Influx cationique dépendant des canaux TRPCs dans les cellules musculaires squelettiques: régulation par le complexe dystrophine/α1-syntrophine et par la voie PLC. *Implication dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne.*

Résumé de la thèse:

La dystrophine est une protéine du cytosquelette normalement exprimée sous la membrane des cellules musculaires squelettiques. L'absence de cette protéine dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) entraîne la nécrose des fibres musculaires, résultant entre autres d'une dérégulation des mouvements calciques à travers le sarcolemme et par conséquent d'une augmentation du calcium libre dans le myoplasme. A l'heure actuelle, le lien entre l'absence de dystrophine et l'altération calcique n'est toujours pas établi et l'objectif de ce travail a été de le mettre en évidence. Les expériences ont été principalement réalisées sur les lignées cellulaires SolC1 déficientes en dystrophine et SolD6 exprimant la mini-dystrophine ainsi que sur des cultures primaires de souris normales et de souris *mdx,* modèle animal de la DMD.
Notre étude démontre que, dans les cellules déficientes en dystrophine, les entrées calciques activées par la déplétion en calcium du réticulum sarcoplasmique, sont considérablement augmentées. Par la technique de siRNA, nous avons pu identifier les canaux TRPC1 et TRPC4 par où transitent les influx cationiques dans les myotubes SolD6. Nous avons également décrit pour la première fois un lien moléculaire entre TRPC1/TRPC4 et la dystrophine, l'α1-syntrophine et le domaine PDZ de cette dernière. Ce complexe α1-syntrophine/TRPCs est réduit dans les cellules déficientes en dystrophine car l'expression de l'α1-syntrophine au sarcolemme est diminuée. Nous suggérons qu'une régulation normale des entrées de calcium à travers TRPC1/TRPC4 dépend de l'association entre ces canaux non dépendants du potentiel et l'α1-syntrophine. En effet, la surexpression de l'α1-syntrophine dans les cellules déficientes en dystrophine rétablit l'entrée de calcium. Inversement, des expériences avec des siRNAs dirigés contre l'α1-syntrophine entrainent une augmentation des influx cationiques dans les cellules exprimant la mini-dystrophine à des niveaux proches des influx mesurés dans les cellules déficientes en dystrophine. En plus de son rôle de protéine d'échafaudage, l'α1-syntrophine serait donc cruciale pour réguler l'activité des canaux TRPC1/TRPC4 dans le muscle squelettique.
D'autre part, nous avons pu mettre en évidence par des traitements pharmacologiques que l'influx cationique exacerbé des cellules SolC1 déficientes en dystrophine est dépendant de la voie PLC/PKC. Dans ces myotubes, l'absence de la dystrophine et/ou de l'α1-syntrophine entrainent à travers TRPC1 des entrées accrues de calcium, potentialisées par la voie PLC/PKC.
Ce travail de thèse a mis clairement en évidence un influx cationique dépendant des canaux TRPCs et régulé par l'α1-syntrophine dans la cellule musculaire squelettique. L'absence de cette dernière au sarcolemme pourrait conférer une nouvelle sensibilité au canal TRPC1 entrainant alors sa suractivation et une entrée incontrôlée de calcium dans le cytoplasme des cellules déficientes en dystrophine.

Mots clés: dystrophine, α1-syntrophine, domaine PDZ, les canaux calciques TRPC1 et TRPC4, muscle squelettique, voie PLC/PKC.

Travaux réalisés au sein de l'Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaires,
CNRS, UMR 6187
40, avenue du Recteur Pineau 86022 Poitiers cedex

SOMMAIRE 1

LISTE DES ABREVIATIONS 7

I. HOMEOSTASIE CALCIQUE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE 15

A. Le muscle squelettique 15

1. Introduction générale 15

2. Myogénèse et développement du muscle squelettique 15

3. Organisation anatomique du muscle squelettique 16

4. Organisation cellulaire: ultrastructure du muscle squelettique 17

4.1. L'appareil contractile 17

4.2. Les systèmes membranaires spécifiques 18

4.2.1. Le sarcolemme 18

4.2.2. Le réticulum sarcoplasmique 19

5. Classification des différents types de fibres musculaires 19

B. Systèmes de régulation du calcium intracellulaire dans le muscle squelettique 20

1. Introduction générale: le calcium 20

2. Les stocks intracellulaires 22

2.1. Le réticulum sarcoplasmique 22

2.1.1. Les Récepteurs à la Ryanodine (RyR) 22

2.1.2. Les Récepteurs à l'Inositol trisPhosphate: les RIP_3 23

2.1.3. La pompe Ca^{2+} ATPase: la SERCA 25

2.2. Les mitochondries 27

2.2.1. Les Mitochondries et l'homéostasie calcique 27

3. Le sarcolemme 29

3.1. Les canaux calciques du sarcolemme 29

3.1.1. Les canaux calciques voltage-dépendants 29

3.1.2. Les canaux calciques non voltage-dépendants 31

3.1.2.1. Les TRPCs 32

3.1.2.2. Les TRPCs dans le muscle squelettique 47

3.1.2.3. ECCEs dans le muscle squelettique 49

3.1.2.4. STIM1 50

3.1.2.5. Orai1 53
3.1.2.6. STIM et Orai dans le muscle squelettique 58
3.1.3. Système d'extrusion du calcium sur le sarcolemme 59
3.1.3.1. L'échangeur Na^+/Ca^{2+} 59
3.1.3.2. La pompe Ca^{2+}-ATPase (PMCA) 61
C. Le Couplage Excitation/Contraction: rôle essentiel du calcium 62
D. DAPs (Dystrophin-Associated Proteins) et Physiopathologie 64
1. La dystrophine: structure et fonction 64
1.1. Présentation du gène 64
1.2. Isoformes de la dystrophine et épissage alternatif 64
1.3. Structure de la dystrophine et localisation 65
2. Le complexe macromoléculaire lié à la dystrophine: DAP 66
E. Les syntrophines 67
1. Présentation du gène et isoformes de la syntrophine 67
2. Localisation des syntrophines 68
3. Structure des syntrophines 69
4. Fonction des syntrophines: Protéines d'échafaudage 70
5. Nouvelles fonctions: protéines régulatrices 71
6. Les souris KO syntrophines 73
F. La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) 74
1. DMD: les premières découvertes 74
2. Evolution de la maladie de Duchenne 74
3. Origine et évolution de la maladie de Becker 75
4. Stratégies thérapeutiques effectives ou expérimentales 76
4.1. Thérapie génique 76
4.2. Thérapie cellulaire 78
4.3. Thérapies pharmacologiques 79
5. Modèles animaux de la DMD 81
5.1. La souris *mdx* 81
5.2. Le chien GRMD 83
5.3. La dystrophie musculaire féline 83
6. Le DAP et la DMD 84
7. La syntrophine et la DMD 85

G. Calcium et DMD 85

1. Dérégulation de l'homéostasie calcique dans la DMD 85

1.1. Calcium intracellulaire dans les cellules déficientes en dystrophine 85

1.2. Les canaux dits 'de fuite' (leak channels) 88

1.3. Les SOCs 89

1.4. Les canaux MS ou les canaux SACs 90

1.5. Altération des stocks calciques intracellulaires 92

1.6. Les canaux calciques voltage-dépendants 93

POSITION DU PROBLEME ET OBJECTIFS DU TRAVAIL 95

II. MATERIEL ET METHODES 98

A. Le matériel biologique 98

1. Les différentes lignées myogéniques 98

2. Conservation et entretien des cellules 99

2.1. Congélation/Décongélation des cellules 99

2.2. Le repiquage des cellules (trypsinisation et ensemencement) 99

2.3. La différenciation des cellules 100

3. Culture primaire des muscles squelettiques de souris jeunes 100

B. Les différentes méthodes de transfection 102

1. Lipides cationiques 103

1.1. Principe 103

1.2. Protocole expérimental 103

2. La Nucléofection 104

2.1. Principe 104

2.2. Protocole expérimental 104

3. Autres lipides cationiques et siRNA 105

3.1. Principe 105

3.2. Protocole expérimental 105

3.3. Définition et principe du siRNA 106

C. Techniques de physiologie cellulaire 107

1. Mesure d'influx calcique: extinction du fura-2 par le manganèse 107

1.1. Principe 107

1.2. Appareillage 108

1.3. Protocole expérimental 108
1.3.1. La charge des cellules 108
1.3.2. Etude des variations du calcium après stimulation 109
1.3.3. Traitement des résultats 109
2. La technique de patch-clamp 110
2.1. Principe 110
2.2. Dispositif expérimental 113
2.2.1. Pipettes et portoir 113
2.2.2. Système de perfusion 113
2.2.3. Système de visualisation 114
2.2.4. Système de mesure 114
2.2.5. Protocole expérimental: Whole-Cell Recording (WCR) 114
2.2.6. Milieux ioniques pour la mesure des SOCs 115
2.2.7. Milieux ioniques pour la mesure du potentiel de membrane 115
D. Techniques de biologie moléculaire 116
1. Extraction d'un vecteur plasmidique 116
1.1. Minipréparation de l'ADN plasmidique à l'aide d'un kit Promega 116
1.2. Maxipréparation de l'ADN plasmidique à l'aide d'un kit Qiagen 117
1.3. Digestion enzymatique des plasmides et analyse sur gel 117
2. La RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction) quantitative 118
2.1. Principe 118
2.2. Extraction des ARN totaux 119
2.3. Transcription inverse: obtention d'ADNc simple brin 119
2.4. La PCR quantitative en temps réel 120
2.5. Analyse des résultats 120
E. Techniques de biochimie 121
1. Lysat cellulaire 121
2. Immunoprécipitation et coimmunoprécipitation 121
3. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 122
3.1. Préparation du gel coulé 122
3.2. Préparation du gel pré-coulé 123
3.3. Dépôts et migration 123

4. Western blot 123
4.1. Electrotransfert 123
4.2. Détection immunologique des protéines 124
F. Expériences d'affinité in vitro (Pull Down) 125
1. Production et purification de protéines recombinantes en fusion GST 125
2. Précipitation par affinité de partenaires moléculaires (Pull-down) 126
G. Le marquage immunologique 126
1. Principe 126
2. Immunocytochimie: fixation des lignées cellulaires et cultures primaires au paraformaldéhyde 127
3. Immunocytochimie: fixation des lignées cellulaires et cultures primaires au méthanol et acétone 128
4. Immunohistochimie: fixation des coupes de tissus au paraformaldéhyde 128
4.1. Prélèvement et préparation des muscles 128
4.2. Imprégnation 128
4.3. Marquage des coupes de tissu 128
RESULTATS ET DISCUSSION 130
AVANT-PROPOS 130
I. ARTICLE 1: REGULATION OF CAPACITATIVE CALCIUM ENTRIES BY α1-SYNTROPHIN: ASSOCIATION OF TRPC1 WITH DYSTROPHIN COMPLEX AND THE PDZ DOMAIN OF α1-SYNTROPHIN 130
A. Contexte 130
B. Résultats et discussion de l'article 1 132
II. ARTICLE 2: REGULATION OF TRPC1 AND TRPC4 CATION CHANNELS REQUIRES AN α1-SYNTROPHIN-DEPENDENT COMPLEX IN SKELETAL MOUSE MYOTUBES 147
A. Contexte 147
B. Résultats et discussion de l'article 2 148

III. INCREASED CATION ENTRY THROUGH TRPC1 IS MEDIATED BY PLC/PKC PATHWAY IN DYSTROPHIN-DEFICIENT MYOTUBES 178

A. Contexte 178

B. Résultats et discussion de l'article 3 178

CONCLUSION GENERALE 212

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES 214

I. LOCALISATION DES TRPCs DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE 214

II. STIM1 ET ORAI: DEUX NOUVELLES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES ENTREES CALCIQUES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE 217

III. LES ENTREES CATIONIQUES DE BASE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE 220

PERSPECTIVES 222

PROPOSITION D'UN MODELE DE REGULATION 226

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 229

CURRICULUM VITAE 257

LISTE DES ABREVIATIONS

A

aa: acides aminés

AAV: Adeno-Associated Virus

ABCA1: ATP-Binding Cassette transporter A1

ABS: Actin Binding Site

Ach: Acétylcholine

ACP: Acide CycloPiazonique

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNc: Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADP: Adénosine DiPhosphate

AgCl: Chlorure d'Argent

AM: AcétoxyMéthylester

AONs: Antisense OligoNucleotides

2-APB: 2-AminoethoxydiPhényl Borate

APS: Ammonium PerSulfate

AQ4: AQuaporine 4

ARMS: Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: Acide RiboNucléique messager

Asn: Asparagine

ATP: Adénosine TriPhosphate

ATPase: Adénosine TriPhosphatase

B

Ba^{2+}: ion Baryum

BAPTA: 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

BET: Bromure d'EThidium

BMD: Becker Muscular Dystrophy

Br_2-TITU: 1, 3-diBromo- 2, 4, 6-Tris(methyl-IsoThio-Uronium) benzene

BSA: Bovin Serum Albumin

BTZ: BenzoThiaZépine

C

Ca^{2+}: ion Calcium

CAD: CRAC Activation Domain

c-ADP-ribose: c-Adénosine DiPhosphate-ribose

CaM: CalModuline

CaMBS: CalModulin Binding Site

CaMKII: calcium-CalModuline Kinase II

C57BL/10: C57BLack/10

C-C: Coiled-Coil

CCEs: Capacitative Calcium Entries

Cd^{2+}: ion Cadmium

CHO: Chinese Hamster Ovary

CIF: Calcium Influx Factor

CIP: Cocktail d'Inhibiteurs de Protéases

cm: centimètre

Cm: Capacité membranaire

CO_2: dioxygène

Co^{2+}: ion Cobalt

CPA: CycloPiazonic Acid

CRAC: Calcium Release-Activated calcium Current

CRACM: Calcium Release-Activated calcium Current-Membrane

CREB: cAMP/Ca^{2+}-Response Element Binding

Cs^{+}: ion Césium

Ct: Cycle threshold

D

Da: Dalton

DAG: DiAcylGlycerol

DAPs: Dystrophin-Associated Proteins

DBHQ: 2,5-Di-tert-ButylHydroQuinone

DGK: DiacylGlycerol Kinase

DHPs: DiHydroPyridines

DHPRs: DiHydroPyridine Receptors

DMB: Dystrophie Musculaire de Becker

DMD: Dystrophie Musculaire de Duchenne

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: DiMéthyl SulfOxyde

DOC: DiethylOxaCarbocyanine iodide

dNTP: désoxyNucléotideTriPhosphate

dsRNA: double strand RNA

DTT: DiThioTheritol

E

ECL: Enhanced ChemiLuminescence

ECCs: Excitation-Coupled Channels

ECCEs: Excitation-Coupled Calcium Entries

EDL: Extensor Digitorum Longus

EDTA: EthyleneDiamine TetraAcetic acid

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

EGTA: EthyleneGlycol-bis (β-amino-ethyl ether) *N,N,N',N'*-Tetraacetic Acid

EphA4: Ephrin A4

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

ERM: Ezrin/Radixin/Moesin

F

FKBP: FK Binding Protein

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

fura-2/AM: (1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5 methylphenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester)

G

g: gravité

Gd^{3+}: ion Gadolinium

GΩ: Giga Ohm

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GRMD: Golden Retriever Muscular Dystrophy

GsMTx4: Grammostola spatulata, MechanoToxin 4

GST: Gluthation S Transférase

H

h: heure

hCASMCs: human Coronary Artery Smooth Muscle Cells

HEK-293: Human Embryonic Kidney-293

HEPES: *N*-2-HydroxyEthyl-Piperazine-*N'*-2-EthaneSulfonic acid

HFMD: Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy

HIV-1: Human Immunodeficiency Virus-1

HM: Hyperthermie Maligne

HMEC: Human dermal Microvascular Endothelial Cell line

HPB-ALL: Human, japanese, Peripheral Blood, leukemia T cell

HSG: Human Salivary Gland

HSY: human parotid epithelial cell line

HVA: High Voltage Activated

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

I

ICA512: Islet Cell Autoantigen 512

IgG: Immunoglobuline G

IP: ImmunoPrécipitation

IP_3: Inositol 1,4,5-trisPhosphate

$iPLA_2$: calcium independent PhosphoLipase A_2

IPTG: IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside

IRES: Internal Ribosome Entry Site

J

JNM: Jonction NeuroMusculaire

JP2: JunctoPhiline 2

K

K^+: ion potassium

kb: kilobase

KCl: Chlorure de potassium

kDa: kiloDalton

KO: Knock Out

L

La^{3+}: ion Lanthane

LB: Luria Broth

LIZ: Leucine-Isoleucine Zipper

LTR: Long Terminal Repetition

LVA: Low Voltage Activated

LysoPL: LysoPhosphoLipides

M

MAST: Microtubule-Associated Serine/Threonine

Mb: Mégabase

mdx: x-linked muscular dystrophy

MCC: Myopathie à Core Central

MEF2: Myocyte Enhancer Factor 2

Mg^{2+}: ion Magnésium

MG29: MitsuGumine 29

MHC: Myosine Heavy Chain

µm: micromètre

µM: microMolaire

ml: millilitre

mM: milliMolaire

mOsm: milliOsmol

min: minute

M-MLV: Moloney-Murine Leukemia Virus

Mn^{2+}: ion Manganèse

MOPS: MOrpholinePropaneSulfonic acid

Mrf: Myogenic regulatory factor

MS: MécanoSensible

Myf: Myogenic factor

N

Na^{+}: ion sodium

nm: nanomètre

nM: nanoMolaire

NCX: Na^{+}/Ca^{2+} eXchanger

Ni^{2+}: ion Nickel

NIH-3T3: mouse embryonic fibroblast cell line

NO: Nitric Oxide

nNOS: neuronal-type Nitric Oxide Synthase

O

OAG: 1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol

P

PA: Potentiel d'Action

PAA: PhenylAlkylAmines

PAZ: Piwi Argonaut et Zwille

PBS: Phosphate Buffer Saline

PDZ: Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor, Zonula occludens-1 protein

pF: picoFarad

PFA: ParaFormAldéhyde

PH: Pleckstrin Homology

PIP_2: PhosphatidylInositol 4,5-bisPhosphate

PKA: Protéine Kinase A

PKC: Protéine Kinase C

PKG: Protéine Kinase G

PLC: PhosphoLipase C

PMCA: Plasma-Membrane Calcium ATPase

PMSF: PhenylMethaneSulphonylFluoride

Po: Probabilité d'ouverture

pS: picoSiemens

PSA: PerSulfate d'Ammonium

Q

qsp: quantité suffisante pour

R

RBL : Rat Basophilic Leukaemia

RE: Réticulum Endoplasmique

RIPA: RadioImmunoPrecipitation Assay

RIP_3: Récepteur à l'Inositol 1,4,5-trisPhosphate

RISC: RNA-Induced Silencing Complex

Rm: Résistance membranaire

ROCs: Receptor-Operated Channels

ROS: Reactive Oxygen Species

rpm: rotor par minute

Rs: Résistance série

RS: Réticulum Sarcoplasmique

RT-PCR: Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RyRs: Ryanodine Receptors

S

s: seconde

SACs: Stretch-Activated Channels

SAM: Sterile Alpha Motif

SAPK3: Stress-Activated Protein Kinase-3

SAST: Syntrophin-Associated Serine/Threonine

SBAC: Bovine Adrenocortical Cell

SCID: Severe Combined Immuno Deficiency syndrome

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

SDS-PAGE: SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SERCA: Sarco-Endoplasmique Reticulum Calcium ATPase

SH2: Src Homology 2

SH3: Src Homology 3

SICM: Scanning Ion Conductance Microscopy

siRNA: small interfering RNA

SKF-96365: 1-{β-[3-(4-Methoxyphenyl)propyl]-4-methoxyphenethyl}-1H-imidazole hydrochloride

SkM: skeletal Muscle Na^+ channel

SMOCs: Second Messenger-Operated Channels

SNAP-25: SyNaptosome-Associated Protein-25

SOCs: Store-Operated Channels

SOCEs: Store-Operated Calcium Entries

S1P: Sphingosine 1-Phosphate

STIM1: STromal Interaction Molecule 1

SU: Syntrophin Unique

T

TAE: Tris Acétate EDTA

TBS: Tris Buffered Saline

TEA: TetraEthyl Ammonium

TEMED: TEtraMEthyl-1-,2-Diaminométhane

TPEN: *N,N,N′,N′*-Tetrakis-(2-Pyridylmethyl)-EthyleNediamine

TRP: Transient Receptor Potential

TRPA: Transient Receptor Potential Ankyrin

TRPC: Transient Receptor Potential Canonical

TRPM: Transient Receptor Potential Melastatin

TRPML: Transient Receptor Potential MucoLipin

TRPN: Transient Receptor Potential No mechanosensitive

TRPP: Transient Receptor Potential Polycystin

TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloid

tubule T: tubule Transverse

U

U: Unité

U73122: ((1-(6-((17 beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-di one)

UV: UltraViolet

V

V: Volt

VAMP-2: Vesicle-Associated Membrane Protein-2

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Vi: potentiel imposé

Vm: potentiel membranaire

VOCC: Voltage-Operated Calcium Channel

Vpip: potentiel de la pipette

W

WB: Western Blotting

WCR: Whole-Cell Recording

Z

ZP3: Zonula Pellucida 3

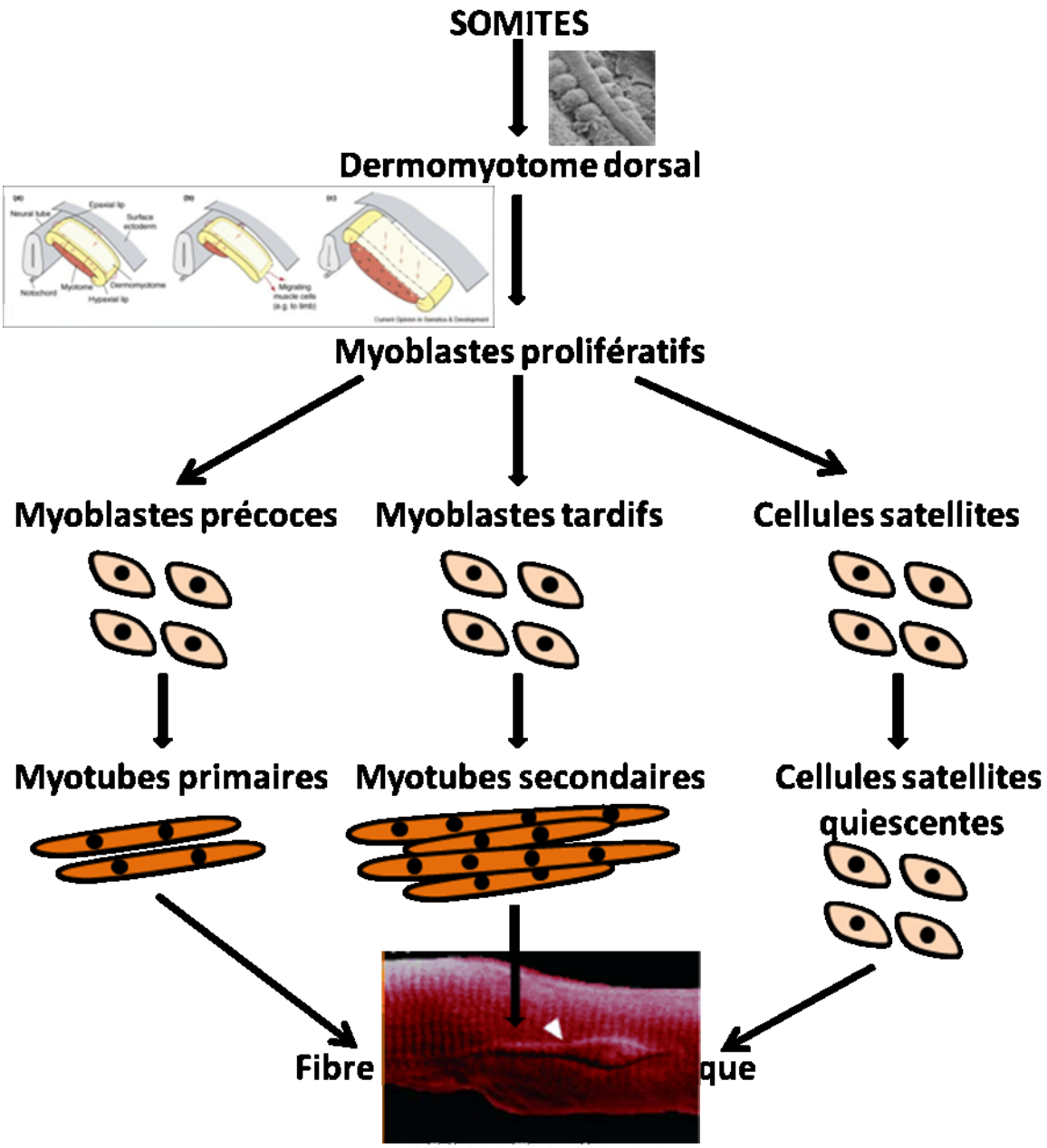


Figure 1: Myogenèse du muscle squelettique.
Les cellules précurseurs myogéniques du tissu musculaire squelettique sont situées dans le dermomyotome. Elles se différencient en myoblastes. Les myoblastes précoces fusionnent et forment les myotubes primaires, qui constitueront l'ébauche du muscle. Les myoblastes tardifs forment les myotubes secondaires. Les myotubes suivent une étape de maturation pour donner les fibres musculaires. Les cellules satellites restent mononuclées à l'âge adulte et interviennent dans la régénération musculaire.

I. HOMEOSTASIE CALCIQUE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

A. Le muscle squelettique

1. Introduction générale

Ce premier chapitre a pour but de détailler la physiologie du muscle squelettique, sa structure (aspects macroscopiques), son ultrastructure (aspects microscopiques et cellulaires). Les muscles striés squelettiques représentent 40 à 50 % du poids total du corps humain. Le système musculaire squelettique exerce un rôle fondamental dans l'organisme car il permet le déplacement, le maintien de la posture et dégage de la chaleur. Son rôle prépondérant reste tout de même le déplacement, c'est à dire la production de force et de mouvement par un mécanisme spécifique du muscle appelé contraction musculaire qui est sous le contrôle du système nerveux. La contraction musculaire regroupe un ensemble de mécanismes complexes, mettant en jeu des systèmes hautement spécialisés, du fait de la structure extrêmement organisée du muscle et des fibres qui le composent. Le haut degré d'organisation du tissu musculaire le rend alors susceptible à de nombreuses atteintes (pathologies, lésions). Les mécanismes mis en jeu dans des conditions pathologiques tels que la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) seront également développés.

2. Myogénèse et développement du muscle squelettique

Le muscle squelettique dérive de cellules myogéniques du mésoderme embryonnaire. L'ensemble de la musculature du corps et des membres dérive des somites, structures embryonnaires segmentées émanant du mésoderme présomitique (Fig. 1). Chaque somite se compose d'un sclérotome ventral, à l'origine du squelette axial, et d'un dermomyotome épithélial dorsal à l'origine du derme et des muscles (caractérisés par l'expression de facteurs Pax3 et Pax7). Les premières cellules myogéniques, les myoblastes (caractérisées par l'expression des facteurs de détermination myogéniques Myf5, MyoD et/ou Mrf4) apparaissent aux bordures de ce dermomyotome. Elles s'accumulent, prolifèrent massivement et migrent ensuite entre le dermomyotome et le sclérotome pour former le myotome primaire, premier muscle squelettique du corps, essentiellement formé de cellules mononuclées post-mitotiques: myoblastes (pour revue: Buckingham, 2006). Certains myoblastes restent isolés avec leur potentiel mitotique, ils vont former les cellules satellites du muscle mature.

