slower in *mdx* cardiomyocytes. Thus, our experimental data show that ryanodine receptors, with drastic changes in functional properties, are involved in these dysregulations in dystrophin-deficient cardiomyocytes. We cannot assert that the loss of dystrophin is entirely responsible for structural and functional disruptions. However, we propose that, in the heart, dystrophin would play a "staging" role involved in maintaining the plasma membrane integrity not only at the cell surface but also in preserving T-Tubules structure in the depth of cardiomyocytes. In this way, calcium homeostasis would be preserved.

Keywords: DMD, dystrophine, dilated cardiomyopathy, *mdx* mice, isolated ventricular cardiomyocytes, T-tubules, calcium, sparks, excitation-contraction coupling, ryanodine receptors, SICM, membrane topography, microperfusion, fluorescence, confocal microscopy.