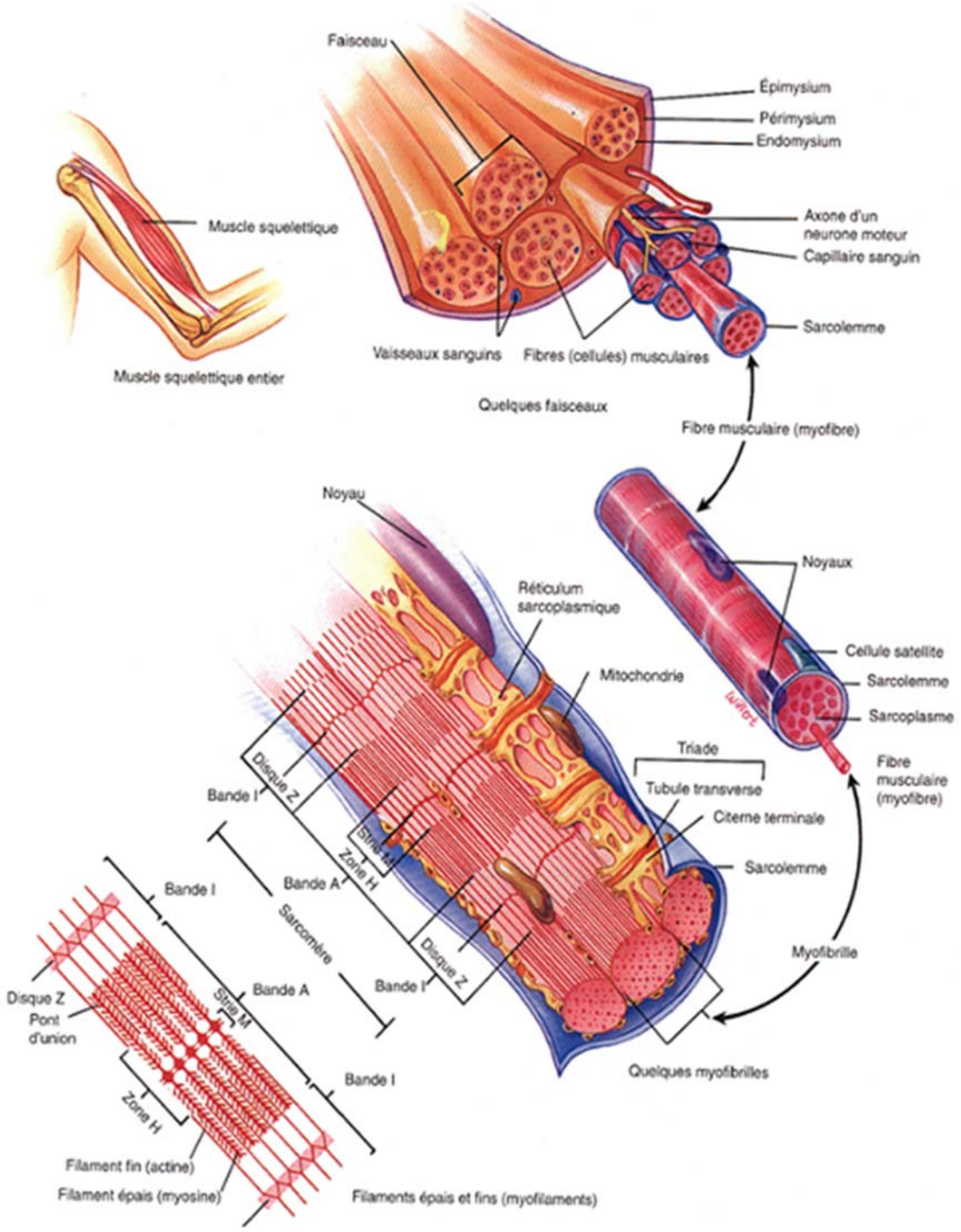


Figure 2: Anatomie du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique (www.theses.ulaval.ca/2004/21784/ch02.html).

Les autres myoblastes s'alignent et fusionnent pour donner de longues cellules cylindriques plurinucléées appelées myotubes. Il existe au moins deux populations distinctes de myoblastes, donnant naissance à deux types de myotubes. Les myoblastes précoces (observés en premier au cours du développement embryonnaire) forment, avant innervation, les myotubes primaires qui s'alignent et s'allongent pour constituer l'ébauche du muscle. Ces

myotubes primaires s'entourent d'une lame basale qui recouvre également les cellules mononuclées indifférenciées, situées à la périphérie.

Sous le contrôle de l'innervation, ces cellules indifférenciées vont proliférer, se différencier en myoblastes tardifs et fusionner pour former les myotubes secondaires. Au début, les myotubes primaires et secondaires partagent une membrane basale commune mais finalement, les myotubes secondaires vont par la suite s'entourer de leur propre lame basale et deviennent indépendants des myotubes primaires. Bien que ce processus soit général, il arrive toutefois, qu'une troisième voire une quatrième vague de prolifération et de fusion puisse survenir.

A ce moment, la synthèse de protéines contractiles, actine et myosine commence. Le passage de myotubes à myofibres matures se fait par la migration des noyaux initialement centraux vers la périphérie afin de laisser place dans le centre aux myofilaments qui occupent la quasi totalité de l'intérieur de la cellule. L'étape finale de la différenciation musculaire est la mise en place du système tubulaire transverse et du Réticulum Sarcoplasmique (RS) qui s'alignent sur les sarcomères laissant apparaître les striations caractéristiques de la fibre musculaire squelettique. Les myofibres continuent de croître au cours du développement pré- et post-natal, tant en longueur qu'en épaisseur.

Les cellules satellites sont des cellules mononuclées qui se situent entre la membrane plasmique et la lame basale des fibres musculaires (Fig. 1). Elles ont la particularité d'avoir quitté le cycle cellulaire durant les phases précoces du développement et d'être entrées dans une phase dite quiescente. Ces cellules ont un rôle majeur dans le processus de régénération musculaire. En effet, lors d'une lésion, d'un traumatisme ou lors d'une pathologie, les cellules satellites sont activées, se divisent et fusionnent pour donner de nouvelles fibres musculaires (pour revue: Grefte et al., 2007).

3. Organisation anatomique du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué d'un ensemble de faisceaux musculaires, chaque faisceau étant lui-même constitué de quelques dizaines à quelques milliers de fibres musculaires (Fig. 2). Chaque fibre musculaire est un cylindre d'un diamètre de 10 à 100 µm et une longueur pouvant atteindre quelques centimètres. Ces longues et fines fibres multinucléés sont parallèles les unes aux autres et la force de contraction s'applique dans le sens du grand axe de la fibre. Cette organisation donne à l'organe une structure en «poupées russes», chaque couche étant délimitée par une gaine conjonctive assurant une meilleure protection. Chaque fibre musculaire est enveloppée et séparée des autres par une mince couche de tissu conjonctif, l'endomysium (Fig. 3). Une couche plus épaisse de tissu conjonctif, le

périmysium, entoure des groupes de 10 à 150 fibres musculaires et les séparent en faisceaux. De petits vaisseaux et des axones moteurs traversent les espaces périmysiaux pour entrer en contact avec les fibres musculaires. Une épaisse couche de tissu conjonctif externe, l'épimysium, recouvre l'ensemble du muscle. Cette gaine protectrice se referme aux extrémités et s'unit aux autres enveloppes du tissu intramusculaire pour former le tissu conjonctif dense et fort des tendons.

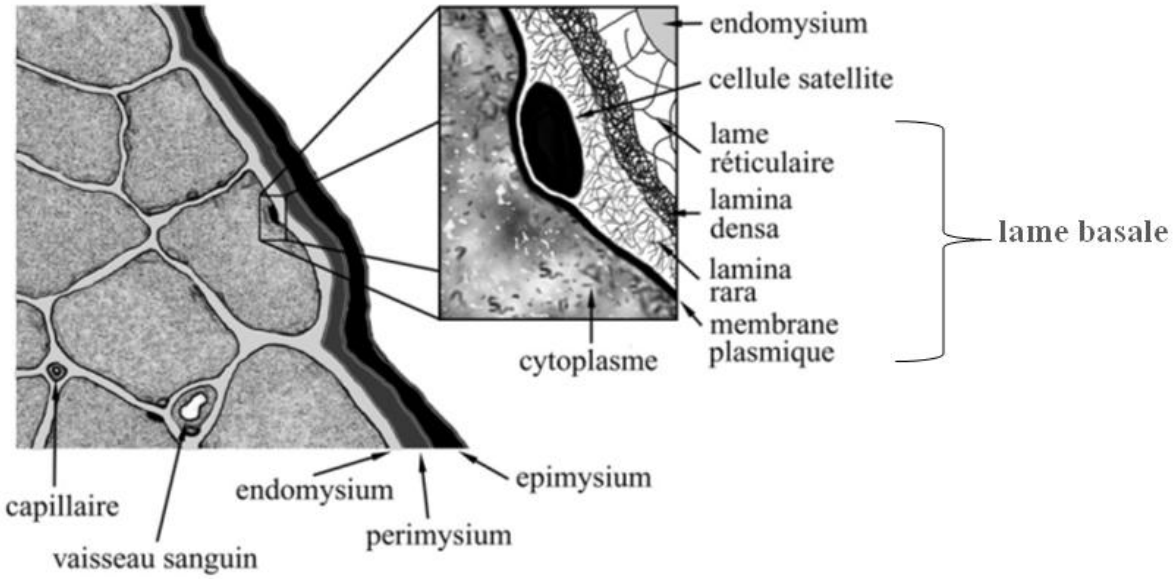


Figure 3: Ultrastructure du muscle squelettique.
Représentation schématique d'une micrographie de la coupe transversale d'un muscle de souris. Dans un muscle squelettique, chaque fibre musculaire est revêtue d'une fine gaine de tissu conjonctif, l'endomysium, les faisceaux des fibres musculaires sont délimités par une gaine plus épaisse appelée périmysium. L'ensemble du muscle est renforcé et recouvert par une gaine grossière de tissu conjonctif, l'épimysium (homepage.mac.com/.../histgen6/histgen6.htm).

4. Organisation cellulaire: ultrastructure du muscle squelettique

4.1. L'appareil contractile

Chaque fibre musculaire est constituée de petites unités fonctionnelles parallèles au grand axe de la fibre: les myofibrilles, séparées des myofibrilles adjacentes par le RS, les tubules Transverses (tubules T) et quelquefois les mitochondries (Fig. 2). Les myofibrilles constituent alors les éléments contractiles de la fibre musculaire squelettique. Elles varient de taille mais ont en moyenne environ 1 µm de diamètre, remplissant à peu près 80 % du volume d'une fibre musculaire. Le nombre de myofibrilles varie avec la taille de la fibre musculaire. Elles sont constituées d'une succession de sarcomères, eux-mêmes délimités par deux stries ou disques Z. L'alternance de bandes sombres A (A pour Anisotrope qui ne laisse pas passer la lumière) et de bandes claires I (I pour Isotrope qui laisse passer la lumière) au sein de chaque

sarcomère est à l'origine de la striation caractéristique des fibres musculaires. Ces striations si particulières sont en fait le résultat d'une organisation extrêmement ordonnée des filaments protéiques contractiles, nommés myofilaments. Ils sont essentiellement représentés par des filaments dits fins d'actine (5 à 7 nm de diamètre) et des filaments dits épais de myosine (12 à 16 nm de diamètre). Lorsqu'une cellule musculaire se contracte, chacun de ses sarcomères se raccourcit et les stries Z successives se rapprochent. Cependant, la longueur des filaments ne change pas: la contraction se fait par glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine, de telle sorte qu'ils se chevauchent davantage. Le Couplage Excitation/Contraction sera décrit dans le chapitre ***C***.

4.2. Les systèmes membranaires spécifiques

La cellule musculaire squelettique contient des systèmes membranaires spécifiques comme le sarcolemme (la membrane plasmique de la fibre) et le réticulum sarcoplasmique, qui constituent des éléments clés dans le contrôle de l'activité contractile. Ces deux systèmes interagissent au niveau de structures précises, les triades, de sorte que le signal électrique émanant de la jonction neuromusculaire soit transmis jusqu'au RS, qui libère le calcium nécessaire à la contraction.

4.2.1. Le sarcolemme

En microscopie électronique, la surface de la fibre musculaire apparaît composée de trois structures: l'endomysium, la lame basale et le sarcolemme (Fig. 3). Les nombreux noyaux d'une fibre musculaire squelettique sont situés juste sous le sarcolemme. Ce dernier n'est pas une surface plane mais présente de nombreuses invaginations telles que les cavéoles et les tubules Transverses (dits tubules T) qui accroissent la surface cellulaire. Les tubules T forment un réseau d'invaginations profondes du sarcolemme spécifiques des muscles striés. Ils s'intercalent entre les myofibrilles et envoient des ramifications autour de chaque sarcomère (Fig. 2). L'ouverture des tubules T à l'extérieur de la fibre leur permet de se remplir de liquide extracellulaire et permet l'acheminement de substances nutritives provenant de l'extérieur vers l'intérieur de la fibre. Les potentiels d'action musculaires se propagent le long du sarcolemme et par les tubules T, ce qui assure leur diffusion rapide à l'ensemble de la fibre et l'excitation presque simultanée de toutes les parties de la fibre. A l'intérieur du sarcolemme ou myoplasme, se trouve le sarcoplasme soit le cytoplasme d'une fibre musculaire.

4.2.2. Le réticulum sarcoplasmique

Le RS est un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération de calcium et dans la synthèse protéique. C'est un système de sacs membraneux emplis de liquide qui entoure chaque myofibrille (Fig. 2). Les portions dilatées du RS proches des tubules T sont appelées citernes terminales. Un tubule transverse et les deux citernes terminales associées forment une structure caractéristique appelée triade (Fig. 2). C'est la libération de calcium des citernes terminales qui déclenche la contraction musculaire.

5. Classification des différents types de fibres musculaires

Au XVIIème siècle déjà, un certain nombre d'auteurs avaient noté le fait que les muscles étaient différents dans leur apparence mais ce n'est qu'en 1873 que Louis Antoine Ranvier, un médecin physiologiste français, a découvert que les muscles squelettiques ne différaient pas seulement dans leur couleur mais avaient également des propriétés contractiles différentes. Les fibres squelettiques riches en myoglobines sont appelées les fibres musculaires rouges et celles qui en contiennent peu, fibres musculaires blanches. Les fibres musculaires rouges contiennent également plus de mitochondries pour la production d'ATP et sont irriguées par un plus grand nombre de capillaires sanguins. Les fibres musculaires se contractent et se relâchent à des vitesses différentes. Une fibre musculaire sera qualifiée de lente ou de rapide selon la vitesse à laquelle l'ATPase de ses têtes de myosine hydrolyse l'ATP. Nous avons également des fibres qui se différencient par les réactions métaboliques qu'elles utilisent pour produire de l'ATP et par la vitesse à laquelle elles se fatiguent. A partir de ces caractéristiques structurales et fonctionnelles, les fibres musculaires squelettiques sont réparties en trois grandes catégories: les fibres oxydatives lentes de type I, les fibres oxydatives-glycolytiques rapides de type IIa et les fibres glycolytiques rapides de type IIb. Les principaux critères de classification sont repris dans le tableau 1 ci dessous.

Caractéristiques fonctionnelles	**Fibres oxydatives lentes de type I**	**Fibres oxydatives-glycolytiques rapides de type IIa**	**Fibres glycolytiques rapides de type IIb**
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Métabolisme	Très élevée; oxydatif	Intermédiaire; oxydatif et glycolytique	Faible; glycolytique
Activité de l'ATPase de la myosine	Lente	Rapide	Rapide
Résistance à la fatigue	Elevée	Intermédiaire	Faible
Couleur	Rouges	De roses à rouges	Blanches

Tableau 1: Classification des fibres musculaires squelettiques

B. Systèmes de régulation du calcium intracellulaire dans le muscle squelettique

1. Introduction générale: le calcium

En 1883, Sydney Ringer est le premier scientifique à mettre en évidence le rôle prépondérant du calcium dans la contraction cardiaque chez la grenouille (Miller, 2004). Dès lors, de nombreuses études ont montré le rôle du calcium dans de nombreux processus cellulaires tels que la contraction musculaire, la fécondation, la prolifération, la sécrétion, la différenciation et la motilité cellulaires.

La membrane plasmique constitue une barrière qui sépare le milieu extracellulaire du milieu intracellulaire empêchant les mouvements libres d'ions d'un compartiment à un autre. Elle permet de réguler la communication entre ces compartiments. Certains ions comme le calcium (Ca^{2+}), le messager secondaire ubiquitaire, peuvent diffuser à travers la membrane suivant le gradient électrochimique par des protéines membranaires que sont les canaux. Le calcium libre dans le milieu extracellulaire est d'environ 1 mM alors que la concentration du calcium cytosolique au repos est approximativement de 100 nM. Il y a donc 10 000 fois plus de calcium à l'extérieur, ce qui génère une force très importante favorisant son entrée dans la

cellule. Certains organites intracellulaires tels que le Réticulum Endoplasmique (RE) et RS ont une concentration de calcium luminal libre allant de 0,2 à 1 mM. Ce gradient calcique entre les compartiments est essentiel pour la survie cellulaire. Des stimulations par des agonistes comme les cytokines, les hormones, les facteurs de croissance et autres résultent en une augmentation du calcium cytosolique qui régulera par la suite de nombreuses fonctions cellulaires. Ces variations de calcium sont sous forme d'un signal On/Off codé en amplitude et en durée (Fig. 4). Dans certaines conditions pathologiques, une augmentation durable et mal régulée en calcium peut activer des processus calcium-dépendants à l'origine de la mort cellulaire. Ainsi, la survie cellulaire est sous le contrôle strict du taux de calcium intracellulaire. Il existe alors des systèmes de repompage et des systèmes tampons dans les différents compartiments cellulaires pour maintenir un niveau de calcium intracellulaire bas.

D'une manière générale, l'augmentation de calcium intracellulaire dans le muscle squelettique est due:

-soit à une libération de calcium à partir des réserves internes au niveau du RS.

-soit à une entrée de calcium venant du milieu extracellulaire par l'intermédiaire de canaux calciques présents au sarcolemme (Fig. 4).

Ce chapitre décrit les principaux acteurs pour le maintien de l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique.

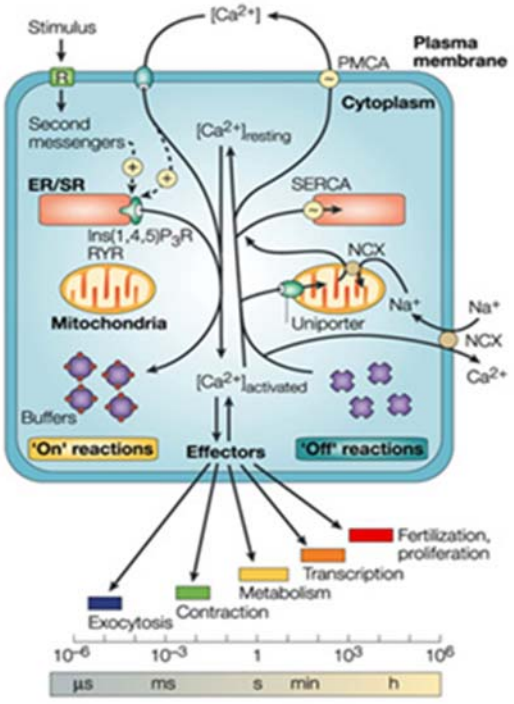


Figure 4: Principaux mécanismes impliqués dans l'homéostasie calcique (Berridge et al., 2003).

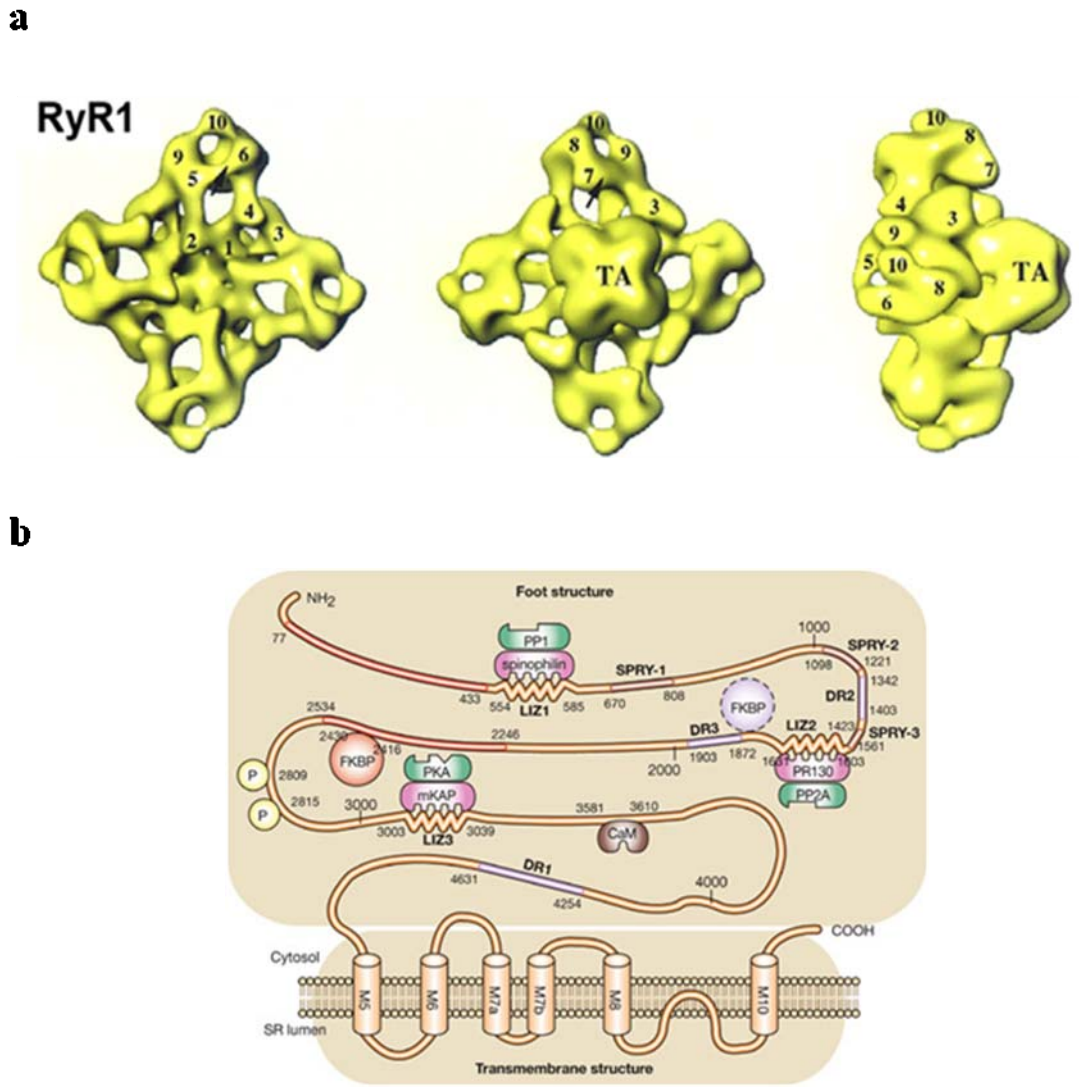


Figure 5: Le récepteur à la ryanodine.
a) Reconstruction 3D du RyR1 (de type muscle squelettique) (Fleischer, 2008). A gauche, face aux tubules T; au milieu, face aux citernes terminales et à droite, vue de côté.
b) Structure primaire du RyR et ses domaines de liaison avec les phosphatases 1 et 2A, la protéine kinase A, la calmoduline et FKBP12.6 (Yano et al., 2006).
CaM, calmoduline; DR, région divergente; LIZ, Leucine–Isoleucine Zipper; PKA, protéine kinase A; PP, protéine phosphatase; SR, sarcoplasmic reticulum.

2. Les stocks intracellulaires

2.1. Le réticulum sarcoplasmique

2.1.1. Les Récepteurs à la Ryanodine (RyR)

Au début des années 80, l'identité moléculaire des canaux calciques spécialisés dans la libération de calcium à partir du RS était peu connue. C'est la ryanodine, qui est un alcaloïde d'origine végétale (*Ranya speciosa*), à propriété insecticide, qui a permis d'identifier et d'isoler le canal responsable de la sortie du calcium vers le cytoplasme. Grâce à la haute affinité de la ryanodine pour son récepteur, les RyR ont pu être isolés et purifiés à partir des citernes terminales dans le muscle squelettique par Inui et Fleischer (Inui et Fleischer, 1988).

Le RyR est un canal homotétramérique présent chez les mammifères. Il est sélectif aux cations divalents et monovalents (Tinker et Williams, 1992). Il apparaît très peu sélectif au calcium (pour revue: Fill et Copello, 2002). Il existe trois isoformes différentes chez les mammifères codées par 3 gènes différents situés sur 3 chromosomes différents: RyR1 et RyR3 présents dans le muscle squelettique (mais l'expression de RyR3 disparaît dans le muscle squelettique adulte à l'exception du diaphragme), RyR2 dans le muscle cardiaque et RyR3 dans le cerveau (pour revue: Ogawa, 1994). Ils présentent entre eux 70 % d'homologies de séquences et de similarités de structure. Le RyR est un gros canal formé de 4 sous unités identiques reproduisant la structure en trèfle (Fig. 5a). Un monomère est un polypeptide de 5037 acides aminés (aa) avec un poids moléculaire de 565 kDa (Takeshima et al., 1989; Marks et al., 1989). La large partie N-terminale constitue le domaine cytoplasmique que nous appelons le pied (résidus 1-4000). La petite partie C-terminale (résidus 4000-5037) est constituée de domaines transmembranaires et formerait le pore du canal. Le nombre de domaines transmembranaires du côté C-terminal varie de 4 à 12 domaines transmembranaires selon les modèles cellulaires (Fig. 5b). Les résidus 4894-4971 du RyR1 dans le muscle squelettique formeraient le filtre ionique du canal (pour revue: Ogawa, 2008). RyR1 est exprimé de manière prépondérante dans le muscle squelettique de mammifères et permet la libération calcique des stocks du RS dans le cytoplasme durant le mécanisme d'excitation-contraction. Des mutations de ce canal sont associées à des maladies musculaires humaines sévères telles que l'Hyperthermie Maligne (HM) et la myopathie congénitale à core centraux (MCC pour Myopathie à Core Central).

L'activité des RyR est modulée par de nombreux facteurs, comme des agents physiologiques, des processus cellulaires (phosphorylation, oxydation), certains agents pharmacologiques

(pour revue: Fill et Copello, 2002). Les RyR sont activés par le Ca^{2+} cytosolique à faible concentration (1-10 µM), l'ATP, le c-ADP-ribose, l'AMPc, la caféine et la ryanodine à faible concentration (nM). Le Ca^{2+} cytosolique à forte concentration (1-10 mM), le Mg^{2+}, le rouge de ruthénium, la ryanodine à forte concentration (µM) induisent l'inhibition du canal. Le RyR est associé de façon non covalente à de nombreuses protéines qui modifient aussi son activité telles que la calséquestrine, la calréticuline, la jonctine, la triadine, la calmoduline, le FK506, le FKPB12 et le DHPR (pour revue: Fill et Copello, 2002 et Fleischer, 2008). Son état de phosphorylation module également son activité (Hain et al., 1994; pour revue: Fleischer, 2008). Les sites de fixation de la calmoduline, du calcium, du FKBP et les sites de phosphorylation se situent dans la partie cytoplasmique. Quant aux sites de fixation de la ryanodine, ils se situent dans la partie C-terminale près du pore ionique (pour revue: Monnier et Lunardi, 2000).

2.1.2. Les Récepteurs à l'Inositol trisPhosphate: les RIP_3

Après d'intensives études sur la protéine P400 dans les cellules de Purkinje, plusieurs équipes ont découvert grâce à la solubilisation et à la purification, que cette protéine P400 était en fait le RIP_3 (Mikoshiba et al., 1979; pour revues: Berridge et Irvine, 1984 et Mikoshiba, 2007). C'est d'ailleurs le groupe de Mikoshiba et collaborateurs qui, 10 ans plus tard, a identifié la séquence primaire des RIP_3 et l'a identifié comme étant une protéine transmembranaire (Furuichi et al., 1989). Les RIP_3 seraient principalement localisés au niveau du RE et joueraient de nombreux rôles (dans la fertilisation, la sécrétion salivaire, dans la prolifération cellulaire, dans la plasticité synaptique pour la mémoire et l'apprentissage, dans la contraction cardiaque etc.) grâce à leur niveau d'expression différent dans divers types cellulaires (Berridge, 2009).

La production d'IP_3 se fait grâce à des stimulations externes qui vont alors activer des récepteurs couplés à des protéines G trimériques ou des récepteurs à activité tyrosine kinase présents à la membrane plasmique. Ces derniers vont activer la PhosphoLipase C (PLC) qui va alors hydrolyser le PhosphatidylInositol 4,5-biPhosphate (PIP_2) pour produire l'Inositol 1,4,5-trisPhosphate (IP_3) et le DiAcylGlycérol (DAG). L'IP_3 produit, joue alors le rôle de second messager et se fixe à la partie N-terminale des RIP_3 qui vont alors libérer du Ca^{2+} provenant des stocks intracellulaires du RE vers le cytoplasme (pour revue: Yoshida et Imai, 1997).

Les RIP_3 font partie de la superfamille des canaux ioniques avec six domaines transmembranaires mais ils sont uniques dans leur localisation au niveau du RE et dans leur

double régulation par deux messagers secondaires, IP_3 et le Ca^{2+}. C'est une protéine exprimée de manière ubiquitaire avec un poids moléculaire allant de 220 à 260 kDa. 3 isoformes codées par des gènes différents existent chez les mammifères avec chacune une affinité différente pour l'IP_3: RIP_3 de type 1, RIP_3 de type 2 et RIP_3 de type 3. Il existerait deux autres isoformes mais les séquences sont partielles (Ross et al., 1992).

Le RIP_3 de type 1 est celui qui est le plus caractérisé du point de vue structure-fonction. La structure des RIP_3 est traditionnellement divisée en 3 domaines fonctionnels distincts: le domaine N-terminal de liaison à l'IP_3, le domaine dit modulateur/couplage et le domaine transmembranaire C-terminal formant le pore (Fig. 6) (Furuichi et al., 1989; pour revue: Mikoshiba et al., 2007). Il n'existe qu'un site de liaison de l'IP_3 sur son récepteur, sachant que le RIP_3 est un tétramère, il peut lier 4 molécules d'IP_3. Au niveau du domaine de couplage, des sites de fixation pour l'ATP, le Ca^{2+}, la calmoduline, le FKBP12 et des sites de phosphorylations pour différentes kinases (PKA, PKG, CaMKII) sont présents et permettent une modulation de l'activité des RIP_3. Le troisième domaine qui est la partie C-terminale est composé de 6 domaines transmembranaires qui vont constituer le canal calcique. Le pore calcique se situe entre les domaines transmembranaires 5 et 6. C'est un canal cationique non sélectif perméable, entre autres, au calcium et aux cations monovalents comme les RyR (pour revue: Yoshida et Imai, 1997).

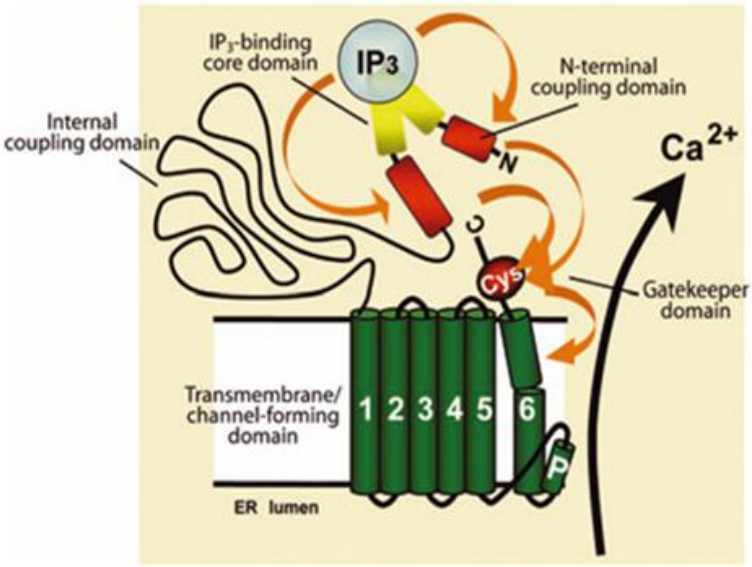


Figure 6: Le récepteur IP_3.
Organisation structurale du RIP_3 de type 1 (Mikoshiba, 2007). La structure du RIP_3 est divisée en 3 domaines fonctionnels: le domaine N-terminal de liaison à l'IP_3, le domaine dit modulateur/couplage et le domaine transmembranaire C-terminal formant le pore .

L'ouverture des RIP_3 peut être inhibée par un antagoniste compétitif, l'héparine (pour revue: Ehrlich et al., 1994), par le 2-APB (2-AminoethoxydiPhényl Borate) (Maruyama et al., 1997). La caféine (mM) et la cyclosporine A sont aussi connues pour être des inhibiteurs de l'isoforme 1 des RIP_3 (Maes et al., 1999; Genazzani et al., 1999).

Le rôle de l'IP_3 dans la mobilisation du calcium provenant des citernes terminales du RS de fibres musculaires squelettiques chez le lapin (Volpe et al., 1985) et chez la grenouille (Vergara et al., 1985) a été montré pour la première fois dans les années 80. Son rôle dans le muscle squelettique n'est pas tout à fait déterminé notamment son rôle dans le Couplage Excitation-Contraction dans les fibres musculaires squelettiques qui est très controversé (Vergara et al., 1985; pour revue: Volpe et al., 1986; Hannon et al., 1992; Jaimovich et al., 2000). En effet, dans des cultures de myotubes de rat et de souris, la dépolarisation induit deux types de réponses calciques: une vague lente portée par les RIP_3 et une vague rapide et massive grâce aux RyR impliqués dans la contraction musculaire. Les RIP_3, eux, seraient impliqués dans les libérations calciques secondaires et plus durables (Jaimovich et al., 2000). Et par sa localisation enrichie au niveau du noyau (Liberona et al., 1998) ou dans les compartiments périnucléaires (Jaimovich et al., 2000), les RIP_3 auraient un rôle dans la régulation d'expression de gène pendant le développement musculaire (Jaimovich et al., 2000). Powell et collaborateurs ont montré un rôle dans la régulation de transcription de gènes où la voie IP_3 agirait sur la phosphorylation de CREB et de ERK dans des cultures primaires de souris (Powell et al., .2001). Nous parlons alors d'un rôle dans le Couplage Excitation/Transcription.

2.1.3. La pompe Ca^{2+} ATPase: la SERCA

La Sarco/Endo Reticulum Calcium ATPase appartient à la famille des ATPases de type P (pour Phosphorylation). Elle est exprimée dans la membrane du réticulum de différents tissus chez les mammifères sous trois groupes principaux: SERCA1 à 3 codées par 3 gènes différents. Les SERCA1 et 2 se divisent par épissage alternatif en deux sous groupes SERCA1a et b puis SERCA2a et b. Le poids moléculaire des SERCA dans le muscle est de 110 kDa. MacLennan et ses collaborateurs ont construit un modèle structural de la protéine SERCA qui se divise en 3 domaines (MacLennan et al., 1985; pour revue: MacLennan et al., 1997): la tête cytoplasmique, le domaine transmembranaire (10 segments transmembranaires) et la partie se situant dans la lumière du RE (Fig. 7). Le domaine transmembranaire contient les deux sites de fixation du calcium et permet la translocation de cet ion à travers la membrane du réticulum. Les parties N et C-terminales sont exposées dans la surface

cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique forme la tête à activité ATPasique représentant 70 % de la protéine. Ce dernier est composé de deux boucles principales, la première et la plus large contenant le site catalytique/phosphorylation et le domaine de liaison à l'ATP (Phosphorylation Domain, Nucleotide Domain, β-strand Domain). La deuxième boucle plus petite est impliquée dans le changement de conformation de la SERCA permettant le couplage hydrolyse de l'ATP/transport du calcium (Stalk) (pour revue: Martonosi et Pikula, 2003).

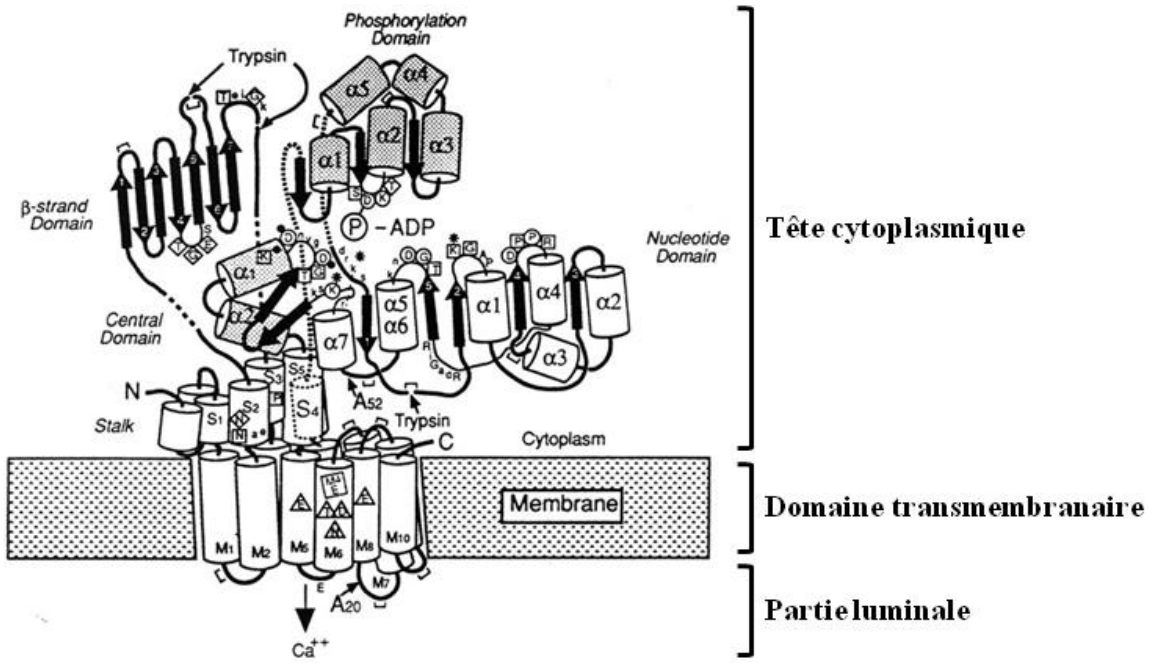


Figure 7: La pompe SERCA.
Modèle structural de la protéine SERCA qui se divise en 3 domaines: la tête cytoplasmique, le domaine transmembranaire (10 domaines transmembranaires) et la partie se situant dans la lumière du RE/RS (Martonosi et Pikula, 2003).

Le mécanisme de transport consiste en la fixation de deux ions Ca^{2+} dans la partie cytoplasmique puis en l'hydrolyse d'une molécule d'ATP et la fixation d'un phosphate qui entraîne l'occlusion des sites de transport. Enfin, les deux ions calcium se dissocient dans la partie transmembranaire et sont transportés du cytoplasme vers le RE/RS. Ce mécanisme est réversible sous certaines conditions induisant la formation d'une molécule d'ATP (pour revue: Martonosi et Pikula, 2003).

Le rôle de la SERCA dans le muscle squelettique est l'expulsion du calcium cytoplasmique vers son lieu de stockage, le RS. La SERCA1 est exprimée exclusivement dans le muscle squelettique et préférentiellement dans les fibres musculaires rapides. SERCA1a est exprimée chez l'adulte alors que SERCA1b est exprimée chez le nouveau-né. SERCA2 est prédominante dans les fibres musculaires lentes (Brandl et al., 1987). Le défaut du gène ATP2A1 codant la SERCA1 entraîne la myopathie récessive de Brody. La vitesse du

transport de Ca^{2+} est diminuée et conduirait à un degré moindre de relâchement musculaire. Les SERCA ont un rôle important dans le maintien d'une concentration cytoplasmique en calcium autour de 100 nM au repos. En effet, lors de la contraction musculaire où la concentration en calcium augmente, l'activité des SERCA est stimulée afin de permettre un retour au taux de calcium basal très rapidement. Nous parlons alors d'un rôle primordial dans l'étape de relaxation.

La SERCA est régulée par deux protéines endogènes de faible poids moléculaire: le phospholamban et la sarcolipine. Leurs fixations à la pompe SERCA vont diminuer son affinité au calcium et alors entraîner la diminution de son activité (pour revue: MacLennan et Kranias, 2003). Plusieurs agents pharmacologiques sont connus pour inhiber la pompe ATPase comme le vanadate, la thapsigargine (inhibiteur irréversible), le CPA (CycloPiazonic Acid), inhibiteur réversible), le DBHQ (2,5-Di(ter-butyl)-1,4-BenzoHydroQuinone) et le Br_2-TITU (1,3-dibromo-2,4,6-tris (methyl-isothio-uronium) benzene) (pour revue: Inesi et al., 2005).

2.2. Les mitochondries

Les mitochondries sont des organites intracellulaires dont la taille est de 1 à 10 µM de long et de 0,5 à 1 µM de large. Leur rôle physiologique est primordial, puisque c'est dans les mitochondries que l'énergie fournie par les molécules organiques est récupérée puis stockée sous forme d'ATP, la source principale d'énergie pour la cellule. Elles sont capables de s'adapter à une demande accrue d'énergie dans le muscle squelettique lors d'un exercice physique. D'ailleurs le nombre, la taille et la localisation varient selon les fibres lentes ou rapides. Les mitochondries se composent d'une bicouche phospholipidique, une membrane externe, une membrane interne avec de nombreux replis ou crêtes et comportent une matrice qui est l'espace entre les crêtes de la membrane interne. Les mitochondries agissent aussi comme actrices principales dans l'apoptose cellulaire (pour revue: Jeong et Seol, 2008).

2.2.1. Les Mitochondries et l'homéostasie calcique

Contrairement au RE/RS, cet organite n'est pas considéré comme un site de stockage du calcium du fait de son contenu faible en calcium. Néanmoins, les mitochondries sont capables de recapter le calcium (Fig. 8) qui entre au préalable dans la cellule via des canaux SOCs (Store-Operated Channels) grâce à leurs localisations à proximité du sarcolemme (Hoth et al., 1997; Gilabert et Parekh, 2000; pour revues: Parekh, 2003 et Franzini-Armstrong, 2007). Elles sont aussi capables de faire des échanges de calcium avec le RS pendant la

dépolarisation grâce à leurs localisations au voisinage des sites de libération du calcium provenant du RS (Challet et al., 2001; Arnaudeau et al., 2001; pour revues: Parekh, 2003 et Franzini-Armstrong, 2007). En bref, les mitochondries ont un rôle dans la modulation de l'homéostasie calcique afin de maintenir un taux de calcium cytoplasmique normal par des échanges avec le cytoplasme et le RS lors du cycle de contraction/relaxation musculaire dans les fibres musculaires et suite aux SOCEs (Store-Operated Calcium Entries) (Gailly, 2002; pour revues: Constantin et al., 2006; Franzini-Armstrong, 2007). Mais celles-ci auraient un rôle secondaire dans le maintien du taux de calcium intracellulaire dans les conditions physiologiques car son système de recapture est limité et demande beaucoup d'énergie. Elles interviendraient surtout dans les conditions pathologiques. Pour exemple, Robert en 2001 et Vandebrouck en 2006 ont montré de manière indépendante que le système de repompage du calcium par les mitochondries était augmenté dans les myotubes de la lignée myogénique déficiente en dystrophine Sol8 et les myotubes *mdx* déficients en dystrophine (Robert et al., 2001; Vandebrouck et al., 2006**)**. Ces résultats suggèrent que les mitochondries sont une cible potentielle dans la dérégulation de l'homéostasie calcique dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne.

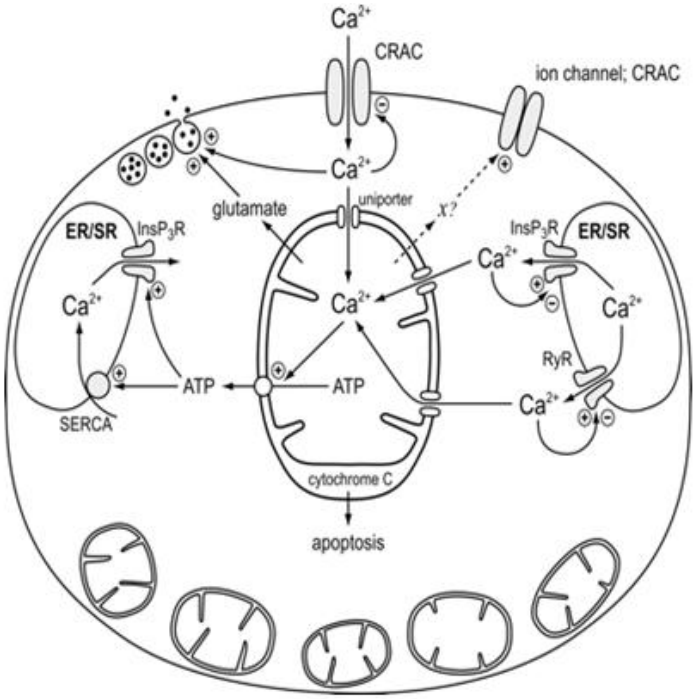


Figure 8: Différentes voies de recapture calcique par les mitochondries (Parekh, 2003).
CRAC, Ca^{2+} Release-Activated Ca^{2+} current; RyR, Ryanodine Receptor; SERCA, Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase; SR, Sarcoplasmic Reticulum; VOCC, Voltage-Operated Ca^{2+} Channel.

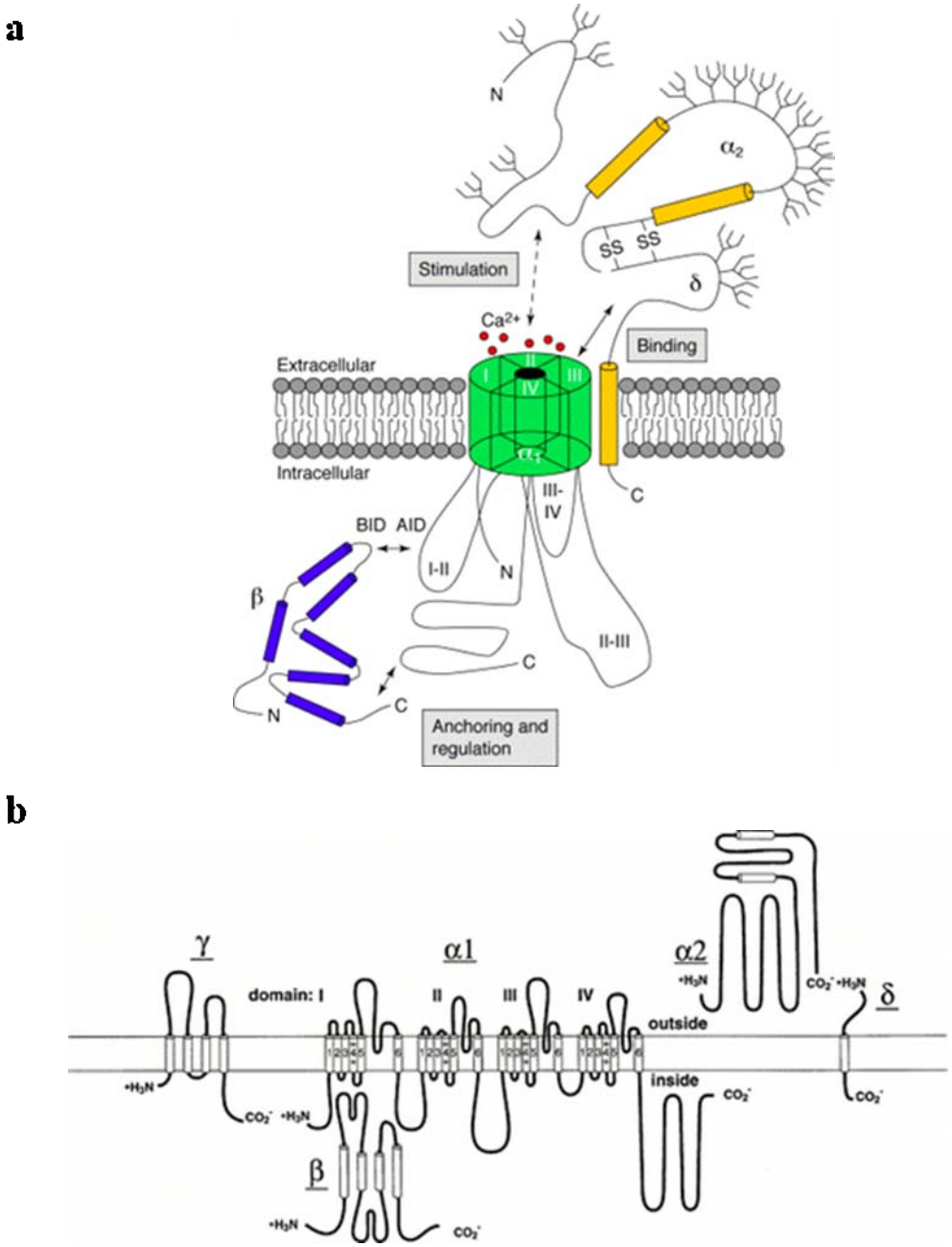


Figure 9: Les canaux calciques voltage-dépendants.
a) Organisation structurale des quatre sous unités constituant les canaux calciques voltage-dépendants. Le canal calcique de type L contient une cinquième sous unité appelée γ (Walker et De Waard, 1998).
b) Topologie membranaire présumée des cinq sous unités α1, β, α2/δ et γ du canal calcique de type L (Hockerman et al., 1997)

3. Le sarcolemme

3.1. Les canaux calciques du sarcolemme

3.1.1. Les canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques de type L

Le canal calcique de type L (L pour Long lasting) est un membre de la famille des canaux ioniques dits voltage-dépendants. Il est caractérisé par sa sensibilité aux DiHydroPyridines (DHP). Il s'exprime aussi bien dans les tissus non excitables que dans les tissus excitables tels que les muscles squelettique et cardiaque, les cellules endocrines, les neurones et autres. Ce canal est caractérisé par une cinétique lente et un haut seuil d'activation. Il a été montré dans des cultures de cellules musculaires squelettiques de rat et humaines mais également dans les fibres musculaires que le seuil d'activation du courant calcique lent se situe autour de -30 mV (Cognard et al., 1986a; Rivet et al., 1990; Imbert et al., 2001; Friedrich et al., 2004). Il est largement exprimé dans les tubules T du muscle squelettique où il joue son rôle dans le Couplage Excitation/Contraction (Potreau et Raymond, 1980; Fosset et al., 1983).

Le canal calcique de type L est un large complexe hétéromultimérique de 465 kDa comprenant cinq sous unités: α1, α2, β, γ et δ (Fig. 9a). La sous unité γ est spécifique du muscle squelettique (Fig. 9b). La séquence complète de la sous unité α1 a été déterminée par clonage et séquençage de son ADN complémentaire en 1987 par l'équipe de Tanabe permettant ainsi de mettre en évidence sa structure (Tanabe et al., 1987). La sous unité α1, hydrophobe, qui constitue le pore ionique est constituée de 4 domaines transmembranaires homologues (I-IV) eux même organisés en 6 segments transmembranaires (S1-S6). Cette sous unité contient les sites de fixation pour les DHP et constitue alors le DHPR (DiHydroPyridine Receptor). Le quatrième segment S4 de chaque domaine transmembranaire contient des résidus chargés positivement (Lys ou Arg). Des mutations de ces résidus en résidus négatifs ou non chargés conduisent à une diminution de la sensibilité au voltage. Ce segment représente donc le détecteur de voltage. De même, des analyses de chimères de la sous unité α1 dans les muscles cardiaque et squelettique ont permis de mettre en évidence que le segment S3 au niveau du domaine I et la région adjacente S4 étaient déterminants pour l'activation du canal. Des acides aminés au niveau du segment S6 et le lien raccordant S5 et S6 pour chacun des quatre domaines transmembranaires contribuaient au pore ionique et plus particulièrement le lien raccordant S5 et S6 est important pour la sélectivité et la conductance

ioniques du canal. Le segment S6 du premier domaine et la boucle intracellulaire liant le domaine I et II sont impliqués dans l'inactivation voltage-dépendante du canal. Cette boucle cytoplasmique interagit avec la sous unité β cytoplasmique. La grande boucle reliant les domaines II et III de la sous unité α1 est impliquée dans le Couplage Excitation/Contraction. Une mutation au niveau de la boucle reliant le domaine III et IV est liée à l'Hyperthermie Maligne entraînant une libération calcique anormale. La sous unité α2 extracellulaire du canal est liée étroitement à la sous unité transmembranaire δ par des ponts disulfures (pour revues: Leong et MacLennan, 1998 et Treinys et Jurevicius, 2008). Le rôle des sous unités auxiliaires β1a, α2δ-1 et γ1 dans le muscle squelettique est très controversé. Elles moduleraient l'activité du canal en agissant au niveau de la sous unité α1s. Elles seraient aussi impliquées dans la translocation de la sous unité α1s du RS au sarcolemme. Mais la sous unité β1a participerait plus particulièrement à l'interaction de la sous unité α1 avec le canal RyR1 (pour revues: Flucher et al., 2005 et Melzer et al., 2006) donc serait importante dans le Couplage Excitation/Contraction.

Ce canal est caractérisé par sa sensibilité aux DHP. Certains d'entre eux bloquent les courants calciques de type L (nifédipine, nitrendipine, nicarpadine, PN 200-110), d'autres les activent (Bay K 8644) (Cognard et al., 1986b et c; Charnet et al., 1994; pour revue: Treinys et Jurevicius, 2008). D'autres composés organiques, tels que les PhenylAlkylAmines (PAA comme le verapamil) et les BenzoThiaZépines (BTZ comme le diltiazem) inhibent l'activité du canal. Leurs sites de fixation se situent au niveau de l'extrémité C-terminale de la sous unité α1 (pour revue: Treinys et Jurevicius, 2008). De même, certains ions inorganiques tels que le Cd^{2+}, le Co^{2+}, le La^{3+} et le Ni^{2+} bloquent le canal calcique de type L du fait de leurs perméabilités très réduites. En revanche, d'autres ions divalents tels que le Ba^{2+} ou le Mg^{2+} traversent le canal générant alors un courant. Les protons agissent également sur le canal en diminuant sa conductance ionique. Enfin, Il existe des sites de liaison aux protéines kinases telles que la CaMKII, PKA, PKC et PKG au niveau de la partie C-terminale de la sous unité α1 régulant alors l'activité du canal (pour revue: Treinys et Jurevicius, 2008).

Les canaux calciques de type T

Deux types de canaux voltage-dépendants ont été décrits dans le muscle squelettique en culture: les canaux calciques de type L (décrits ci-dessus) générés par la sous unité $Ca_v1.1/\alpha_{1s}$ qui joue son rôle crucial dans le Couplage Excitation/Contraction et les canaux calciques de type T générés par la sous unité $Ca_v3.2/\alpha_{1H}$ (Cognard et al., 1986a; Berthier et al., 2002) présents de manière transitoire au cours du développement du muscle squelettique suggérant

alors un rôle spécifique au cours de la maturation du muscle. Mais ses implications restent à ce jour encore obscures. Le canal calcique de type T semble être impliqué dans le processus de fusion des myoblastes humains (Bijlenga et al., 2000), dans la myogenèse prénatal des muscles squelettiques de souris, c'est-à-dire la fusion des myoblastes de souris et d'autres étapes précoces de différenciation (Berthier et al., 2002). D'autres travaux, au contraire, démontrent clairement que ces canaux ne sont pas impliqués dans l'initiation de la fusion de myoblastes de souris C2C12 (Bidaud et al., 2006). De manière intéressante, une équipe a montré récemment une corrélation entre la sénescence des cellules satellites murines et humaines spécialisées dans la régénération musculaire et le défaut d'activité des canaux de type T (Luin et al., 2008).

Le canal est caractérisé par une activation et une inactivation à des potentiels très bas (activation à -65 mV et inactivation à -60 mV sur des cultures primaires de rat (Cognard et al., 1986a). Le canal est donc dit à bas seuil ou Low Voltage Activated (LVA) dans la littérature anglo-saxonne par opposition au canal calcique de type L qui est High Voltage Activated (HVA). Il a une cinétique d'activation et d'inactivation rapide et a une faible conductance. Il est insensible aux DHP (Cognard et al., 1986a) et est hautement sensible à l'amiloride, au mibéfradil, phenytoin, ethosoximide agissant en tant que bloqueurs puissants. Le courant ICa_T est également inhibé par des cations tels que le Ni^{2+}, Cd^{2+} et La^{3+} (pour revue: Lacinova, 2005).

3.1.2. Les canaux calciques non voltage-dépendants

Il existe plusieurs types de canaux non voltage-dépendants présents à la membrane plasmique: les SOCs (Store-Operated Channels), les SACs (Stretch-Activated Channels), les ROCs (Receptor-Operated Channels) (ou SMOCs pour Second Messenger-Operated Channels) et les ECCs (Excitation-Coupled Channels). L'un ou l'autre de ces canaux sont à l'origine des courants décrits ci-dessous.

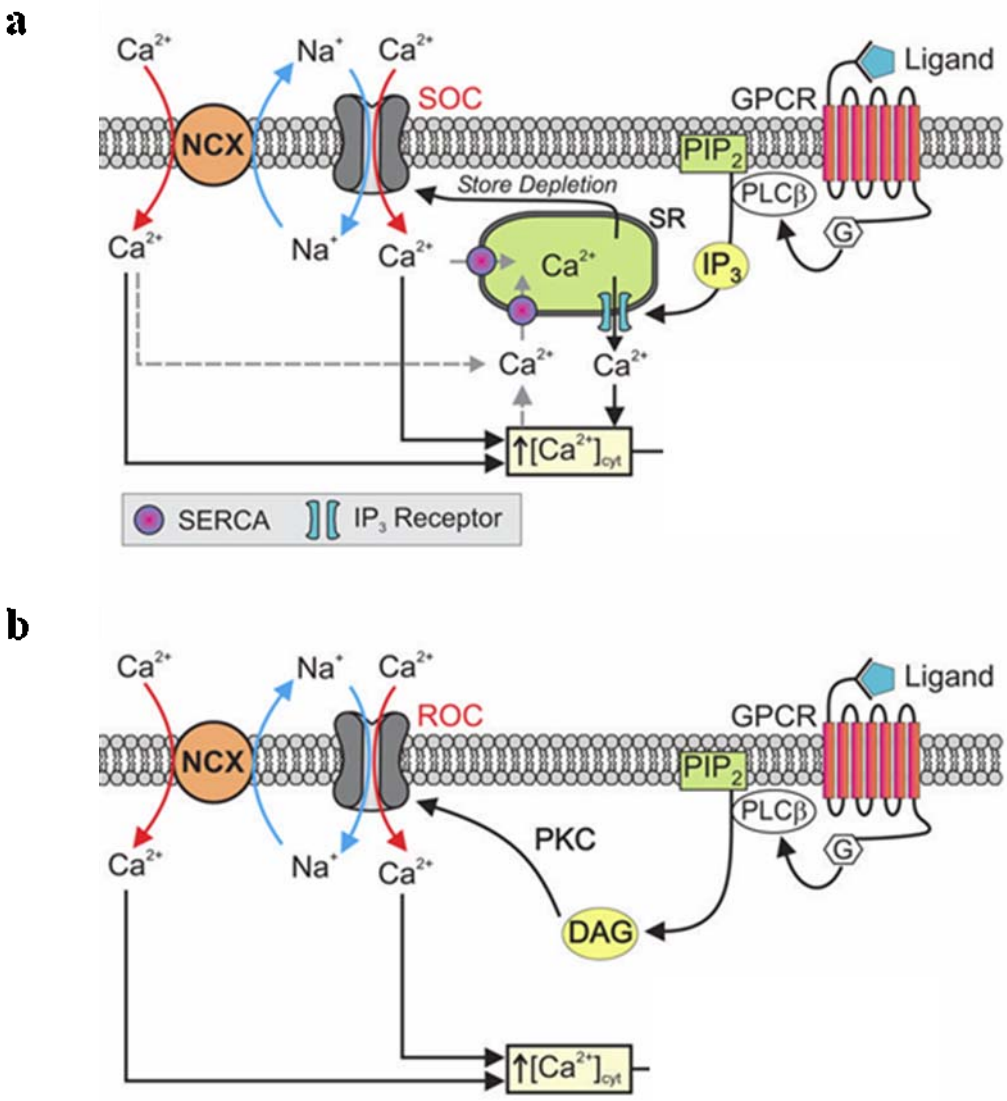


Figure 10: Les canaux calciques non voltage-dépendants (Firth et al., 2007).
a) Les Store-Operated Channels (SOCs) activés par la déplétion en calcium des stocks intracellulaires.
b) Les Receptor-Operated Channels (ROCs) activés par la voie PLC. NCX, Na^+/Ca^{2+} eXchanger; GPCR, G Protein Coupled Receptor; PIP_2, PhosphatIdylinositol 4,5-bisPhosphate; PLC, PhosphoLipase C; SR, Sarcoplasmic Reticulum; IP_3, Inositol 1,4,5-trisPhosphate; DAG, DiAcylGlycérol; PKC, Protein Kinase C.

Les stocks intracellulaires RS/RE sont remplis régulièrement et de manière optimale pour le bon fonctionnement de la cellule. Ceci est réalisé grâce à des entrées soutenues de calcium provenant du milieu externe. Inversement, la déplétion en calcium du RS/RE déclenche une entrée de calcium externe. Deux types de courants dépendants de la déplétion des stocks ont été caractérisés. Le premier à avoir été identifié est un faible courant (24 pS) nommé Icrac (Calcium Release-Activated calcium Current) observé dans les lymphocytes T (Zweifach et

Lewis, 1993; Zweifach et Lewis, 1996) et les mastocytes de rat (Hoth et Penner, 1992). C'est un courant à rectification entrante hautement sélectif au calcium (pCa/pNa-100) qui transite à travers un canal non voltage-dépendant (Zweifach et Lewis, 1993; Zweifach et Lewis, 1996). Mais un autre courant I_{SOC} avec une plus forte conductance mais une faible sélectivité au calcium a été identifié pour la première fois par Putney sur des cellules acineuses lacrymales et de parotides en 1986 (pour revue: Putney, 1986) puis par inhibition de la SERCA du RE par la thapsigargine dans les cellules acineuses de la parotide (Takemura et al., 1989). Par définition, les SOCs sont activés exclusivement par la déplétion en calcium du RE/RS (Fig. 10). Ceci a été démontré grâce à l'inhibition de la SERCA par la thapsigargine. En effet, la capacité d'activer une entrée de calcium par l'inhibition de la pompe a permis de tirer plusieurs conclusions. Tout d'abord, il a été possible de montrer qu'il existait une entrée de calcium indépendante de la voie PLC et indépendante de l'augmentation du second messager IP_3. Mais une majeure partie de la libération intracellulaire de calcium implique la voie PLC. La PLC est activée en amont par les récepteurs couplés aux protéines Gq ou par les récepteurs à la tyrosine kinase résultant en un clivage du PIP_2 en DAG et IP_3. L'IP_3 se fixe alors sur son récepteur IP_3 et entraine une libération calcique dans le cytoplasme. Ce calcium va alors activer des canaux calciques présents à la membrane plasmique permettant une entrée de calcium externe. Ces canaux sont appelés ROCs ou SMOCs (Fig. 10). D'autres éléments comme le DAG, la PKC et l'acide arachidonique peuvent activer ces ROCs (pour revue: Ambudkar et al., 2006). Malgré des centaines de publications sur les SOCs et d'intensifs efforts, la nature moléculaire et les mécanismes d'activation des SOCs restent élusifs. La voie des SOCEs (Store-Operated Calcium Entries) ou CCEs (Capacitative Calcium Entries) reste d'un grand intérêt pour la recherche grâce à son abondance dans tous les types cellulaires. Ainsi, son rôle dans la physiologie et dans la physiopathologie est largement décrit. Les premiers candidats retenus furent les TRP mais deux autres protéines émergent ces dernières années: STIM et Orai. Ce chapitre décrit ces trois candidats.

3.1.2.1. Les TRPCs

Le terme TRP vient d'études faites sur les mécanismes de phototransduction dans la rétine de *Drosophila melanogaster* et par la caractérisation d'un mutant présentant une cécité particulière. En réponse à une stimulation lumineuse prolongée, la rétine de drosophile répond normalement par une dépolarisation soutenue qui peut être enregistrée par le biais d'un électrorétinogramme. Chez le mutant, cette réponse devient transitoire et se caractérise par une cécité lors de stimulations lumineuses soutenues. Le mutant a donc été appelé TRP pour

«Transient Receptor Potential» (Hardie et Minke, 1992; pour revue: Hardie et Minke, 1993). L'isolation du gène TRP a conduit à l'identification d'une protéine présentant une faible homologie avec les canaux calciques activés par la dépolarisation, suggérant que cette protéine était un canal perméable au calcium, activé par une voie impliquant la rhodopsine et la PLC. Par la suite, l'expression d'une protéine homologue, le canal TRPL, dans les cellules Sf9, a permis de démontrer que ces protéines sont des canaux perméables au calcium et que leur activation est intimement liée à l'activation de la PLC et à la libération de calcium du RE (Hu et Schilling, 1995). Les canaux TRPCs pour Canonical sont devenus de ce fait les prototypes parfaits de canaux activés par la déplétion des stocks intracellulaires et activés en réponse à l'hydrolyse du PIP_2.

Les canaux TRP représentent donc une nouvelle grande famille qui comprend plus de 50 canaux perméables aux cations, exprimés de la levure à l'homme (Fig. 11).

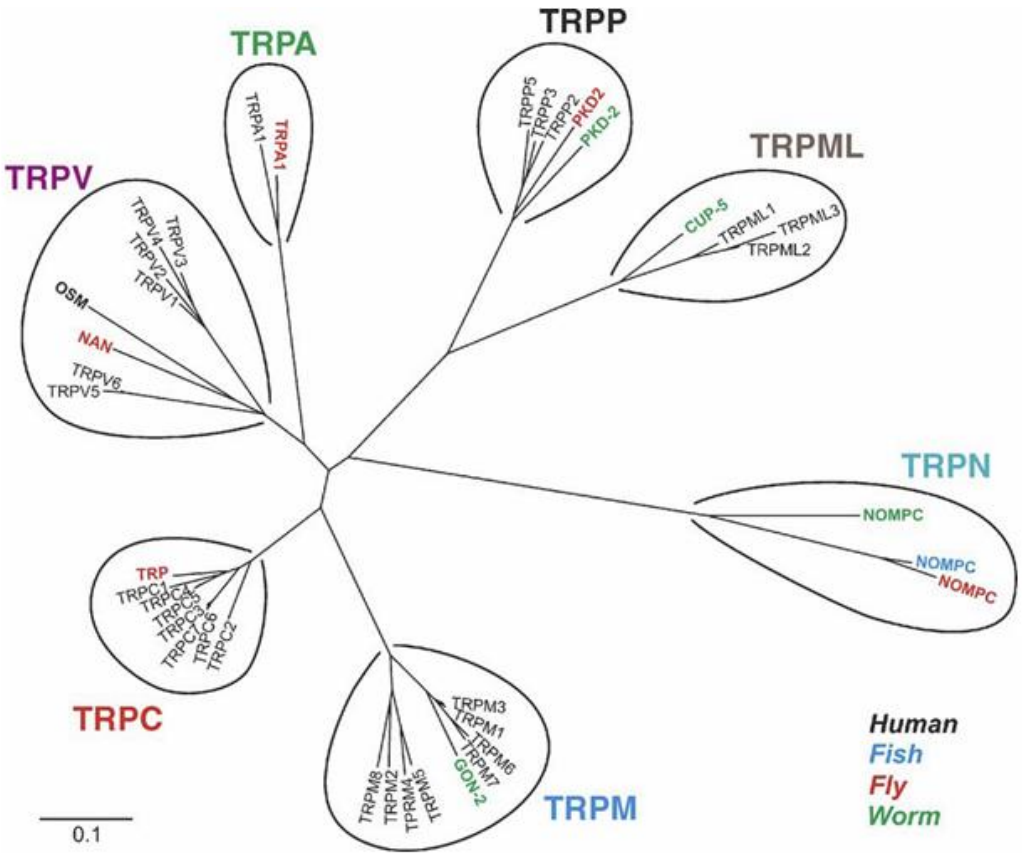


Figure 11: Arbre phylogénique de la superfamille des TRP (Pedersen et al., 2005).

Sur la base des homologies structurelles, cette famille est divisée en 7 groupes : TRPC1-7 Canonique, TRPV1-6 Vanilloïde, TRPM1-8 Mélastatine, TRPP1-3 Polycystine, TRPML Mucolipine, TRPA Ankyrine et les TRPN non représentés chez les mammifères. Le clonage a

permis la caractérisation de ces canaux peu dépendants du potentiel et présentant généralement une perméabilité non spécifique pour les cations.

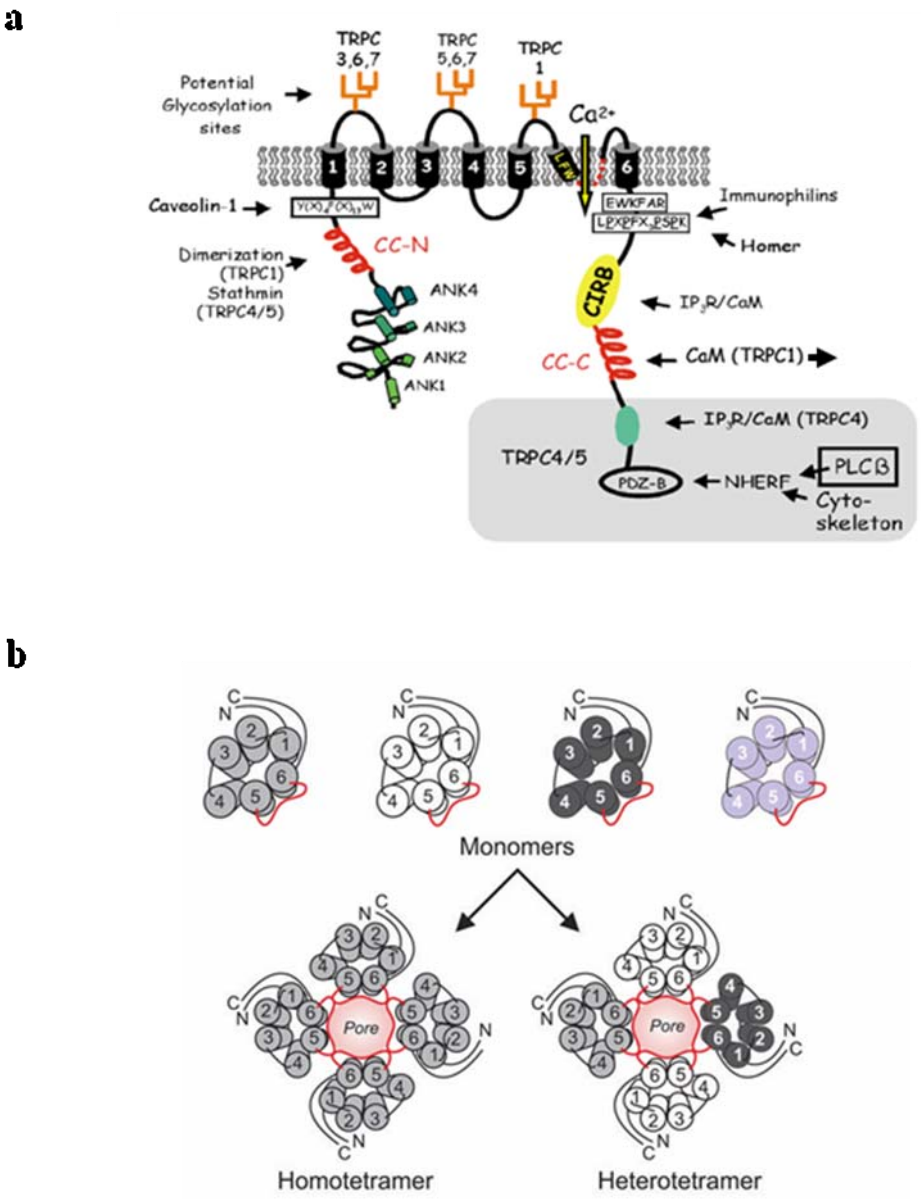


Figure 12: La protéine TRPC.
a) Représentation topologique de la structure des canaux TRPCs. Il existe 6 domaines transmembranaires avec les domaines N et C-terminaux cytoplasmiques. Les sites d'interactions avec les protéines de signalisation sont représentés sur les domaines cytoplasmiques (Vazquez et al., 2004).
b) Arrangement des monomères de TRPC en des canaux fonctionnels homo- et hétérotétramériques avec le pore ionique central (Firth et al., 2007).

Ils sont activés par une large gamme de stimuli incluant des messagers intra- et extracellulaires, des stress mécaniques, chimiques et osmotiques, la température et par l'état

de remplissage des stocks intracellulaires en calcium. Ces canaux sont présents dans une grande variété de types cellulaires. L'impact de mutations ou du comportement anormal de ces canaux dans les diverses pathologies humaines est multiple et majeur (pour revues: Montell, 2005 et Venkatachalam et Montell, 2007).

Seuls les TRPCs seront décrits dans ce chapitre car le travail de thèse a principalement été focalisé sur cette famille de TRP. L'utilisation de différentes approches comme la surexpression ou la répression des canaux TRPCs ont permis de mettre en évidence leur rôle physiologique dans les différents types cellulaires.

Structure des TRPCs

La famille TRPC, de poids moléculaire aux alentours de 100 kDa, est celle qui est la plus proche des TRP chez la drosophile (40 % d'homologie de séquence). Le canal TRPC1 fut le premier membre des TRPCs à être cloné en 1995 (Wes et al., 1995). Sur la base des homologies de séquences et des similitudes fonctionnelles, les membres de la famille des TRPCs sont divisés en 4 sous familles: TRPC1, TRPC2, TRPC3/TRPC6/TRPC7 et TRPC4/5. TRPC2 est un pseudogène chez l'humain et les primates et forme un canal fonctionnel chez la souris, le rat et autres mammifères (Wes et al., 1995). Chaque TRPC est constitué de six domaines transmembranaires avec un pore entre le cinquième et le sixième segment transmembranaire avec les extrémités N et C-terminales cytoplasmiques (Fig. 12a). Ce modèle a été proposé en premier sur TRPC3 par Vannier et collaborateurs (Vannier et al., 1998). Les TRPCs s'assemblent en homo- ou hétérotétramères (Barrera et al., 2007) pour former un canal cationique non sélectif laissant passer du Na^+ et du Ca^{2+} (Fig. 12b). La plupart sont perméables au Ca^{2+} avec un rapport de perméabilité P_{Ca}/P_{Na} variant de 0,3 à 10. Cette famille est caractérisée par une séquence conservée et commune: la TRP box à l'extrémité C-terminale du $6^{ème}$ domaine transmembranaire constituée de deux séquences conservées EWKFAR et PPPFN (région riche en prolines) (pour revues: Beech et al, 2003 et Beech, 2005). Le domaine cytoplasmique N-terminal contient des domaines de 4 répétitions ankyrines qui indiquent une interaction possible de ces canaux avec les éléments du cytosquelette. Il existe une région Coiled-Coil (C-C) dans les parties N et C-terminales indiquant une possible oligomérisation (Lepage et al., 2009) (Fig. 12a). D'autres motifs d'interaction protéine-protéine ont été identifiés comme des sites d'interaction avec la calmoduline et des sites d'interaction avec les RIP_3 présents dans la partie C-terminale de tous les TRPCs (Tang et al., 2001), des motifs de liaison au domaine PDZ (Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor, *Zonula occludens*-1 protein)

(uniquement pour TRPC4 et TRPC5) (Tang et al., 2000; pour revue: Vazquez et al., 2004) ou d'interaction avec les régions SH_2 de la phosphatidyl-inositol 3 kinase. Il existe des sites de phosphorylation par la PKA et PKC dans les régions cytoplasmiques. Enfin, il y aurait des sites de glycosylation sur les boucles extracellulaires (pour revue: Beech et al., 2003). La mise en évidence de leur rôle physiologique ou pathologique dans un type cellulaire donné est rendue très difficile par l'absence de modulateurs naturels ou synthétiques. De plus, un certain nombre des TRP sont des hétéromères et forment des canaux fonctionnels spécifiques. L'utilisation de variants dominant-négatifs ou d'ARN antisens peut perturber tant les homo- que les hétéromères. Beaucoup de ces canaux ont un très lent renouvellement si bien que leur knock down effectif peut prendre plusieurs jours. Enfin, une certaine redondance fonctionnelle, due à la capacité qu'ont ces canaux d'exécuter des rôles similaires, retarde les conclusions définitives.

TRPC1

TRPC1 dans un système physiologique

Le canal TRPC1 est exprimé de manière ubiquitaire. Il est exprimé aussi bien dans les neurones que dans le muscle chez les mammifères. Le gène de TRPC1 se situe sur le chromosome 3 chez l'homme et le chromosome 9 chez la souris (pour revue: Beech et al., 2003). On lui associe de multiples rôles et mécanismes d'activation. TRPC1 est un sérieux candidat moléculaire des SOCs dans de nombreux types cellulaires incluant les glandes salivaires, les kératinocytes, les plaquettes, les muscles lisse, cardiaque et squelettique, les DT40, HEK-293 (Human Embryonic Kidney-293), les cellules neuronales, endothéliales et intestinales. Un groupe de recherche a montré l'implication de TRPC1 dans les SOCEs dans les cellules plaquettaires humaines et dans les mégacaryocytes de souris par l'utilisation d'anticorps dirigé contre cette protéine (Rosado et al., 2002). Mais ce travail a été contredit du fait de l'absence de TRPC1, dans les souris déficientes en TRPC1, qui ne semble pas présenter d'effet au niveau de la libération calcique à partir des stocks intracellulaires ni même au niveau des SOCEs dans les cellules plaquettaires (Varga-Szabo et al., 2008). Ceci peut éventuellement s'expliquer par une compensation par d'autres TRPCs. Par ailleurs, des souris TRPC1-/- ont montré, elles, une sévère réduction de la sécrétion salivaire, et les cellules de la glande submandibulaire issues de ces souris présentent une diminution des SOCEs (Liu et al., 2007). Ces résultats confirment ceux réalisés auparavant sur la lignée de glandes salivaires humaines HSG (Human Salivary Gland) (Liu et al., 2000, Liu et al., 2003) et révèlent un rôle important de TRPC1 dans les SOCEs. Yuan et collaborateurs rapportent

aussi un courant SOC dépendant de TRPC1 dans les cellules HSG et identifient un mécanisme d'activation de ces SOCs. Ils proposent que la protéine d'échafaudage homer1 lie TRPC1 aux RIP_3. Cette interaction ternaire serait régulée par l'état de remplissage des stocks intracellulaires et la désorganisation de ce complexe entrainerait une activation constitutive de TRPC1 (Yuan et al., 2003). TRPC1 forme également un SOC dans les cellules endothéliales notamment dans les cellules HMEC (Human dermal Microvascular Endothelial Cell line) où la surexpression de TRPC1 résulte en une augmentation des entrées calciques induites par la thrombine (Paria et al., 2004). TRPC1 semble participer au phénomène d'hypertrophie des muscles lisses vasculaires (hCASMCs: human Coronary Artery Smooth Muscle Cells) induite par l'angiotensine II (Takahashi et al., 2007a). Dans les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), les entrées calciques activées par VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sont bloquées par l'incubation de l'anticorps dirigé contre le pore externe de la protéine TRPC1 (Ahmmed et al., 2004). Kunichika et collaborateurs ont montré que la surexpression de TRPC1 augmentait la vasoconstriction des artères pulmonaires induite par l'entrée capacitative de calcium (Kunichika et al., 2004). D'autres travaux suggèrent que TRPC1 et/ou TRPC5 forment des SOCs dans les cellules humaines de carcinome épidermoïde A431 (Yoshida et al., 2005) et dans les cellules de myocytes vasculaires (Saleh et al., 2008). TRPC1 est également un élément régulateur de l'hypertrophie cardiaque car dans les cardiomyocytes de rat, il semble être suractivé (Ohba et al., 2007).

TRPC1 dans un système d'expression hétérologue

Il a été suggéré que TRPC4 faciliterait la translocation de TRPC1 vers la membrane plasmique dans les cellules HEK-293 (Hofmann et al., 2002). D'autres travaux par des constructions de chimères dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et HEK-293 montrent que TRPC4 et TRPC5 contrôlent la localisation à la membrane plasmique de TRPC1 (Alfonso et al., 2008). TRPC1 et TRPC5 formeraient un canal hétéromultimérique dans les HEK-293 mais aussi dans le cerveau de rat. Mais ce canal serait insensible à la déplétion en calcium des stocks intracellulaires et serait plutôt activé par les récepteurs couplés aux protéines G (Strubing et al., 2001). Dans ces cellules, par la technique d'extinction de gène, Zagranichnaya a démontré que TRPC1, TRPC3 et TRPC7 contribuaient aux SOCEs (Zagranichnaya et al., 2005). Ces différents isoformes peuvent former des canaux hétérotétramériques.

TRPC1: SOC et ROC

Ce canal TRPC1 est un constituant important des SOCs mais pourtant quand il est exprimé seul, celui-ci peut être insensible à la déplétion en calcium des stocks intracellulaires dans les cellules HEK-293 (Lintschinger et al., 2000). Sa coexpression avec TRPC3 génère un canal cationique sensible au calcium et au DAG (Lintschinger et al., 2000). TRPC1 natif, dans les cellules CHO, est activé par la déplétion mais aussi par des agonistes couplés à la cascade IP_3. Son activation requière l'association avec les RIP_3 et son activité est modulée par la calmoduline (Vaca et Sampieri, 2002). Il semble avoir une double sensibilité non additive dans les cellules HSY (human parotid epithelial cell line). En effet, l'expression d'antisens TRPC1 diminue les entrées calciques stimulées par la thapsigargine puis par l'OAG (analogue non métabolisable du DAG). De plus, TRPC1 semble former un canal cationique avec TRPC3 dans ces cellules (Liu et al., 2005). Rao a aussi montré une sensibilité au DAG de TRPC1 dans les cellules HPB-ALL (Human, Japanese, Peripheral Blood, leukemia T cell) (Rao et Kaminski, 2006). TRPC1 est aussi activé par le peptide Orexine A via le récepteur couplé à la protéine G (ROX1) reliant TRPC1 dans les troubles du sommeil et de l'appétit (Larsson et al., 2005).

TRPC1: SAC

Finalement, dans des études récentes sur des ovocytes de xénope, TRPC1 serait identifié comme canal cationique mécanosensible. Les fractions de membranes où l'activité mécanosensible est importante sont enrichies de la protéine TRPC1. La surexpression ou inversement la répression de TRPC1 ont été des méthodes déterminantes pour montrer le rôle de TRPC1 dans l'activité mécanosensible (Maroto et al., 2005). Une autre étude récente met en évidence l'implication de TRPC1 dans la mécanosensibilité du canal, par l'utilisation de shRNA dirigé contre cette protéine, dans des cellules neuronales (Staaf et al., 2009). Deux études récentes sur les cellules musculaires de souris C2C12 argumentent le fait que TRPC1 forme un canal SAC sensible à l'étirement par l'utilisation de la toxine GsmTx4 (Grammostola spatulata, mechanoToxin 4) de siRNA et shRNA dirigés contre la protéine TRPC1 (Louis et al., 2008; Formigli et al., 2009).

Mais dernièrement son rôle spécifique dans l'activité mécanosensible a été sérieusement remis en question dans les cellules musculaires lisses (Dietrich et al., 2007) et dans les systèmes d'expression hétérologue (Gottlieb et al., 2008).

TRPC2

Le canal TRPC2 a été découvert par le laboratoire de Craig Montell (Wes et al., 2005). Chez l'humain, TRPC2 est un pseudogène c'est-à-dire qu'il existe une séquence d'ADN associée à un gène fonctionnel. Mais ce gène contient 6 mutations générant un codon STOP prématuré. De ce fait, TRPC2 n'est pas transcrit. Par contre, chez les rongeurs, TRPC2 est fortement exprimé dans les neurones sensitifs voméronasals où il est activé par le DAG et où il joue un rôle important dans la détection des phéromones (Lucas et al., 2003). Des analyses phénotypiques sur les souris délétées du gène TRPC2 démontrent des troubles saisissants du comportement sexuel engendrant des agressions entre mâles (Stowers et al., 2002). TRPC2 est exprimé aussi dans les spermatozoïdes où il jouerait un rôle important dans le signal calcique notamment dans les entrées calciques stimulées par la glycoprotéine ZP3 (Zonula pellucida 3) de la matrice extracellulaire de l'ovocyte (Jungnickel et al., 2001). De plus, TRPC2 a été proposé pour jouer un rôle dans les SOCs dans les cellules CHO (Gailly et Colson-Van Schoor, 2001) mais ceci a été contredit par des études sur les cellules HEK-293 où les deux variants TRPC2α et TRPC2β sont incapables de former un canal cationique activé par la déplétion en calcium des stocks intracellulaires (Hofmann et al., 2000).

TRPC3/TRPC6/TRPC7

TRPC3: SOC et ROC

Le sous-groupe TRPC3, TRPC6 et TRPC7 est connu pour sa sensibilité au DAG, produit de dégradation du PIP_2 par la PLC, et ses analogues perméants. Hofmann a montré que TRPC3 et TRPC6 étaient les premiers membres d'une nouvelle famille fonctionnelle de canaux activés par des seconds messagers (SMOCs) ou ROCs (Hofmann et al., 1999). Ils sont activés par le DAG indépendamment de la PKC. Depuis cette étude, de nombreux autres travaux ont confirmé l'activation DAG-dépendante de ce sous groupe. Notamment dans les cellules HEK-293 exprimant de manière stable un haut niveau de TRPC3 où il serait un ROC et ne serait aucunement lié à la déplétion en calcium des réserves intracellulaires (Trebak et al., 2003). Mais d'autres études montrent clairement une activation de TRPC3 par la déplétion des stocks intracellulaires par l'intermédiaire des RIP_3 (Kiselyov et al, 1999) ou par l'inhibition de la pompe SERCA par la thapsigargine (Wu et al., 2000). Une explication possible pour ces résultats disparates est que son mode d'activation dépend de son niveau d'expression. Cette suggestion dérive des travaux de Vazquez montrant clairement une fonction de TRPC3 en tant que ROC ou SOC selon son niveau d'expression dans les cellules DT40 (Vazquez et al., 2001; Vazquez et al., 2003). Putney a lui aussi suggéré qu'à faible niveau d'expression,

TRPC3 s'assemble avec d'autres isoformes conférant sa sensibilité à la déplétion en calcium du RE et qu'en surexpression, il s'assemblerait en homomères et serait sensible au DAG (pour revue: Putney et al., 2004).

TRPC6: ROC

Contrairement à TRPC3, l'activation de TRPC6 par la vidange des réserves intracellulaires n'a pas encore été montrée. Le TRPC6 murin est clairement un ROC dans les HEK-293 (Boulay et al., 1997). Hofmann a démontré que TRPC6 était activé de manière directe par le DAG indépendamment de la PKC, avec aucune dépendance à l'état de remplissage du RE (Hofmann et al., 1999). Hassock suggère que TRPC6 constitue un canal cationique non sélectif stimulé par la thrombine et par l'OAG dans les cellules plaquettaires humaines (Hassock et al., 2002). Aires et collaborateurs ont eux aussi montré, dans les HEK-293 transfectées de manière stable avec le TRPC6 murin, sa dépendance pour le DAG par l'utilisation de plusieurs analogues du DAG (Aires et al., 2006). Enfin, TRPC6 semble être associé aux entrées calciques induites par l'épinéphrine dans les cellules musculaires lisses de la veine porte de rat. De manière cohérente, les souris TRPC6 -/- ont une augmentation de la contraction des muscles lisses vasculaires (Dietrich et al., 2005). En l'absence de TRPC6, il y a une compensation qui entraine une suractivation de TRPC3 qui a pour conséquence une hypertension.

TRPC7: SOC et ROC

Le canal TRPC7 a été originellement montré comme un ROC quand il était exprimé dans les cellules HEK-293 (Okada et al., 1999) mais il peut aussi fonctionner en tant que SOC dans ces cellules (Riccio et al., 2002). Ceci a été réexaminé par Lievremont montrant qu'une expression transitoire de TRPC7 dans les HEK-293 lui confère une sensibilité DAG tandis qu'une expression stable lui confère une sensibilité SOC (Lievremont et al., 2004). Dans l'attente de savoir quelle est sa fonction physiologique, des études ont été faites sur les cellules DT40 qui expriment de manière endogène les ROCs et les SOCs. Pour cela, ils ont éteint le gène de TRPC7 générant des cellules DT40 TRPC7-/-. Dans ces cellules, les entrées calciques transitant par les ROCs ont disparues et sont restaurées lorsqu'ils surexpriment le TRPC7 humain. Cette étude met en évidence le rôle physiologique ROC de TRPC7.

De manière intéressante, il a été découvert que l'activation par le DAG n'est pas spécifique de cette sous famille, car une sensibilité DAG pour TRPC2 (Lucas et al., 2003) et pour TRPC5 (Lee et al., 2003) a été récemment rapportée.

TRPC4/TRPC5

Philipp et collaborateurs ont été les premiers à cloner TRPC4 chez le bovin et ont rapporté que TRPC4 était activé à la fois par la thapsigargine et les RIP_3 dans les cellules HEK-293 (Philipp et al., 1996). Une expression stable de TRPC4 dans les cellules CHO montre aussi un courant dépendant de l'état de remplissage du RE (Warnat et al., 1999). Warnat a aussi surexprimé TRPC4, autrefois nommé CCE1, dans les cellules RBL (Rat Basophilic Leukaemia) qui possèdent un courant Icrac bien caractérisé. La surexpression de ce canal induit une augmentation modeste mais significative de la densité de courant Icrac. Les cellules SBAC (Bovine Adrenocortical Cell) expriment de manière abondante TRPC4 et exhibent un courant SOC/Icrac qui peut être activé par l'IP_3 ou la thapsigargine (Philipp et al., 2000). L'antisens dirigé contre TRPC4 réduit de 50 % l'entrée de calcium dépendante de la déplétion en calcium des stocks intracellulaires. TRPC4 contribue donc à ces courants SOC/Icrac dans les cellules adrénales.

Une étape importante fut le développement de souris dont le gène de TRPC4 a été ôté (Freichel et al., 2001). Il a été montré que les SOCEs mesurées normalement dans les cellules endothéliales sont substantiellement réduites chez les souris KO TRPC4 -/-. TRPC4 semble être important dans la fonction des SOCs natifs. De plus, ces études démontrent un rôle physiologique de TRPC4 dans la vasorelaxation des vaisseaux sanguins. Les souris perdent la capacité de l'acétylcholine à relaxer les muscles lisses de l'aorte précontractée. TRPC4 pourrait alors être un régulateur important du tonus des vaisseaux sanguins.

Il existe une similarité structurale étroite entre TRPC4 et TRPC5. D'ailleurs, TRPC5 semble être un SOC tout comme TRPC4 (Philipp et al., 1998). TRPC5 est essentiellement exprimé au niveau du cerveau. Il semble fortement participer à l'homéostasie calcique dans les cellules excitables telles que les neurones. Pourtant dans un autre laboratoire, l'expression de TRPC5 dans les HEK-293 induit une entrée calcique activée suite à une stimulation d'un récepteur par une voie qui implique le calcium et non par la déplétion des réserves intracellulaires (Okada et al., 1998). Une étude similaire appuie ces résultats (Schaefer et al., 2000). Dans cette étude, TRPC4 et TRPC5 murins ont été exprimés dans les cellules HEK-293. La déplétion des stocks, par dialyse avec l'IP_3 et par la thapsigargine, n'induit pas un courant calcique global enregistré par la technique de patch-clamp ni d'influx enregistré par la technique de quenching du fura-2 par le Mn^{2+} dans les cellules surexprimant ces deux canaux. Par contre les influx calciques sont supprimés par l'administration d'un inhibiteur de la PLC, l'U73122 ((1-(6-((17 beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-di one). Ces résultats démontrent bien que TRPC4 et TRPC5 sont activés par la PLC, elle-

même stimulée par son récepteur (Schaefer et al., 2000). Lee et collaborateurs ont montré que TRPC4 était un candidat pour les ROCs (Lee et al., 2005). Il serait stimulé par les récepteurs muscariniques des muscles lisses gastriques car dans les souris KO TRPC4 -/-, ce courant cationique n'existe plus. Deux autres études dans les HEK-293 et dans les COS-7 montrent une activation de TRPC4 humain suite à une stimulation de l'EGF sur son récepteur par tyrosine phosphorylation (Odell et al., 2005; Odell et al., 2008). De plus, la dernière étude démontre clairement que la spectrine influencerait l'expression à la membrane de TRPC4. Ceci a été montré grâce à des siRNA dirigés contre l'αII-spectrine dont l'expression à la surface de ces cellules est réduite et par conséquent empêche l'augmentation de l'insertion membranaire du TRPC4 suite à l'application d'EGF (Odell et al., 2008). McKay et collaborateurs ont exprimé de manière transitoire TRPC4 dans les HEK-293 (McKay et al., 2000). Ils montrent une augmentation de l'influx cationique indiquant une activité constitutive de ces canaux. Des expériences de patch-clamp en condition 'whole-cell' dans les cellules CHO exprimant TRPC4, démontrent aussi un courant cationique non sélectif constitutivement actif. L'influx cationique n'est augmenté ni par la thapsigargine ni par la stimulation d'un récepteur, ni par l'OAG. Zhang et collaborateurs, qui ont exprimé de manière stable TRPC4 dans les HEK-293, sont parvenus à des conclusions similaires (Zhang et al., 2001). Ils montrent que ni les agonistes ni la thapsigargine n'affectent les influx calciques transitant par TRPC4. Wu et collaborateurs ont aussi examiné les effets de TRPC4 sur les SOCs dans les cellules HEK-293 en utilisant des antisens contre ce canal (Wu et al., 2002). L'extinction de la protéine TRPC4 n'affecte pas les influx cationiques stimulés par la thapsigargine. Etrangement, ces cellules montrent une diminution de l'influx calcique dépendant de l'OAG et de l'acide arachidonique. Enfin, TRPC4 semble être stimulé par des récepteurs couplés aux protéines G dans des cellules humaines du myomètre mais aucunement stimulé par la thapsigargine et l'OAG (Ulloa et al., 2009). Il est maintenant admis que TRPC4 peut former un ROC mais une seule étude a déterminé quelle était la protéine G impliquée dans le processus d'activation de TRPC4. En effet, seule la protéine Gαi peut activer TRPC4 dans les HEK-293. Cet effet semble spécifique car elle n'a aucun effet sur le TRPC5, TRPC6 et TRPV6 (Jeon et al., 2008).

TRPC4 et TRPC5 sont très similaires au niveau de leur structure mais il existe des séquences d'acides aminés différentes au niveau de trois régions: région du pore, les parties N et C-terminales. Ces différences peuvent expliquer les distinctions de régulation de ces deux canaux. Il y a des différences de régulation au sein même du canal TRPC4 qui possèdent deux variants TRPC4α et TRPC4β. TRPC4β est l'isoforme courte ayant perdu 84 acides aminés au

niveau de la partie C-terminale. Le PIP_2 intracellulaire semble inhiber le TRPC4α mais pas le TRPC4β (Otsuguro et al., 2008). Le site de fixation du PIP_2 s'avère être situé au niveau de ces 84 derniers acides aminés du C-terminal.

Mécanismes d'activation des SOCs

Actuellement, il existe plusieurs hypothèses concernant les mécanismes d'activation des SOCs: le CIF (Calcium Influx Factor), le couplage structural RIP_3/SOC, la fusion de vésicules et enfin STIM1 (STromal Interaction Molecule 1).

Le CIF (Calcium Influx Factor)

La théorie du facteur diffusible fut lancée tout d'abord par l'équipe de Putney (Takemura et al., 1989) pensant alors qu'après vidange des stocks intracellulaires, un messager diffusible serait produit puis envoyé afin d'activer les SOCs. L'existence de ce facteur diffusible ou médiateur soluble a été démontrée pour la première fois par Randriamampita et Tsien (Randriamampita et Tsien, 1993). Dans cette étude, ils ont extrait avec succès à partir de lymphocytes T Jurkat stimulés par la thapsigargine, un facteur appelé CIF (Calcium Influx Factor) qui serait alors capable d'activer des influx calciques dans différents types cellulaires tels que les macrophages, les astrocytomes et les fibroblastes. L'amélioration des procédés de purification du CIF ont permis de montrer qu'il était aussi actif suite à des microinjections dans des ovocytes de xénope suite à une stimulation thapsigargine (Kim et al., 1995; Thomas and Hanley, 1995). Le CIF est un extrait acide qui aurait un poids moléculaire d'environ 500 Da. Celui-ci a été aussi isolé à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae* où le gène de la pompe Ca^{2+} ATPase est muté, conduisant à une déplétion des stocks intracellulaires et par conséquent à la production du CIF (Csutora et al., 1999). Le mécanisme par lequel le CIF activerait les SOCs n'est pas clair mais un travail récent suggère un rôle de la voie $iPLA_2$ (calcium independent PhosphoLipase A_2) dans les cellules RBL et dans les cultures primaires de muscle lisses de souris. Smani et collaborateurs ont démontré que le CIF était capable d'activer les SOCEs en empêchant la liaison de la calmoduline sur $iPLA_2$, rendant $iPLA_2$ active (Smani et al, 2004). Cette enzyme va alors cliver les phospholipides en acide arachidonique et en lysophospholipides. Ces derniers activeraient directement les SOCs. Après le remplissage en calcium du RE et la fin de la production du CIF, la calmoduline se lie à l'$iPLA_2$, l'inhibant et par conséquent cette liaison stopperait les entrées calciques (Fig. 13). Cependant, à ce jour, l'identité moléculaire précise du CIF reste inconnue.

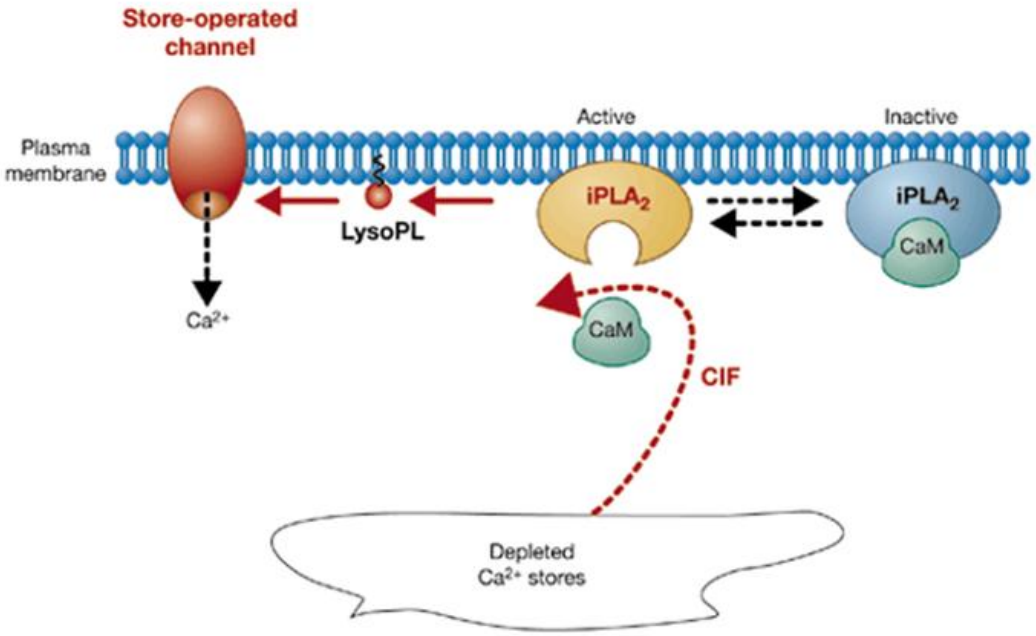


Figure 13: Un nouveau modèle pour l'activation des SOCs.
La déplétion en calcium des stocks intracellulaires active la production du CIF. Ce dernier empêche l'effet inhibiteur de la calmoduline sur l'$iPLA_2$ résultant en une production de lysophospholipides qui vont alors activer les SOCs. $iPLA_2$, calcium independent PhosphoLipase A_2; CaM, CalModuline; CIF, Calcium Influx Factor; LysoPL, lysoPhosphoLipides (Smani et al., 2004).

Couplage structural

L'hypothèse d'un couplage structural entre les RIP_3 et les canaux SOCs fut proposée par Irvine (Irvine, 1990) et par Berridge (Berridge, 1995) par analogie avec l'interaction DHPR/RyR dans le Couplage Excitation/Contraction dans le muscle squelettique. Il est énoncé que les RIP_3 du RE lieraient physiquement les SOCs présents à la membrane plasmique. L'information indiquant la déplétion des stocks intracellulaires serait transmise aux SOCs grâce à l'interaction Protéine/Protéine (Fig. 14). Les RIP_3 auraient de ce fait deux rôles distincts: d'une part, ils permettent la libération du calcium vers le cytoplasme et d'autre part grâce à la large tête cytoplasmique, ils transmettent l'information aux canaux de surface.

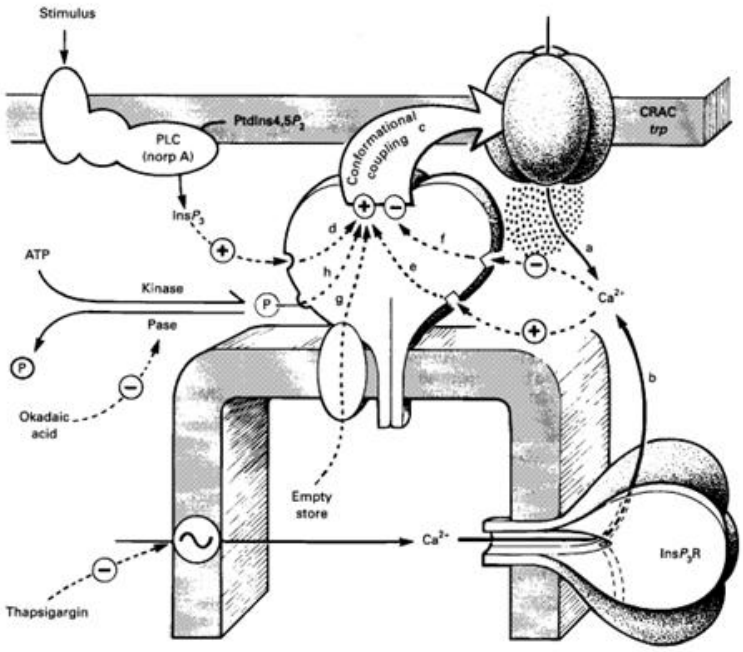


Figure 14: Modèle du couplage structural des SOCs.
La large tête des RIP_3 transmet le signal via une interaction avec les canaux SOCs (Berridge, 1995).

Une autre hypothèse suggère que les RIP_3 sont séparés des SOCs lorsque les stocks sont remplis. En réponse à la déplétion en calcium du RE, des domaines spécifiques du RE se déplaceraient, se rapprochant ainsi de la membrane plasmique et provoqueraient une interaction entre les deux canaux (Patterson et al., 1999). Ceci a été montré par des agents comme la calyculine A, la cytochalasine D ou la jasplakinolide agissant sur le remodelage de l'actine et par conséquent sur les mouvements du RE vers la membrane plasmique (Patterson et al., 1999; Rosado et Sage, 2000a). De plus, Rosado et collaborateurs montrent une interaction entre le RIP_3 de type II et hTRP1 dans les plaquettes humaines (Rosado et Sage, 2000b; Rosado et Sage, 2001). Mais d'autres études ne montrent aucun effet de l'altération du cytosquelette sur les courants Icrac dans les cellules RBL-1 (Bakowski et al, 2001) et dans les cellules NIH-3T3 (mouse enbryonic fibroblast cell line) (Ribeiro et al., 1997). L'étude la plus contradictoire concerne les lymphocytes B DT40 déficientes en RIP_3 de type 1, 2 et 3. Ces cellules triples KO ne voient pas leurs CCEs affectées par l'absence des RIP_3 (Sugawara et al., 1997). Cependant, cette hypothèse ne se vérifie pas dans certains types cellulaires et l'existence d'un autre type de couplage doit être envisagée, en particulier avec l'intervention de la protéine STIM1 (voir chapitre *3.1.2.4*). Il n'est pas à exclure non plus l'existence d'une protéine intermédiaire comme homer1a qui lierait directement TRPC1 au niveau des extrémités N et C terminales (cas dans les cellules HEK-293). Lorsque les deux protéines sont

liées, TRPC1 est incapable de s'ouvrir. Un mutant TRPC1 ne pouvant plus s'associer avec la protéine homer est constitutivement actif (Yuan et al., 2003).

Fusion vésiculaire

Cette hypothèse repose sur le fait que préexistent des pools de vésicules contenant les canaux SOCs fonctionnels sous la membrane. Ces vésicules fusionneraient à la membrane plasmique après déplétion en calcium des stocks intracellulaires. Ce phénomène a été mis en évidence par des stratégies expérimentales de mesures de courant I_{CRAC} ou d'influx calcique dans lesquelles l'exocytose a été altérée. Par exemple, il a été montré que des molécules interférants avec SNAP-25 (SyNaptosome-Associated Protein-25), protéine essentielle pour l'amarrage des vésicules à la membrane, diminuaient les courants SOCs dans les ovocytes de xénope (Yao et al., 1999). De même, dans les HEK-293, des neurotoxines qui désorganisent les SNAP-25 et VAMP-2 (Vesicle-Associated Membrane Protein-2) réduisaient significativement les entrées calciques activées par la déplétion en calcium du RE (Alderton et al., 2000). De manière intéressante, l'activité des TRPCs serait la conséquence d'une rapide translocation et insertion de ces canaux à la membrane suite à une stimulation par des agonistes (Bezzerides et al., 2004; Cayouette et al., 2004; Singh et al., 2004), ce qui suggère un rôle important de l'exocytose dans le mécanisme d'activation des SOCs.

Mécanismes d'inactivation des SOCs

Les SOCs sont inactivés de manière calcium-dépendante. En effet, le calcium entrant dans la cellule va former un microdomaine riche en calcium, sous la membrane, à proximité des canaux ouverts. Ce calcium va alors agir sur les SOCs pour les inactiver (Hoth et Penner, 1993; Fierro et Parekh, 1999). C'est le mécanisme de feedback négatif. D'autre part, si la vidange du RE semble activer les SOCs, il est logique que le remplissage de ces réserves désactive ces entrées de calcium. Des études utilisant la sonde fura-2 montrent une corrélation entre le remplissage des stocks et la perte des influx calciques (Jacob, 1990; Montero et al., 1993; Gonzalez Narvaez et Castillo, 2007).

Pharmacologie des SOCs

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques contre la pompe SERCA qui est responsable du repompage du calcium à l'intérieur du RE/RS a été un élément déterminant dans l'étude de la fonction et de la régulation des SOCs (Fig. 15). Ces inhibiteurs incluant la thapsigargine, l'Acide CycloPiazonique (ACP), et le di-tert-butylhydroquinone, conduisent à une déplétion

des réserves par fuite passive et constitutive de calcium du RE vers le cytoplasme due à l'incapacité de la pompe à remplir les stocks. De plus, la déplétion du RE peut être obtenue par dialyse cellulaire avec de fortes concentrations en tampons calciques tels que l'EGTA (EthyleneGlycol-bis (β-amino-ethyl ether) *N,N,N',N'*-Tetraacetic Acid) ou le BAPTA (1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid), qui réduisent efficacement la concentration libre en calcium cytosolique, normalement disponible pour la SERCA. Pour diminuer le niveau en calcium des réserves du RE, il est possible aussi d'agir sur les RIP_3 ou les RyR par des activateurs. Enfin, un autre chélateur calcique métallique du RE, le TPEN (*N,N,N',N'*-Tetrakis-(2-Pyridylmethyl)-EthyleNediamine) réduit directement le calcium libre dans le RE et active les SOCs (pour revue: Smyth et al., 2006).

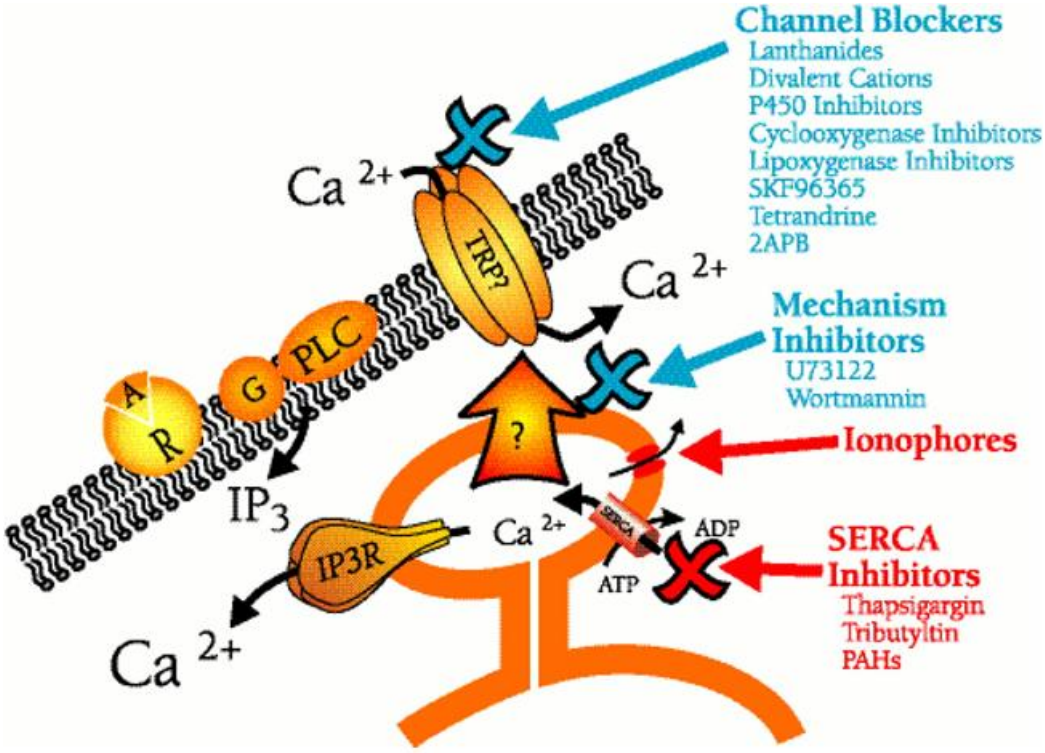


Figure 15: Pharmacologie des canaux SOCs (Putney, 2001).

Actuellement, les inhibiteurs spécifiques de la voie SOC manquent terriblement. Cependant, plusieurs agents comme l'éconazole et SKF-96365 (1-{β-[3-(4-Methoxyphenyl)propyl]-4-methoxyphenethyl}-1H-imidazole hydrochloride) sont connus pour inhiber les SOCs mais il faut noter qu'ils inhibent d'autres canaux ioniques particulièrement des canaux voltage-dépendants avec la même gamme de concentration (Franzius et al., 1994; pour revue: Putney, 2001). Une autre drogue appelée 2-APB décrite originellement comme antagoniste des RIP_3 (Maruyama et al., 1997), est connue pour être un inhibiteur direct des SOCs, n'ayant aucun effet sur les canaux voltage-dépendants et les canaux calciques activés par l'acide

arachidonique (Braun et al., 2001; Prakriya et Lewis, 2001). Mais, le 2-APB semble interférer sur l'activité de la pompe SERCA, les canaux potassiques et sur les efflux calciques mitochondriaux (pour revues: Parekh et Putney, 2005 et Smyth et al., 2006). Malgré ces effets diverses, cet agent est un important outil pour l'étude des influx calciques. Les SOCEs et les I_{CRAC} ont l'unique caractéristique d'être potentialisés avec des concentrations faibles de 2-APB (1-5 µM) et d'être inhibés par des concentrations plus grandes (10 µM) (Prakriya et Lewis, 2001; Ma et al., 2002). Par contre, le mécanisme par lequel le 2-APB exerce son action sur les SOCs reste encore inconnu. Il semble agir du côté extracellulaire (Bakowski et al., 2001).

Il existe d'autres drogues qui inhibent les SOCs notamment le L651582, SC38249, le LU52396, le tetrandine, les inhibiteurs du cytochrome P-450. Ces drogues ne sont pas spécifiques (pour revues: Putney, 2001 et Smyth et al., 2006) (Fig. 15).

D'autres inhibiteurs inorganiques fiables subsistent tels que les cations trivalents La^{3+} et le Gd^{3+} (Hoth et Penner, 1993). Ce dernier est considéré comme spécifique des SOCs à des concentrations de l'ordre de 1-5 µM dans plusieurs types cellulaires sans affecter les ROCs ou les entrées calciques activées par l'acide arichidonique (Luo et al., 2001; Trebak et al., 2003). Le Ni^{2+} semble aussi être un inhibiteur non spécifique des SOCEs (Jacob, 1990; Montero et al., 1993).

3.1.2.2. Les TRPCs dans le muscle squelettique

Le travail de Vandebrouck et collaborateurs (Vandebrouck et al., 2002) a proposé un rôle des canaux TRPCs dans les fibres musculaires squelettiques dans lesquelles Kurebayashi et Ogawa avaient auparavant montré l'existence de SOCEs (Kurebayashi et Ogawa, 2001). Ils décrivent un courant calcique non voltage-dépendant qui est activé par la déplétion en calcium des stocks intracellulaires avec la thapsigargine ou la caféine dans les fibres musculaires. Ils se sont intéressés bien évidemment au candidat moléculaire de ce courant et ont proposé les TRPCs. L'expression des transcrits pour les 7 isoformes des TRPCs a été examinée sur les fibres adultes de muscles squelettiques par la technique de RT-PCR. Les ARNm de TRPC1, 2, 3, 4 et 6 ont été détectés dans les fibres C57BL/10. Des immunomarquages confirment la présence de TRPC1, TRPC4 et TRPC6 à la membrane plasmique alors que TRPC2 et TRPC3 sont absents du sarcolemme. Par la suite, l'équipe de Brinkmeier et collaborateurs (Kunert-Keil et al., 2006; Krüger et al., 2008) a étudié l'expression des gènes TRP chez la souris par RT-PCR quantitative. Ils confirment les travaux de Vandebrouck et collaborateurs mais ils suggèrent un rôle important pour TRPC3 et TRPC6 dans le muscle de souris car leur niveau

d'ARMm est largement plus important que les transcrits des autres isoformes. Des marquages illustrent une localisation de TRPC6 au niveau du sarcolemme contrairement à la localisation de TRPC3 qui s'avère intracellulaire.

Le rôle de TRPC1 dans le muscle squelettique a été l'objet de plusieurs investigations. TRPC1 et la cavéoline-3 colocalisent au niveau du sarcolemme et semblent former un complexe par coimmunoprécipitation (Gervasio et al., 2008). Des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) semblent confirmer un lien direct entre ces deux protéines. La cavéoline-3 aiderait au transfert vers le sarcolemme de TRPC1 afin qu'il puisse jouer son rôle de canal SOC ou SAC. Ce travail montre également une augmentation (x6) des influx calciques sur des myoblastes C2 surexprimant à la fois la cavéoline-3 et TRPC1. L'activité de ce dernier dépendrait de l'activation de la kinase Src.

Une autre étude met en évidence le rôle d'une autre protéine d'échafaudage, homer, dans l'activité du canal TRPC1. En effet, Stiber a examiné la fonction d'homer dans le muscle adulte provenant de souris KO homer1 présentant une myopathie (Stiber et al., 2008a). La perte de la protéine homer1 dans les myotubes provenant de cultures primaires des souris KO résulte en une augmentation du calcium basal cytosolique et une augmentation des influx calciques spontanés. Cette activité spontanée est bloquée par la répression du gène TRPC1. Cette étude montre clairement l'importance d'homer1 dans la régulation de TRPC1 par liaison directe au niveau de son domaine Coiled-Coil qui serait activé par des stress mécaniques à la membrane. Homer participerait à la formation de microdomaines (tout comme la cavéoline-3) liant TRPC1 aux costamères et régulerait son activité dans le muscle squelettique.

Une étude montre un rôle émergent de TRPC1 dans la myogenèse (Louis et al., 2008). La migration des myoblastes est une étape importante dans la myogenèse et la régénération musculaire. Cela permet l'alignement des myoblastes et la fusion de ces derniers pour donner les myotubes plurinucléés. Cette étape précoce de différenciation présente une augmentation transitoire des influx calciques activant par la suite les calpaines impliquées dans le processus de fusion (thèse Constantin B., 1995; Constantin et al., 1996). Le gène TRPC1 a alors été réprimé par l'utilisation de shRNA dans les myoblastes de la lignée C2C12 afin de voir les conséquences sur les influx calciques et la différenciation musculaire (Louis et al., 2008). Les myoblastes dépourvus de la protéine TRPC1 présentent une forte diminution des SOCEs et une diminution de l'influx transitoire de calcium au début de la différenciation. Le pic concomitant d'activité de la calpaine est aboli. De ce fait, ces myoblastes ont un défaut de migration donc un retard important dans la différenciation musculaire. Cette étude suggère

que les entrées de calcium par TRPC1 induisent une activation transitoire des calpaines et le déclenchement de la migration cellulaire. Une dernière étude récente confirme que TRPC1 est un composant essentiel pour former un canal SAC dans les myoblastes C2C12 par l'utilisation de siRNA (Formigli et al., 2009). Ce travail suggère également une activité SAC régulée par la Sphingosine 1-Phosphate (S1P), lipide impliqué dans la régénération tissulaire.

Malgré l'abondance de TRPC3 dans le tissu musculaire, son rôle reste élusif. Sa localisation est très controversée. TRPC3 semble participer à la voie des vitamines D dans le muscle squelettique de poussin (Santillan et al., 2004a et b). TRPC3 forme un complexe avec le récepteur à la vitamine D et ces deux protéines moduleraient l'activité des SOCs grâce à la forme active de la vitamine D, $1\alpha,25(OH)_2D_3$. Lee et collaborateurs ont eux démontré que l'extinction de TRPC3 par siRNA dans des myotubes provenant de cultures primaires de souris réduisait l'amplitude de la libération calcique provenant du RS pendant le Couplage Excitation/Contraction ou pendant une activation du calcium release par un activateur des RyR (caféine) suggérant une fonction commune entre TRPC3 et RyR (Lee et al., 2006). De manière surprenante, les entrées calciques couplées à l'excitation (ECCEs: voir paragraphe suivant) et les SOCEs ne semblent pas être altérées par l'absence de TRPC3. Ce canal n'interviendrait pas dans les entrées de calcium mais régulerait, par interaction fonctionnelle avec les RyR1, la libération calcique provenant du RS. Mais TRPC3 ne semble pas colocaliser avec RyR1 dans les myotubes. Pour déterminer si la fonction commune de TRPC3 et RyR est le résultat d'une interaction directe ou indirecte, Woo et collaborateurs ont investi les interactions protéiques au niveau des triades provenant de muscle squelettique de lapin et de souris (Woo et al., 2008). Cette étude montre une interaction indirecte de ces deux protéines par l'intermédiaire de TRPC1 et d'autres protéines triadiques qui sont importantes pour le Couplage Excitation/Contraction comme la JunctoPhiline 2 (JP2), la calmoduline, la calréticuline, homer et la MitsuGumine 29 (MG29). Ces protéines agiraient comme élément régulateur de l'interaction entre TRPC3 et RyR1.

3.1.2.3. ECCEs dans le muscle squelettique

Un nouveau système d'entrée calcique indépendant des stocks intracellulaires émerge depuis quelques années dans le muscle squelettique. Des stimuli physiologiques comme des dépolarisations soutenues ou répétées qui ne produisent pas une déplétion en calcium du RS activeraient rapidement des canaux calciques présents au niveau des tubules T ayant les mêmes caractéristiques que les canaux SOCs (Cherednichenko et al., 2004). Cette découverte montre une forme de couplage conformationnel qui requiert trois différents types de canaux

que sont les DHPR, les RyR et les canaux calciques par un mécanisme appelé ECCE pour Excitation-Coupled Calcium Entry. L'absence de la sous unité 1s du DHPR ou du RyR1 abolit l'ECCE. L'activation plus rapide de la voie ECCE permet un influx calcique rapide afin d'éviter le déclin de la contraction lors de stimulations répétées. Une étude récente menée dans les myotubes de souris remet en cause ce couplage conformationnel et propose que l'ECCE implique exclusivement le DHPR dans sa fonction de canal de type L (Bannister et al., 2009). Cet événement devancerait l'activation des SOCEs. Ces deux voies coopéreraient afin de maintenir une contraction pendant des efforts musculaires (Lyfenko et Dirksen, 2008). Mais l'identité de ce canal calcique reste à élucider. Les TRPCs restent de bons candidats sachant que TRPC1 et TRPC3 sont présents dans les triades (Woo et al., 2008). Ce mécanisme, présent dans les tubules T, permet une entrée de calcium et par conséquent un remplissage rapide en calcium du RS pour subvenir aux besoins accrus en calcium des cellules musculaires lors de la contraction (Launikonis et Rios, 2007).

3.1.2.4. STIM1

Malgré d'intenses études réalisées pendant 20 ans, l'identité moléculaire des SOCs ou CRACs est un vrai défi. Les premiers candidats moléculaires furent les TRPCs. Cependant, l'élucidation des composants fut incomplète jusqu'à l'obtention de screening de siRNA à haut débit (Roos et al., 2005; Liou et al., 2005; Zhang et al., 2006). Cette technique a permis d'identifier deux nouvelles protéines impliquées dans les SOCEs: STIM1 et Orai1. D'ailleurs, parmi 170 gènes cibles, seul STIM1 paraissait important pour les SOCEs et I_{CRAC} dans les cellules de drosophile S2 (Roos et al., 2005). Cette découverte a été suivie par celle d'Orai qui formerait le pore ionique des canaux CRACs.

STIM1 comme phosphoprotéine de surface cellulaire

La protéine STIM1 a été identifiée et étudiée quelques années avant d'être impliquée dans l'entrée calcique. STIM1 humaine (Stromal Interaction Molecule 1), préalablement nommée GOK, était initialement caractérisée comme gène suppresseur de tumeur. Elle se présentait comme une nouvelle phosphoprotéine/glycoprotéine présente sur les membranes cellulaires (Manji et al., 2000; Williams et al., 2001). STIM1 chez la souris présente 96 % d'homologie de séquence avec STIM1 humaine et le gène est présent sur le chromosome 7. Deux autres membres de la famille STIM, chez les vertébrés, STIM2 et STIM3 ont été identifiés par des approches bioinformatiques par homologies de séquences. STIM3 semblerait être exprimée

essentiellement chez le zebrafish. D-STIM est le seul homologue chez les invertébrés (la drosophile et *Caenorhabditis elegans*) (Williams et al., 2001; Liou et al., 2005).

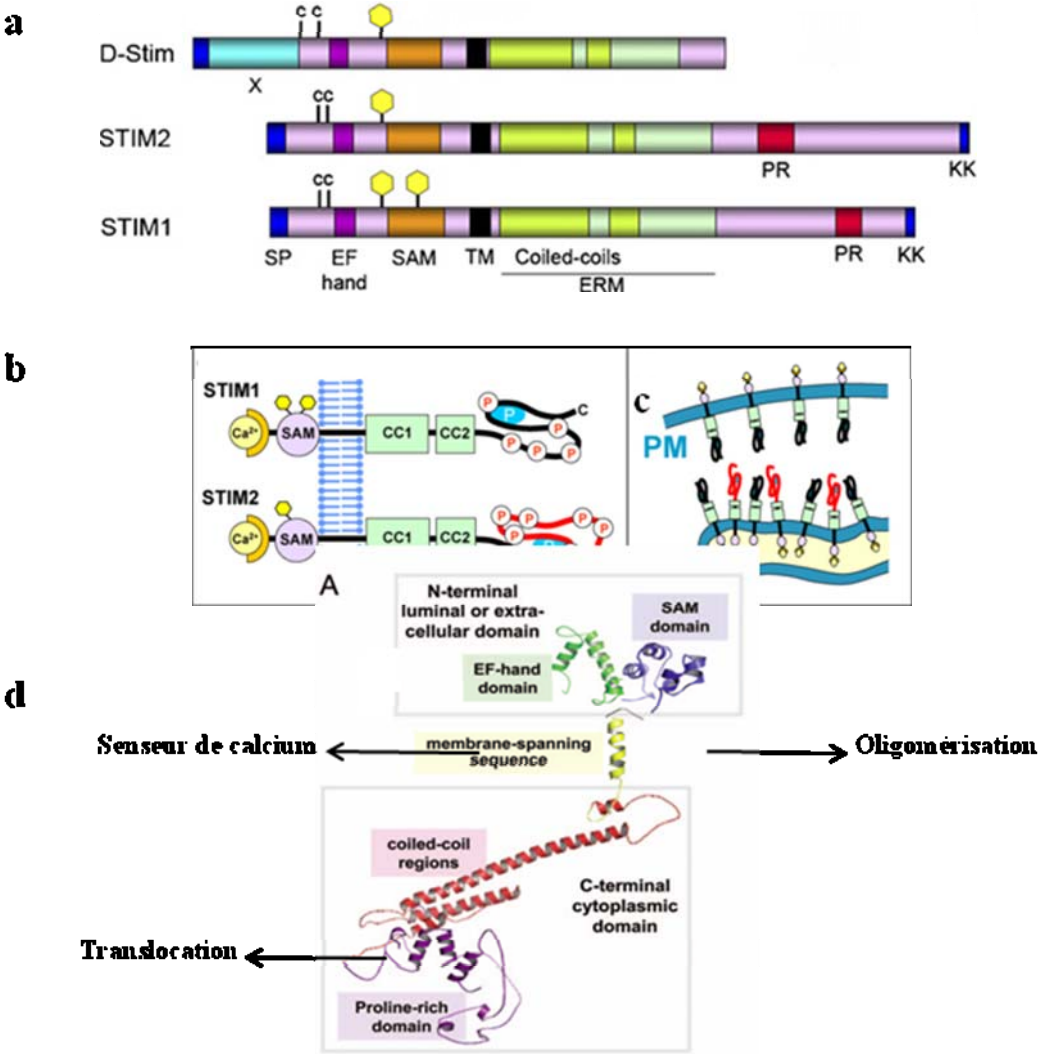


Figure 16: Structure et distribution des protéines STIM (Hewavitharana et al., 2007).
a) Représentation des domaines structuraux de STIM1 et STIM2 chez les vertébrés et de D-Stim chez la drosophile (Dziadek et al., 2007). SP: peptide signal au niveau du domaine N-terminal, domaine EF-hand, domaine SAM, région transmembranaire (TM), le motif Coiled-Coil dans le domaine ERM, région riche en proline (PR) et la queue C-terminale riche en lysine (KK). Une paire de résidus cystéine est présente dans la région N-terminale (CC) et les hexagones représentent les sites de N-glycosylation. D-Stim contient une séquence supplémentaire adjacente au peptide signal qui n'est pas présente chez les vertébrés.
b) Topologie de STIM1 et STIM2. Les sites potentiels de phosphorylation sur les résidus sérine/thréonine sont représentés par le P en rouge.
c) Distribution de STIM1 et STIM2 à la membrane plasmique et au niveau du RE. STIM1 est observée à la membrane mais STIM2 semble être exclusivement présente au niveau du RE.
d) Structure tridimensionnelle de STIM1 (Spassova et al., 2006).

Les différents domaines de STIM1 et ses fonctions

STIM1, STIM2 et D-STIM codent respectivement pour des protéines avec un seul domaine transmembranaire de 685, 746 et 580 aa soit 90, 105 et 64,5 kDa. C'est la région cytoplasmique C-terminale qui diverge de manière significative entres ces 3 protéines (Fig. 16a). Elles contiennent plusieurs domaines conservés comme le domaine EF-hand, le domaine SAM (Steril Alpha Motif) et la région Coiled-Coil (William et al., 2001) (Fig. 16a et d).

Domaine extracellulaire: régulateur de l'agrégation et de l'oligomérisation de STIM1

STIM1 et STIM2 contiennent toutes les deux un domaine de liaison au calcium **EF-hand** (motif hélice/boucle/hélice) dans la lumière du RE ou dans la partie extracellulaire, dépendant de sa distribution soit dans la membrane du RE ou soit dans la membrane plasmique (Fig. 16b et c). Ce motif EF-hand sur STIM1 et STIM2 agit comme senseur au calcium avec une faible affinité pour le calcium (Kd ~ 0.2-0,6 mM) (Zheng et al., 2008). Ce motif change de conformation selon la liaison ou non du calcium sur ce dernier. Une mutation d'aa dans ce domaine entraîne une plus faible affinité au calcium (mimant alors la déplétion en calcium des stocks calciques du RE). STIM1, avec son domaine EF-hand muté, devient alors constitutivement active et néanmoins s'agrège et est transportée à la membrane cellulaire pour former des clusters entraînant alors une entrée constitutive de calcium (Liou et al., 2005; Spassova et al., 2006). Le motif alpha stérile **SAM** est situé entre le domaine EF-hand et l'unique domaine transmembranaire. SAM contient deux sites de N-glycosylation pour STIM1 et un site pour STIM2 sur les résidus asparagine (Asn) (William et al., 2002). Ce domaine est important pour l'oligomérisation de STIM1. Une délétion du domaine SAM rend STIM incapable de s'agréger à la membrane et donc inhibe les entrées calciques (Baba et al., 2006).

Domaine cytoplasmique: régulateur des entrées calciques

Le domaine cytosolique contient, deux hélices alpha adjacentes à côté du domaine transmembranaire pour former le **motif Coiled-Coil (C-C)** que nous appelons le domaine **ERM** (Ezrin/Radixin/Moesin) permettant la liaison entre la membrane plasmique et le cytosquelette, une région riche successivement en glutamate, sérine/proline, sérine/thréonine et une région riche en lysine. La délétion du domaine C-C/ERM entraîne une diminution de la translocation de STIM1 à la membrane et par conséquent une inhibition des entrées calciques (Baba et al., 2006). La région riche en lysine est, elle aussi, importante pour l'activation des SOCs/CRACs et semble influer le taux de transport de STIM1 vers la membrane plasmique

alors que la délétion des régions glutamates et sérine/thréonine paraissent moins essentielles. Ce domaine cytoplasmique semble par ailleurs suffisant par l'activation des SOCs/CRACs (Huang et al., 2006). En conclusion, la région extracellulaire de STIM1 est en monomère lorsque le calcium se lie au domaine EF-hand. Suite à la déplétion, le domaine extracellulaire EF-hand/SAM change de conformation permettant la dimérisation de ce domaine, ceci se répercute sur le domaine intracellulaire qui va enclencher l'agrégation latérale des STIM (Stathopulos et al., 2006; Liou et al., 2007) et sa translocation à la membrane plasmique pour former un complexe avec Orai1 ou avec les TRPCs. Deux laboratoires ne montrent aucune augmentation de l'expression de STIM1 à la surface cellulaire suite à la déplétion en calcium des stocks intracellulaires (Soboloff et al., 2006, Mercer et al., 2006). Dernièrement, Park et collaborateurs ont identifié un petit domaine de 107 aa appelé CAD (CRAC Activation Domain) présent dans la partie C-terminale de STIM1. Celui-ci lie directement les parties N et C-terminales du canal CRAC (Orai) entrainant son oligomérisation et par conséquent son ouverture (Park et al., 2009).

Localisation de STIM1

La localisation précise de STIM1 reste incertaine mais paraît cruciale pour comprendre son rôle exact sur les SOCEs. Une des hypothèses est que STIM est transportée puis insérée dans la membrane plasmique suite à la déplétion des stocks calciques du RE (Zhang et al., 2005). Au contraire, d'autres suggèrent que STIM s'agrège au niveau des motifs polyphosphoinositides à la membrane sans insertion et sans affecter la morphologie du RE (Liou et al., 2005; Wu et al., 2006; Smyth et al., 2007; Liou et al., 2007; Malli et al., 2008). STIM1 semble se retrouver, suite à la déplétion, vers des points en juxtaposition de la membrane plasmique afin de faciliter l'interaction avec les canaux SOCs dans les cellules HSG (Ong et al., 2007a) et dans les cellules lymphocytaires DT40 B (Baba et al., 2006). Varnai montre un changement de morphologie du RE formant alors des ponts avec la membrane plasmique et affirme que le phénomène de translocation de STIM1 est réversible (Varnai et al., 2007). La retranslocation de cette protéine vers la membrane du RE désactiverait les canaux SOCs. La réversibilité de la localisation de STIM1 à son état basal requière absolument le remplissage en calcium des stocks intracellulaires grâce aux entrées de calcium externe dans les cellules HEK-293. Ceci a été démontré par un inhibiteur indirect des canaux SOCs et CRACs: ML-9. Le réarrangement de STIM1 précéderait l'initiation des SOCEs et Icrac (Smyth et al., 2008). Ce même groupe a montré l'influence des microtubules dans l'organisation et les mouvements de STIM1 au niveau du RE qui optimiserait sa

communication avec les canaux Orai (voir ci-dessous) pour l'activation des SOCEs dans les HEK-293 (Smyth et al., 2007). Enfin, Pani et collaborateurs montrent quant à eux l'importance des radeaux lipidiques (riches en cavéolines) dans le regroupement de STIM1 au niveau des jonctions RE/membrane plasmique et dans l'interaction entre STIM1/TRPC1 pour l'activation des SOCs dépendant de TRPC1 dans les cellules HSG et HEK-293 (Pani et al., 2008).

3.1.2.5. Orai1

Récemment, un second constituant des canaux CRACs a été identifié, se nommant Orai (dans la mythologie grecque, Orai signifie gardien de la porte du paradis). L'appellation CRACM pour CRAC-Membrane a ensuite été suggérée. C'est une protéine de 4 domaines transmembranaires située à la membrane plasmique (Fig. 17). En plus d'Orai1, il existe deux autres membres de la famille, Orai2 et Orai3 chez les mammifères. Chez le nématode et la drosophile, seule une protéine existe et celle-ci ressemble fortement à Orai1. Les domaines N et C-terminaux sont cytoplasmiques. Au niveau de la partie N-terminale, seule Orai1 possède une région riche en proline/arginine. Au niveau des domaines C-terminaux, les trois protéines contiennent un domaine C-C, un motif commun pour les interactions protéiques (Fig. 17).

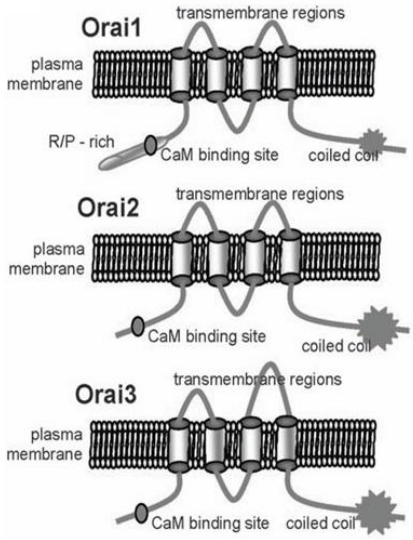


Figure 17: Structure d'Orai1, Orai2 et Orai3 (Frischauf et al., 2008).
Seule Orai1 contient au niveau N-terminal la région présentant deux résidus prolines et un résidu arginine. Les trois protéines consistent en quatre domaines transmembranaires. Un motif putatif Coiled-Coil se situe dans la partie C-terminale et un site de fixation pour la calmoduline sur la partie N-terminale. Orai3 présente une deuxième boucle extracellulaire plus grande que celle d'Orai1 et Orai2.

La mutation ponctuelle et naturelle (R91W) d'Orai1 est impliquée dans une maladie immunodéficiente (SCID pour Severe Combined Immuno Deficiency syndrome) entraînant l'extinction de la protéine Orai1 et par conséquent l'élimination du courant CRAC dans les

cellules immunitaires T provenant de patients atteints du SCID (Feske et al., 2006). L'expression d'Orai1 sauvage restaure l'activité des canaux CRACs dans ces cellules. Initialement, cette protéine n'était pas reconnue pour être liée avec d'autres protéines canaux. Mais en 2006, grâce à la mutagénèse dirigée, le groupe du Dr Cahalan's montre qu'une mutation ponctuelle (E180D), dans la boucle S1-S2 d'Orai1 chez la drosophile, transforme la sélectivité ionique au calcium avec une rectification entrante du CRAC vers une sélectivité pour les cations monovalents avec une rectification sortante (Yeromin et al., 2006). Un autre groupe montre qu'une mutation dans la région du pore d'Orai1 humaine change aussi les propriétés biophysiques des SOCEs (Prakriya et al., 2006). Ceci suggère alors qu'Orai1 est une sous unité essentielle formant le pore du canal. Orai est capable de former des homo ou hétéromères (Vig et al., 2006a). Une récente étude montre que le canal CRAC peut être formé de tétramères (Penna et al., 2008). Orai1 serait présent sous forme de dimère à la membrane plasmique dans les conditions basales et sa liaison avec STIM induirait une forme fonctionnelle tétramérique entrainant l'ouverture du pore.

Activation des SOCs: association dynamique entre STIM1, Orai1 et TRPCs

STIM1 et Orai1

Actuellement, STIM1 est impliquée dans l'homéostasie calcique. La suppression de l'expression de STIM1 diminue les entrées de calcium sans affecter le calcium release du RE ni le calcium au repos en réponse à une stimulation thapsigargine ou agoniste (Liou et al., 2005). Ceci a été démontré par plusieurs groupes de recherche par des expériences d'extinction du gène STIM par la technique de RNAi dans des cellules Hela (Liou et al., 2005; Jousset et al., 2007), dans les cellules S2 de drosophiles (Roos et al., 2005), dans les jurkats T humaines (Zhang et al., 2005), dans le muscle lisse des voies aériennes (Peel et al., 2006), dans les artères coronaires humaines (Takahashi et al., 2007b), les artères pulmonaires (Lu et al., 2009) et les HEK-293. Au contraire, la surexpression (x100) dans les HEK-293 augmente modestement les SOCEs (Spassova et al., 2006) suggérant alors que cette protéine ne forme pas le canal elle-même. STIM1 faciliterait l'assemblage et régulerait l'activité des SOCs dans différents tissus, servant alors de sous unité essentielle (Spassova et al., 2006). Csutora met en avant la théorie du CIF où STIM1 jouerait un rôle dans la production du CIF. Ce dernier activerait l'$iPLA_2$ entraînant alors l'activation des SOCs (Csutora et al., 2008). Le domaine SAM interagirait dans la lumière du RE avec le système produisant le CIF.

Plusieurs groupes proposent une interaction physique entre STIM1 et Orai1 comme mécanisme d'activation des SOCs. Cette idée est fortement justifiée par de nombreuses expériences. Premièrement, des coimmunoprecipitations de STIM1 et Orai1 surexprimées ont été montrées dans les cellules S2 (Yeromin et al., 2006) et HEK-293 (Vig et al., 2006b). Deuxièmement, la surexpression de ces deux protéines résulte en une remarquable amplification des courants CRAC (Zhang et al., 2006; Soboloff et al., 2006; Mercer et al., 2006). Troisièmement, la technique de FRET montre une proximité spatiale entre ces deux protéines (Muik et al., 2008). Quatrièmement, la surexpression de la partie C-terminale de STIM1 avec Orai1 suffit pour activer les SOCs (Penna et al., 2008) ainsi que le domaine CAD seul (Park et al., 2009). Tous ces travaux montrent clairement un couplage fonctionnel entre ces deux protéines. Le domaine C-C cytoplasmique de STIM1 interagirait avec celui d'Orai1 et faciliterait l'interaction entre ces deux protéines pour activer les courants Icrac (Stathopulos et al., 2006). Calloway démontre une association moléculaire électrostatique entre STIM1 et Orai1 (Calloway et al., 2009). Cette association semble être régulée par la dynamique de vidange ou de remplissage en calcium des stocks du RE. La déplétion s'accompagne d'un remodelage du RE qui favorise alors la translocation de STIM1 à la membrane plasmique. De plus, les résidus chargés négativement dans le domaine C-terminal d'Orai1 paraissent importants pour l'interaction avec STIM1 dans les cellules RBL et pour l'activité des SOCs dans les cellules COS-7.

STIM1 et TRPCs

STIM1 semble réguler directement ou indirectement aussi les TRPCs, composants des SOCs. L'interaction de STIM1 avec TRPC1 suite à la déplétion des stocks intracellulaires en calcium a été démontrée pour la première fois dans des cellules plaquettaires exprimant de manière endogène ces deux protéines (Lopez et al., 2006) et dans les HEK-293 exprimant STIM1 (Huang et al., 2006). Dans les HEK-293, TRPC1 et STIM1 forment un complexe stable. Ce dernier régulerait les entrées de calcium dépendantes de TRPC1. La partie C-terminale de STIM1 régule l'activité de TRPC1 par une interaction directe qui requière le domaine ERM notamment la région riche en lysine qui se lierait à la membrane par ces charges positives. L'expression du mutant STIM1 D76A constitutivement actif active TRPC1 et augmente son activité spontanée (Huang et al., 2006). En plus de TRPC1, STIM1 semble interagir directement avec TRPC4, et TRPC5 dans les cellules HEK-293 (Yuan et al., 2007). Une régulation indirecte de STIM1 sur les TRPCs a été récemment proposée par cette équipe. STIM1 induirait l'hétéromultimérisation des TRPCs, leur conférant une fonction SOC.

STIM1 régulerait TRPC3 et TRPC6 en tant que SOC par l'intermédiaire de TRPC1 pour TRPC3, et TRPC4 pour TRPC6. Lu et collaborateurs ont aussi montré STIM1 comme élément déclencheur des SOCEs dépendantes des TRPCs dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (Lu et al., 2008). Li a suggéré que TRPC1/TRPC5 et STIM1 contribueraient aux mêmes canaux SOCs par des interactions directes dans des cellules provenant de cultures primaires de veines saphènes humaines (Li et al., 2008). Sours-Brothers montre un rôle pour TRPC1/TRPC4 avec STIM1 dans les SOCEs dans les cellules mésangiales (Sours-Brothers et al., 2009).

STIM1, Orai1 et TRPCs

Les combinaisons possibles d'hétéromultimérisation apparaissent de plus en plus comme une caractéristique essentielle des canaux SOCs. Orai est connue aussi pour interagir avec les protéines TRPCs. En effet, Liao a démontré que les SOCs seraient formés d'une sous unité régulatrice β constituée de la protéine Orai1 liée à la sous unité fonctionnelle TRPC (Liao et al., 2007). Orai1 interagirait *in vitro* avec les domaines N et C-terminaux de TRPC1. STIM1 jouerait essentiellement le rôle de senseur au calcium lors de la déplétion et entrainerait l'activation des SOCs dans les cellules HEK-293. Cheng et collaborateurs ont montré aussi une association entre STIM/TRPC1 exogènes et Orai1 endogène (Cheng et al., 2008). Ce complexe forme un canal SOC fonctionnel dans les cellules HEK-293. D'autres part, l'assemblage dynamique des trois protéines STIM/Orai/TRPC formant un complexe ternaire serait important pour la genèse d'un courant Isoc dans les cellules HSG et serait réalisé suite à la déplétion en calcium des stocks intracellulaires (Ong et al., 2007b) (Fig. 18).

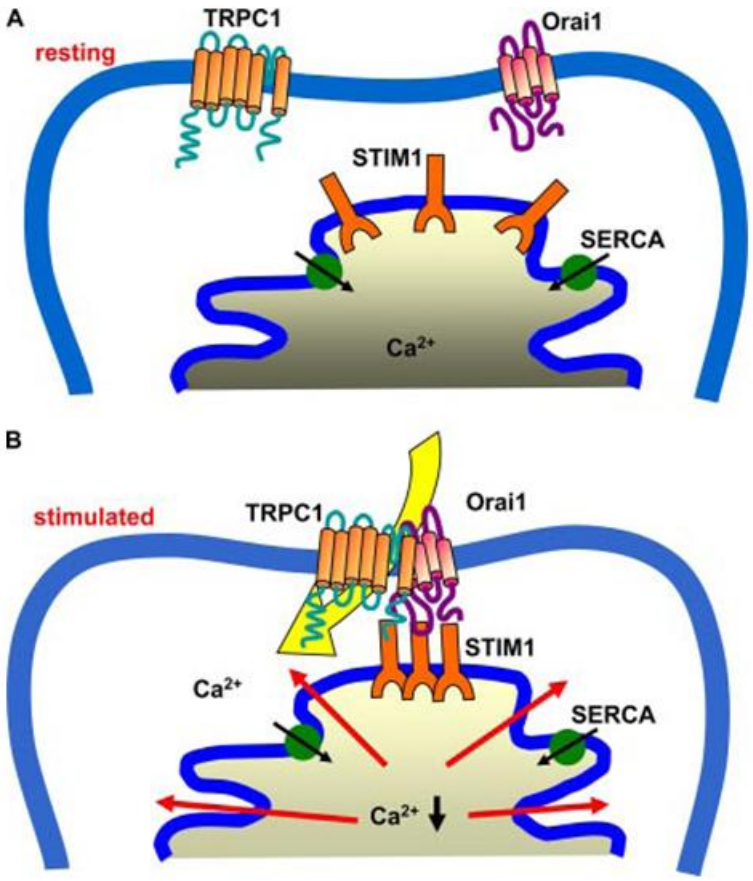


Figure 18: Modèle proposé d'interaction entre TRPC1, STIM1 et Orai1 (Ong et al., 2007).
Au repos, TRPC1 et Orai1 sont présents de part et d'autre de la membrane plasmique alors que STIM1 se situe au niveau du RE. La déplétion en calcium du RE induit l'agrégation de STIM1 et l'interaction avec Orai. Ceci entraine la formation dynamique d'un complexe ternaire entre ces trois protéines et de ce fait l'entrée de calcium dans la cellule.

Ces travaux ont conduit aux conclusions de Jardin et collaborateurs qui proposent qu'Orai1 permettrait la communication entre STIM1 et hTRPC, facteur essentiel pour le mode d'activation des canaux TRPCs (Jardin et al., 2008). Dans les conditions normales, STIM1 interagit avec le complexe Orai1/TRPC1 au niveau de la membrane plasmique suite à la déplétion des stocks intracellulaires de calcium activant les SOCs dépendants de TRPC1. La diminution de l'interaction STIM/TRPC par l'utilisation d'anticorps dirigé contre Orai1 entraine un changement dans le mode d'activation de TRPC qui devient alors DAG-dépendent (Jardin et al., 2008). Dans les plaquettes sanguines humaines, STIM1 régulerait le mode d'activation de TRPC1. Le mode d'activation de hTRPC dépend du nombre de protéines STIM, Orai et TRPC. La surexpression de STIM1 et Orai1 seule oriente les TRPCs vers la voie SOC, au contraire la surexpression de STIM1 ou Orai1 n'aurait pas d'influence sur le mode d'activation des TRPCs (Liao et al., 2008). Par contre, Zeng et collaborateurs

démontrent que STIM1 active Orai1 et les canaux TRPCs par des mécanismes différents dans les cellules HEK-293 (Zeng et al., 2008). Ce serait par une interaction électrostatique que STIM1 activerait les TRPCs contrairement à Orai1.

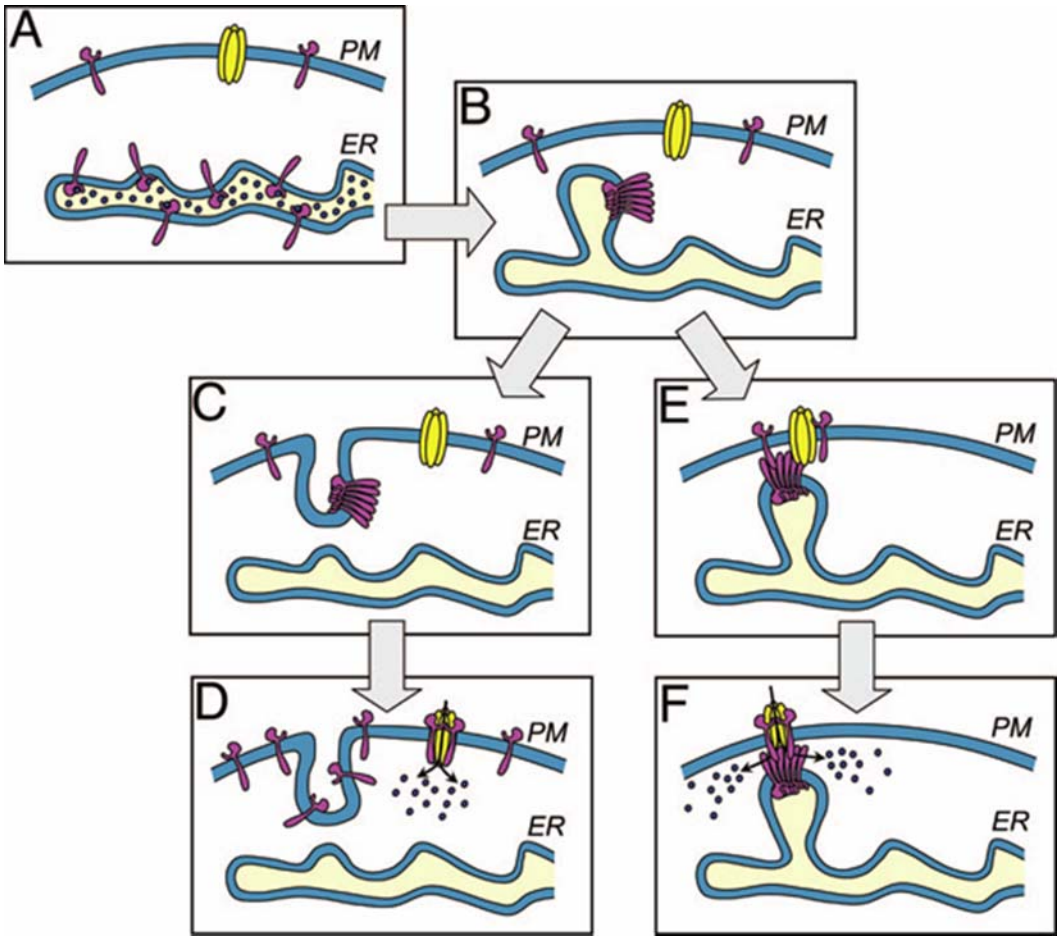


Figure 19: Résumé des différents modèles d'action de STIM1 sur les SOCs (Spassova et al., 2006).
(A) Les cellules au repos ont leurs RE remplis de calcium. STIM1 (en rose) lie le calcium par son domaine EF-hand et se situe principalement sur la membrane du RE mais aussi elle apparaît sur la membrane plasmique.
(B) Suite à la vidange du RE, STIM1 s'agrège au niveau du RE dans une région proche de la membrane cellulaire.
(C) Modèle d'insertion: STIM1 est transportée puis insérée à la membrane plasmique.
(D) Le fort taux de STIM1 à la membrane est suffisant pour activer les SOCs (Orai et/ou TRPC) grâce à une interaction physique.
(E) Modèle d'influence: Les agrégats de STIM1 sont à proximité de ceux présents à la membrane cellulaire entrainant une réorganisation des protéines STIM1 pour une meilleure interaction avec les canaux SOCs.
(F) Cette réorganisation permet la formation d'un complexe avec les canaux SOCs et les active.

En conclusion, ces travaux montrent que le domaine EF-hand de STIM1 qui réside dans la lumière du RE lie le calcium et inhibe l'activité de STIM1 quand les stocks sont remplis de calcium. Quand le calcium intraluminal diminue, le calcium se dissocie du motif EF-hand activant la translocation de STIM1 vers la membrane plasmique. Ce dernier active les canaux SOCs par un mécanisme qui implique le domaine ERM ou le domaine CAD et la région riche en lysine. Orai1 et les TRPCs peuvent de manière indépendante supporter les courants Icrac ou I_{SOC} ou peuvent interagir ensemble pour former un canal SOC avec des propriétés différentes selon le type cellulaire (Fig. 19).

3.1.2.6. STIM et Orai dans le muscle squelettique

Il est maintenant admis que les SOCs dans les cellules excitables ont un rôle fondamental dans le remplissage des stocks internes en calcium afin de préparer la cellule à une nouvelle contraction. Le défaut des canaux SOCs durant des trains répétés de stimulations dans le muscle entraine une fatigue musculaire et une intolérance à l'exercice (Pan et al., 2002). Stiber et collaborateurs ont mis en évidence un rôle important de STIM1 dans les SOCs dans le muscle squelettique (Stiber et al., 2008). En effet, STIM1 est exprimée faiblement dans les myoblastes C2C12 et son expression est augmentée après la différenciation en myotubes plurinucléés. STIM1 est aussi largement présente dans le muscle squelettique mature adulte. Cette augmentation de l'expression de STIM1 est corrélée avec celle des SOCEs lors de la différenciation musculaire. Parallèlement, des souris STIMgt-/gt-, exprimant STIM1 sans domaine C-terminal résultant en une perte de fonction de cette protéine, ont été crées. Ces souris présentent un sévère retard de croissance et meurent après la naissance d'une myopathie congénitale. Les myotubes dépourvus de STIM1 ont une diminution des SOCEs et fatiguent plus rapidement que les myotubes provenant de souris sauvages. Ces myotubes présentent également un défaut de remplissage du RS. Ces travaux montrent l'importance des SOCs dépendants de STIM1 dans le remplissage des stocks intracellulaires qui seront soumis à des stimulations répétées pour préparer la cellule à une nouvelle dépolarisation lors de la contraction.

Par contre, Lyfenko et Dirksen proposent deux entités différentes pour les SOCs et les ECCEs (Lyfenko et Dirksen, 2008). Cette étude montre que les SOCEs requièrent STIM1 et Orai1 dans les myotubes provenant de cultures primaires de muscles squelettiques de souris sauvages et souris dyspédiques (dépourvues de RyR1) mais pas les ECCEs (Lyfenko et Dirksen, 2008). De ce fait, ces deux voies d'entrées calciques reflètent deux entités

moléculaires distinctes au niveau des tubules T qui servent à limiter la fatigue musculaire pendant les contractions répétées.

Le troisième candidat des SOCs, Orai semble lui aussi être largement exprimé dans le muscle de souris. La génération de souris KO Orai1-/Orai1- va entraîner également un défaut de la croissance de la souris (Vig et al., 2008). De manière similaire, la maladie immunitaire sévère due à la mutation ponctuelle et naturelle d'Orai (R91W) chez l'homme est parfois accompagnée chez certains patients d'une myopathie congénitale non progressive. Ces observations laissent à penser que STIM1 et Orai1 sont impliquées dans la différenciation musculaire. Darbellay et collaborateurs se sont d'ailleurs intéressés à ce sujet (Darbellay et al., 2009). En effet, les SOCEs orchestrées par STIM1 et Orai1 sont cruciales dans le processus de différenciation des myoblastes humains en myotubes plurinuclées. Les myoblastes traités avec des siRNA contre STIM1 et Orai1 présentent une diminution des SOCEs et par conséquent une inhibition de l'initiation de la différenciation en myotubes. Par contre, STIM1 et Orai ne jouent pas de rôle dans la migration cellulaire ni dans la différenciation terminale.

3.1.3. Système d'extrusion du calcium sur le sarcolemme

Il existe deux systèmes d'extrusion du calcium au niveau du sarcolemme pour maintenir une concentration en calcium cytosolique faible, l'échangeur Na^+/Ca^{2+} et la pompe Ca^{2+}-ATPase ou PMCA (Plasmalemma Ca^{2+}-ATPase).

3.1.3.1. L'échangeur Na^+/Ca^{2+}

L'échangeur Na^+/Ca^{2+} est un antiport électrogénique qui permet le transport de trois ions Na^+ dans un sens en échange d'un ion Ca^{2+} dans le sens opposé. La direction de l'échange dépend du gradient électrochimique transmembranaire des deux espèces d'ions transportées. Ainsi, l'échangeur possède deux modes de fonctionnement appelés mode «normal» et mode «inverse» qui correspondent respectivement à une sortie et une entrée de calcium (Donoso et Hidalgo, 1989). Les principaux inhibiteurs de l'échangeur sont l'amiloride et ses dérivés mais d'autres composés organiques et inorganiques sont susceptibles d'affecter son activité (Donoso et Hidalgo, 1989; pour revue: Matsuda et al., 1997).

Il existe trois isoformes de l'échangeur Na^+/Ca^{2+}: NCX1 (Na^+/Ca^{2+} eXchanger), NCX2 et NCX3 codées par trois gènes distincts. NCX1 est exprimé de manière ubiquitaire tandis que NCX2 et NCX3 sont limités au niveau du cerveau et du muscle squelettique (pour revue: Matsuda et al., 1997). Les cellules musculaires squelettiques expriment NCX1 et NCX3 de

manière spécifique du type de muscle et du stade de développement (Deval et al., 2000; Fraysse et al., 2001).

Les derniers modèles structuraux de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} représentent 11 segments transmembranaires séparés en deux groupes (Nicoll et al., 1999) par une large boucle intracellulaire (Fig. 20). Cette dernière présente des sites de régulation et le site de liaison du calcium (pour revue: Matsuda et al., 1997). Ce mécanisme a une faible affinité pour le calcium mais une capacité de transport plus élevée que les pompes Ca^{2+}-ATPases.

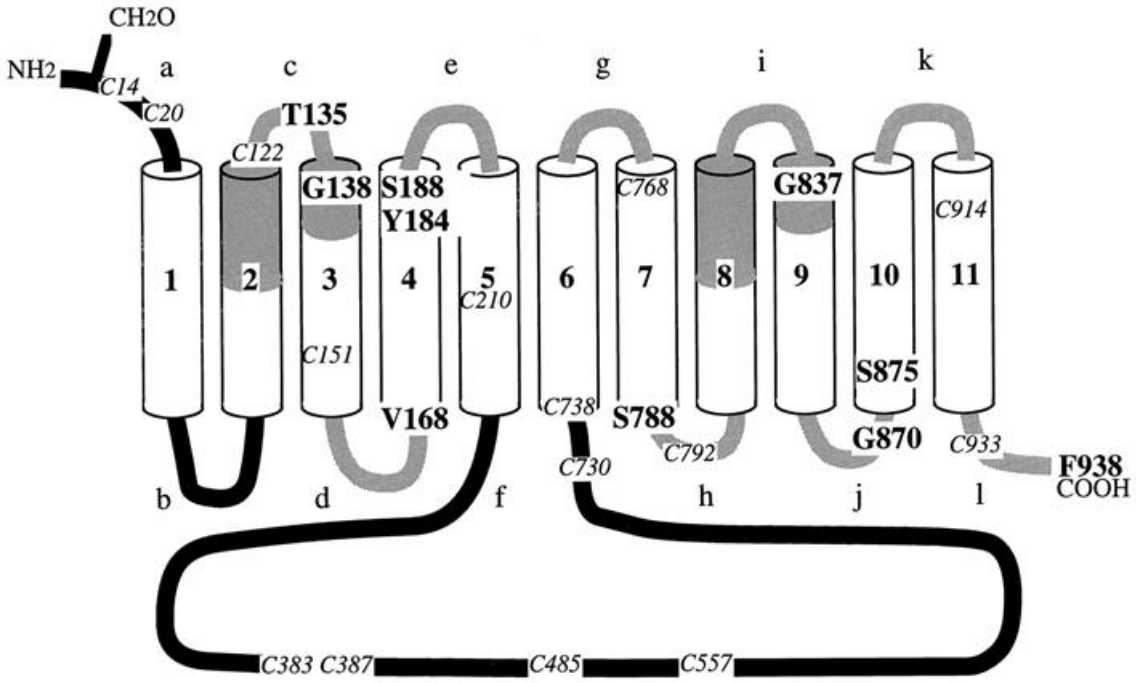


Figure 20: L'échangeur Na^+/Ca^{2+} (Nicoll et al., 1999).
Les analyses d'hydropathie révèlent 11 segments transmembranaires séparés en deux par une large boucle intracellulaire entre le segment 5 et 6.

De nombreux rapports suggèrent une implication secondaire de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} dans l'activité contractile intense du muscle squelettique chez l'adulte lorsque la concentration en calcium est maintenue élevée de manière prolongée (Balnave et Allen, 1998). Cet échangeur pourrait même jouer un rôle dans la myopathie de Duchenne (Deval et al., 2002).

3.1.3.2. La pompe Ca^{2+}-ATPase (PMCA)

A l'inverse de l'échangeur Na^+/Ca^{2+}, la pompe PMCA (Plasma-Membrane Calcium ATPase) peut transporter le calcium contre son gradient électrochimique en hydrolysant de l'ATP. Elle transporte un ion Ca^{2+} par molécule d'ATP hydrolysée. La PMCA a une haute affinité pour le calcium et joue donc un rôle important dans le maintien d'une concentration en calcium basale. Quatre gènes codant pour quatre isoformes de la PMCA ont été identifiés: PMCA1,

PMCA2, PMCA3, PMCA4. Il existe de multiples formes d'épissage alternatif (pour revue: Strehler et Zacharias, 2001). Ces isoformes se répartissent différemment dans les tissus. Les isoformes PMCA1, 2 et 3 sont fortement exprimées dans le cerveau. Les types 2 et 3 sont exprimés dans les cellules excitables telles que le muscle strié. La PMCA possède une structure similaire aux pompes SERCA du RS (pour revue: Strehler et Zacharias, 2001). Elle possède dix domaines transmembranaires, une masse moléculaire de 120 à 140 kDa et ses domaines C et N-terminaux sont cytoplasmiques (Fig. 21). La large boucle cytoplasmique entre les domaines transmembranaires 4 et 5 contient le site catalytique alors que le domaine C-terminal cytoplasmique possède de nombreux sites de régulation (pour revue: Strehler et Zacharias, 2001).

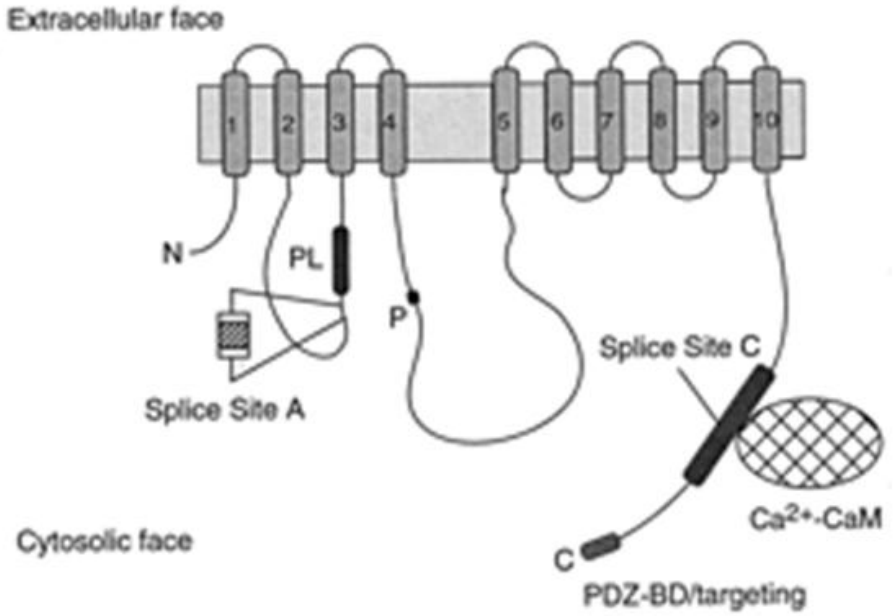


Figure 21: La pompe Ca^{2+}-ATPase (PMCA) (Strehler et Zacharias, 2001).
Représentation de la structure de la pompe PMCA sous sa forme activée par la calmoduline liée au calcium.

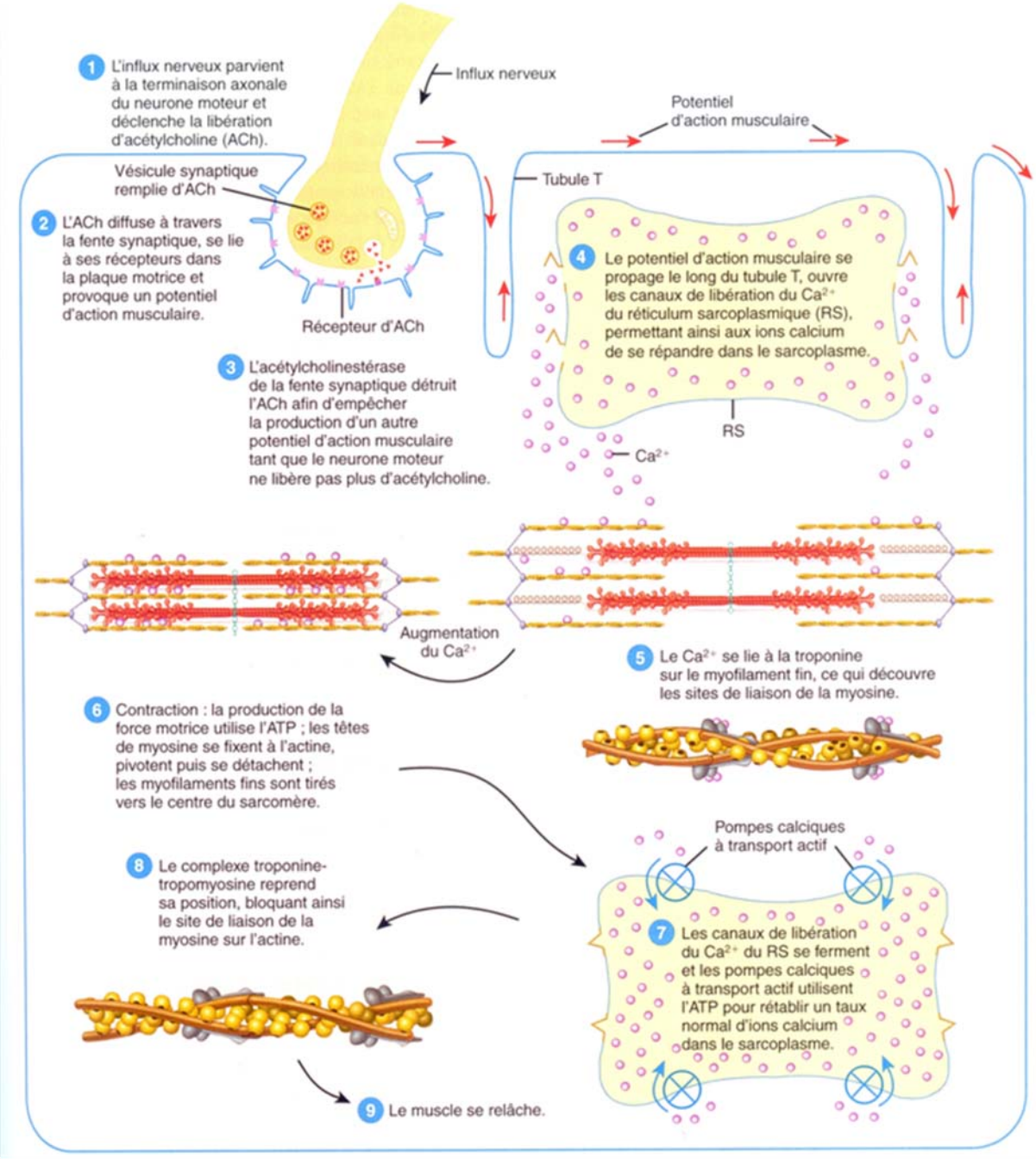


Figure 22: Le Couplage Excitation/Contraction dans le muscle squelettique (Principes d'Anatomie et de Physiologie, Tortora et Grabowski, 2001).
Représentation schématique des événements intervenant dans la contraction du muscle squelettique.

C. Le Couplage Excitation/Contraction: rôle essentiel du calcium

Le terme de couplage Excitation/Contraction fut initialement proposé par Sandow en 1965, pour désigner, dans la fibre musculaire squelettique, les étapes conduisant de l'excitation du sarcolemme à la contraction des myofibrilles (Sandow, 1965). Une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol déclenche la contraction musculaire, tandis qu'une diminution l'interrompt. L'initiation de la contraction musculaire a lieu au niveau de la plaque motrice (Fig. 22). La zone au niveau de laquelle se trouve la synapse est la Jonction NeuroMusculaire (JNM). L'influx nerveux se propage le long du nerf moteur sous forme de Potentiel d'Action (PA) jusqu'aux terminaisons nerveuses de la plaque motrice qui libère l'Acétylcholine (Ach) se liant alors à ses récepteurs-canaux nicotiniques. Cette fixation entraine l'ouverture de ceux-ci et l'entrée de Na^+, ce qui a pour effet d'engendrer une dépolarisation locale. Cette dépolarisation déclenche alors un PA qui se propage le long du sarcolemme et pénètre en profondeur le long des tubules T de la fibre musculaire. La dépolarisation des tubules T provoque la libération de calcium dans le cytoplasme grâce au couplage physique DHPR/RyR au niveau des triades, ce qui élève la concentration en calcium cytoplasmique d'un facteur 10. Le DHPR, partie intégrante du canal calcique voltage-dépendant de type L (voir paragraphe 3.1.1) est le détecteur de potentiel de la membrane des tubules T et le RyR constitue le canal calcique au niveau du RS qui permet la libération de calcium dans le cytosol. Le calcium se lie par la suite à la troponine sur le filament fin et force les complexes troponine-tropomyosine à s'éloigner des sites de liaison de la myosine sur l'actine (Fig. 23).

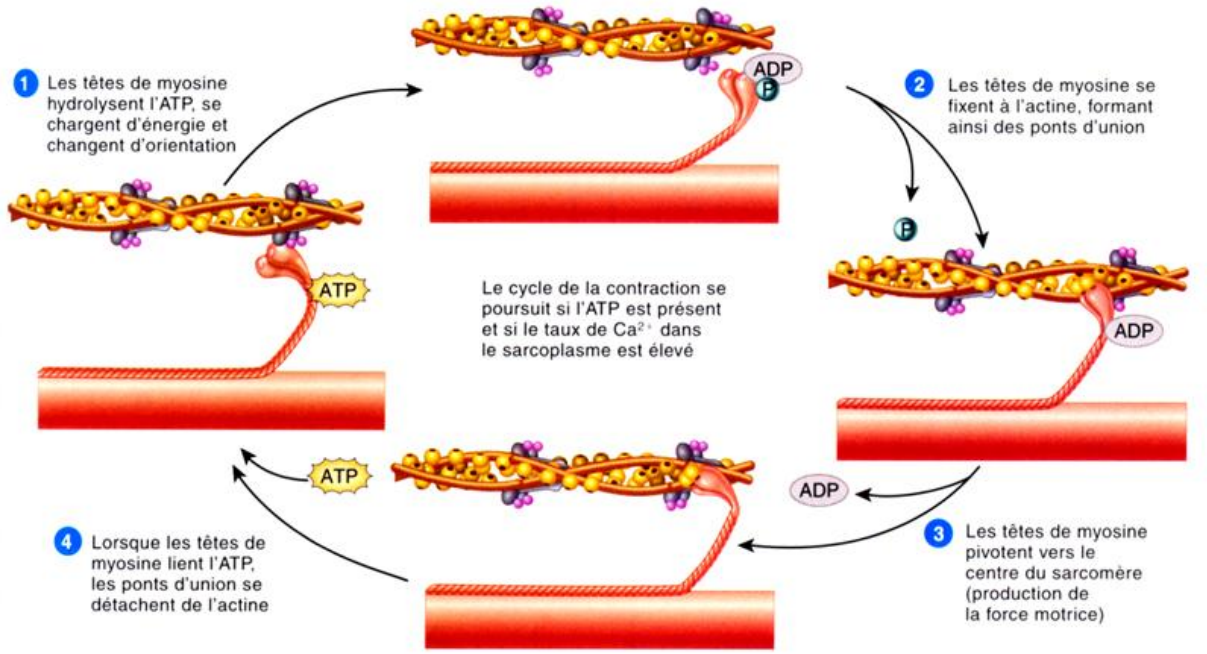


Figure 23: Cycle énergétique lors de la contraction du muscle squelettique (Principes d'Anatomie et de Physiologie, Tortora et Grabowski, 2001).
Séquence d'événements produisant le glissement des filaments d'actine lors de la contraction musculaire.

Ce processus s'accompagne de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par l'activité ATPasique des têtes de myosine qui se chargent d'énergie et changent d'orientation (1). La tête de myosine activée se fixe sur l'actine puis libère le groupement phosphate hydrolysé auparavant (2). La libération du Pi déclenche la production de la force motrice de la contraction, pendant laquelle la poche de la tête de myosine où l'ADP est toujours fixée s'ouvre, ce qui fait pivoter la tête de myosine et libère l'ADP (3). Ce pivotement de la tête de myosine vers le centre du sarcomère produit l'énergie qui fait glisser le filament fin contre le myofilament épais en direction de la ligne M (centrale). La contraction des myofibrilles se fait par glissement des filaments minces le long des filaments épais, de telle sorte que les myofilaments se chevauchent davantage. La tête de myosine reste fermement attachée à l'actine jusqu'à ce qu'elle lie une autre molécule d'ATP (4). Tandis que l'ATP se lie à la tête de myosine, cette dernière se sépare de l'actine. Lorsque le RS récupère les ions calcium cytosoliques via la pompe SERCA, la tropomyosine masque à nouveau les sites actifs de liaison à l'actine, la contraction prend fin et les filaments reprennent leur position initiale.

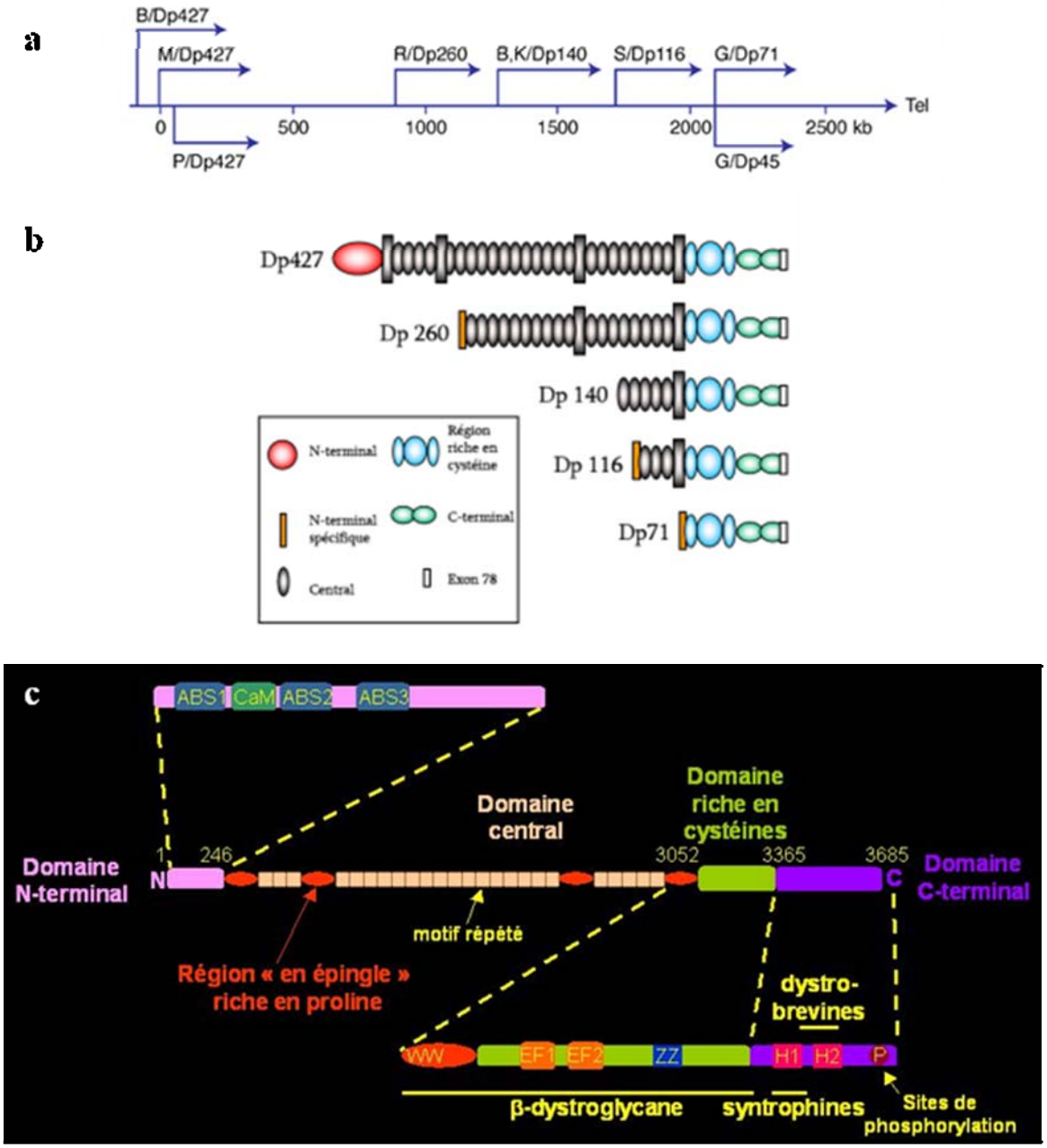


Figure 24: Structure de la dystrophine.
a) Organisation du gène DMD. Localisation des promoteurs tissus spécifiques de la Dp427 et des promoteurs internes responsables de l'expression de produits courts du gène DMD (B: Brain; P: cellules de Purkinje; M: Muscle) (Wells et al., 2002).
b) Schématisation de la structure de la dystrophine et des 4 produits courts issus du gène DMD (Ervasti, 2007).
c) Structure de la dystrophine. Le schéma représente dans sa partie supérieure un agrandissement du domaine N-terminal et dans sa partie inférieure un agrandissement du domaine C-terminal. Les domaines d'interaction avec les protéines associées à la dystrophine sont également représentés par les traits jaunes (Sadoulet-Puccio et al., 1996).

D. DAPs (Dystrophin-Associated Proteins) et Physiopathologie

1. La dystrophine: structure et fonction

1.1. Présentation du gène

La mise en évidence de la dystrophine constitue le premier succès de la génétique inverse, démarche qui consiste à localiser, isoler et cloner un gène impliqué dans une maladie génétique puis d'identifier la ou les protéine(s) codée(s) par ce gène. La localisation chromosomique du gène impliqué dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est sur le bras court du chromosome X (Monaco et al., 1986; Koenig et al., 1987), en région Xp21 (Boyd et Buckle, 1986). L'isolement des premières portions du gène a été effectué par Monaco en 1986 et le séquençage complet par Koenig en 1987 (Monaco et al., 1986; Koenig et al., 1987). Le gène de la dystrophine est le plus grand gène connu, contenant 2,5 Mb d'ADN, ce qui correspond à environ 1 % du chromosome X. La partie codante (environ 14 kb) contient 79 exons séparés par des introns pouvant atteindre 200 kb (Koenig et al., 1987) et seul 0,6 % du gène code pour la dystrophine. Le transcrit est exprimé de manière prédominante dans les muscles squelettique et cardiaque et avec un faible taux dans le système nerveux central (Monaco et al., 1986; Koenig et al., 1987; Monaco et al., 1987). L'ARNm de la dystrophine est sous le contrôle de trois promoteurs indépendants et spécifiques du tissu. A ce jour, trois isoformes longues et cinq produits courts codés à partir du gène DMD ont été mis en évidence.

1.2. Isoformes de la dystrophine et épissage alternatif

Trois promoteurs spécifiques du tissu ne différant que par leur premier exon, situés en 5' du gène DMD produisant un ARMm d'une longueur totale de 14 kb, sont à l'origine de trois isoformes de 427 kDa (Dp427) (Fig. 24a). Il existe l'isoforme Dp427-B issue du promoteur pB (pour Brain) active dans les neurones du cortex et de l'hippocampe (Chelly et al., 1990), l'isoforme Dp427-M active principalement dans le muscle et faiblement dans les cellules gliales (Chelly et al., 1990), l'isoforme Dp427-P active dans les cellules de Purkinje mais aussi dans le muscle squelettique (Holder et al., 1996). La découverte de plusieurs promoteurs internes dans le gène de la dystrophine a conduit à la mise en évidence de différents produits courts nommés en fonction de leur masse moléculaire: Dp260, Dp140, Dp116, Dp71, Dp45 (Fig. 24b).

1.3. Structure de la dystrophine et localisation

La séquence de la dystrophine est relativement bien conservée entre les espèces. L'analyse des acides aminés suppose une protéine de 427 kDa (protéine de 3685 aa), de forme allongée entrant dans la composition du cytosquelette β-spectrine/α-actinine (Koenig et al., 1988), associée à la membrane. Elle peut être divisée en quatre parties (pour revues: Hopf et al., 2007; Ervasti et Sonnemann, 2008) (Fig. 24c):

- *La partie amino-terminale* est composée de 240 aa et possède une homologie de séquence avec la région de l'α-actinine et de la spectrine liant la F-actine. Elle contient au moins trois sous unités ABS1, 2 et 3 (Actin Binding Site) qui sont chacune susceptible de fixer le cytosquelette d'actine. Elle comprend également deux sites d'interaction avec la calmoduline (CaMBS1 et 2).
- *Le domaine central* est composé de plus de 2800 aa, répartis en 24 séquences d'environ 109 aa, similaires aux éléments répétés triples hélices α de la β-spectrine et de l'α-actinine. Il contient également quatre zones charnières non répétées, riches en résidus prolines, qui confèrent la flexibilité et l'élasticité de la protéine (Koenig et Kunkel, 1990). Le domaine central est lui aussi capable de lier l'actine par la présence de deux domaines ABS4 et 5. Un domaine possédant une séquence consensus d'interaction protéique entourée de tryptophanes, appelé domaine WW, est présent au niveau de la quatrième zone charnière, à cheval entre le domaine central et le domaine riche en cystéine.
- *Le domaine riche en cystéine* comprend 280 aa dont 15 cystéines. Il présente deux sites potentiels de liaison au calcium (EF-hand motif 1 et 2) et un site potentiel de fixation du zinc, le domaine ZZ. L'ensemble de ces domaines associés au domaine WW constitue une région qui lie le β-dystroglycane.
- *La partie carboxy-terminale* est formée d'au moins 320 aa. Ce domaine est nommé C-C (Coiled-Coil). Il est composé de deux hélices α permettant la formation de dimères parallèles hélice alpha/hélice alpha. Ce domaine contient le site de liaison aux protéines cytoplasmiques sous sarcolemmiennes que sont la dystrobrévine et les syntrophines. Enfin, ce domaine possède de forte homologie avec l'utrophine, protéine de la même famille que la dystrophine encodée sur le chromosome 6 (Love et al., 1989). Des sites de phosphorylation par différentes kinases et des sites de fixation à la

calmoduline sont présents sur ce domaine et modulent les interactions entre la dystrophine et ses protéines associées.

La dystrophine est localisée sous le sarcolemme des fibres musculaires squelettiques au niveau des costamères (Straub et al., 1992), avec une expression accrue aux jonctions neuromusculaires et myotendineuses (Miike et al., 1989; Samitt et Bonilla, 1990). Les costamères constituent une zone de liaison entre le cytosquelette périsarcomérique et la membrane plasmique, permettant la transmission des forces développées par l'appareil contractile, au sarcolemme et à la matrice extracellulaire.
L'étude de la structure de la dystrophine met en évidence un rôle dans l'ancrage du cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire via un complexe glycoprotéique appelé DAPs (Dystrophin-Associated Proteins) composé d'au moins 10 protéines différentes. La présence de la dystrophine et de son complexe associé est importante pour la stabilité mécanique de la membrane cellulaire et est essentielle dans la protection de la fibre musculaire contre les dommages engendrés par des cycles répétés de contraction et relaxation.

2. Le complexe macromoléculaire lié à la dystrophine: DAP

Ce complexe traverse la membrane et lie le cytosquelette d'actine à la lame basale du muscle. De ce fait, le DAP est considéré comme un lien entre l'intérieur et l'extérieur du muscle. Il peut être divisé en sous-complexes. Cette division est basée sur leur localisation dans la cellule et leur association physique entre eux. En utilisant une extraction protéique par des détergents et une électrophorèse en 2 dimensions, Yoshida et collaborateurs ont montré que le DAP pouvait être séparé en trois complexes bien distincts (Yoshida et al., 1994). Ces sous groupes sont le complexe des dystroglycanes, celui des sarcoglycanes et du sarcospane et, enfin, le complexe cytoplasmique (Ervasti et Campbell, 1993; pour revues: Tinsley et al., 1994; Lapidos et al., 2004; Allikian et McNally, 2007; Ervasti et Sonnemann, 2008) (Fig. 25).
Les α et β-dystroglycanes sont les premiers composants du DAP à avoir été cloné (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Dans le muscle, l'α-dystroglycane a un poids moléculaire de 156 kDa alors que le β-dystroglycane fait 43 kDa. Le β-dystroglycane a un seul domaine transmembranaire et est inséré dans le sarcolemme avec sa partie C-terminale cytoplasmique. Au contraire, l'α-dystroglycane est une large protéine glycosylée, localisée dans la matrice extracellulaire. Elle est associée directement à l'isoforme β par de nombreuses liaisons covalentes. La région C-terminale du β-dystroglycane, riche en proline, lie

directement la dystrophine au niveau de sa région riche en cystéine plus particulièrement avec les domaines WW, EF-hand et ZZ.

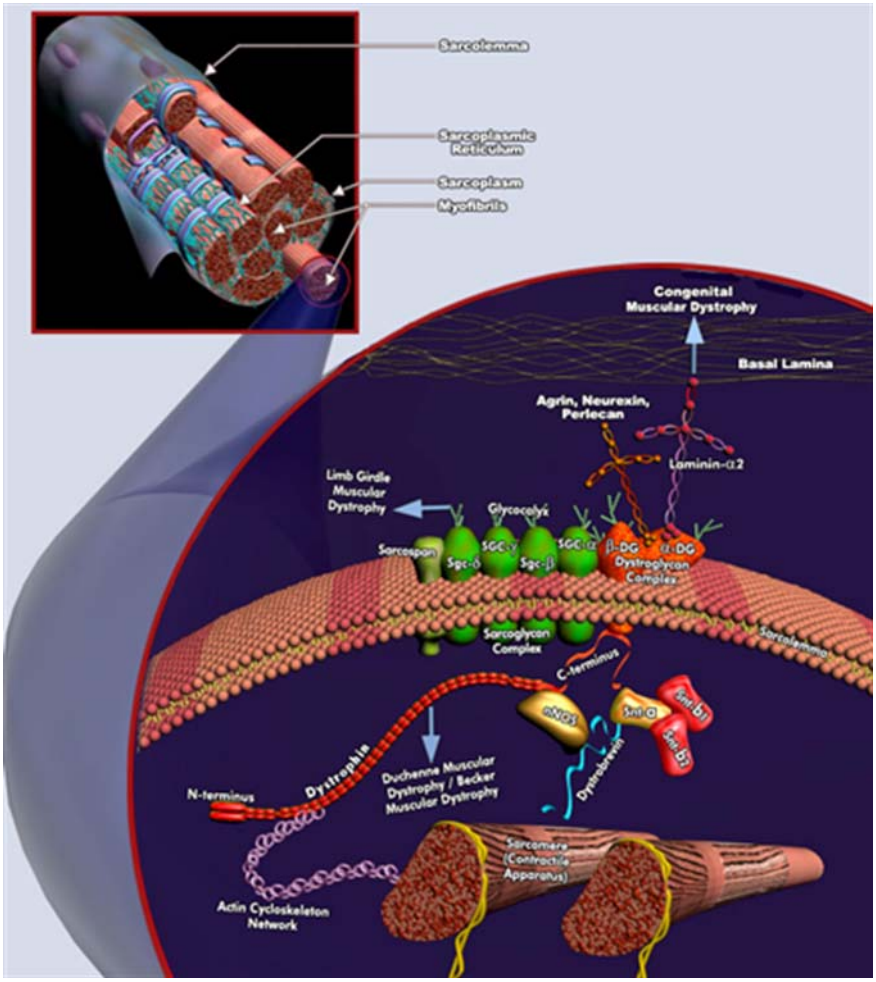


Figure 25: Représentation schématique de la dystrophine et de son complexe protéique associé (DAP) liant le cytosquelette d'actine à la membrane extracellulaire (Snt, syntrophines) (https://www1.qiagen.com/Geneglobe/Pathway).

Le sous complexe sarcoglycane/sarcospane (pour revue: Allikian et McNally, 2007) est composé des isoformes α, β, γ et δ-sarcoglycanes et du sarcospane. Tous les sarcoglycanes sont des glycoprotéines avec un seul domaine transmembranaire, de longs domaines extracellulaires et de courts domaines cytoplasmiques. Le sarcospane avec quatre segments transmembranaires est connu pour coordonner des interactions entre protéines transmembranaires.

Les protéines cytoplasmiques comprennent les dystrobrévines et les syntrophines. Plusieurs études montrent que la dystrophine lie directement la dystrobrévine. Cette dernière est ainsi nommée car elle présente une forte homologie de séquence avec le domaine C-terminal de la

dystrophine. Deux gènes codent pour de multiples isoformes de la dystrobrévine avec une prédominance de l'isoforme α dans le muscle squelettique. L'α-dystrobrévine1 est présente dans les jonctions neuromusculaires alors que l'α-dystrobrévine2 est exprimée uniformément le long du sarcolemme. La présence de deux motifs C-C sur les domaines C-terminaux de la dystrophine et l'α-dystrobrévine est responsable de leurs interactions entre elles. L'α-dystrobrévine interagit avec le complexe sarcoglycane par son domaine N-terminal suggérant un rôle dans le couplage entre la dystrophine et le complexe glycoprotéique. Dernièrement, un nouveau rôle de la dystrobrévine dans la transduction de signaux cellulaires impliquant la PKA a été mis en évidence (Ceccarini et al., 2007).

Le complexe DAP interagit aussi avec la nNOS (neuronal-type Nitric Oxide Synthase) où son produit biologique, le NO, module la contraction dans le muscle squelettique. Une autre protéine associée avec le DAP est la cavéoline-3. Les cavéolines sont les principaux composants des cavéoles, qui sont des invaginations du sarcolemme riches en cholestérol et en sphingolipides.

E. Les syntrophines

1. Présentation du gène et isoformes de la syntrophine

La syntrophine est une protéine de 58-60 kDa qui a été observée pour la première fois au niveau des membranes post-synaptiques des organes électriques du poisson torpille *Torpedo* (Froehner, 1984, Froehner et al., 1987). Cette protéine a été montrée par la suite dans différents tissus de mammifères. Trois isoformes différentes de la syntrophine codées par des gènes distincts ont été identifiées puis clonées. Chaque isoforme possède 50 % d'homologie de séquences (pour revue: Tinsley et al., 1994). Les trois isoformes peuvent être séparées en deux classes selon leur point isoélectrique (Yamamoto et al., 1993). La forme acide, l'α1-syntrophine (pI~6,7), a été clonée chez la torpille, la souris, le lapin et l'homme (Adams et al., 1993; Yang et al., 1994; Ahn et Kunkel, 1995). Il existe deux formes basiques, β1 et β2-syntrophines (pI~9,0). L'ADNc complet chez l'humain de la β1-syntrophine a été cloné et il se situe sur le chromosome 8q23-24 (Ahn et al., 1994). La localisation du gène humain pour l'α1-syntrophine est sur le chromosome 20q11.2 et celle de la β2-syntrophine est 16q23-24 (Ahn et al., 1996). L'isoforme α n'a que 54 et 50 % d'homologies avec β1 et β2 respectivement et les isoformes β n'ont que 57 % d'homologies entre elles (Ahn et al., 1996).

2. Localisation des syntrophines

Chaque isoforme montre une distribution tissulaire unique. Des analyses de Northern blot montrent que l'ARNm de l'α1-syntrophine, comme la dystrophine, est exprimé de manière prédominante dans le muscle squelettique mais il est aussi exprimé dans le muscle cardiaque, le rein et le cerveau (Adams et al., 1993; Ahn et al., 1996). Dans le muscle squelettique, la distribution sous sarcolemmienne de l'α1-syntrophine semble être la même que celle de la dystrophine. Ces deux protéines sont à la fois concentrées au niveau du sarcolemme mais aussi au niveau des jonctions neuromusculaires (Peters et al., 1994). L'ARNm de la β1-syntrophine est exprimé préférentiellement dans le foie, les muscles lisse et squelettique et de manière plus modérée dans le cerveau et le muscle cardiaque. La β2-syntrophine est exprimée dans une large variété de tissus, à haut niveau dans les testicules, cerveau, muscle cardiaque, rein et poumons mais à faible niveau dans le muscle squelettique où les protéines sont strictement localisées dans les jonctions neuromusculaires (Peters et al., 1994). De manière plus visible, les trois isoformes sont présentes au niveau des jonctions neuromusculaires du muscle squelettique mais avec une distribution différente (Peters et al., 1997). L'α1-syntrophine est présente au niveau post-synaptique où les récepteurs à l'acétylcholine sont enrichis. Elle est d'ailleurs la première protéine à apparaitre dans les synapses lors du développement. La β2-syntrophine est la plus abondante dans les synapses et est également présente au niveau pré-synaptique. Plus récemment, d'autres isoformes chez la souris ont été mises en évidence, les γ1 et γ2-syntrophines. L'isoforme γ1 semble être hautement exprimée dans le cerveau et plus particulièrement dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, les cellules de Purkinje et du cortex. L'isoforme γ2 est exprimée dans plusieurs tissus incluant le muscle squelettique où cette protéine parait concentrée près des jonctions neuromusculaires. Dans les neurones et dans le muscle, les isoformes γ-syntrophines sont aussi localisées au niveau du RE/RS où elles auraient un rôle dans le transport des protéines (Alessi et al., 2006).

3. Structure des syntrophines

Adams et collaborateurs ont cloné la séquence entière chez la souris et l'homme de l'α1-syntrophine et de la β2-syntrophine (Adams et al., 1995). L'analyse de la séquence révèle la présence de deux domaines PH1 et PH2 (Pleckstrin Homology), un domaine PDZ (Postsynaptic density protein-95 (PSD-95), the Drosophila discs large tumor suppresser protein, *Zonula occludens*-1 protein (ZO-1)) et un domaine hautement conservé SU (Syntrophin Unique) (Fig. 26).

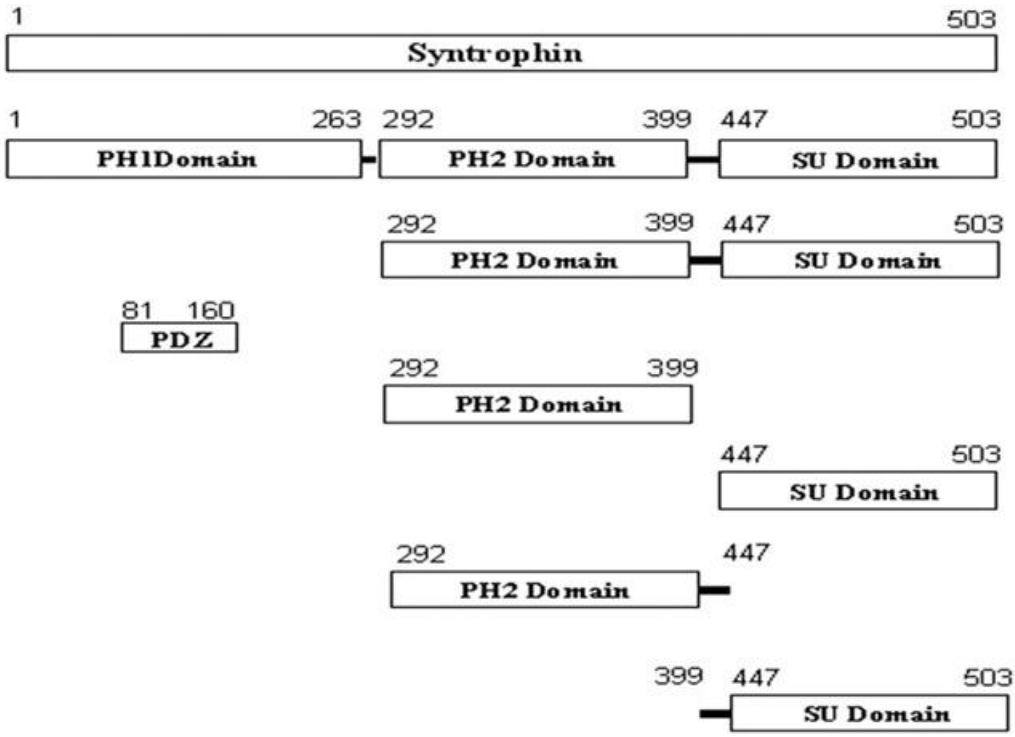


Figure 26: Structure de la syntrophine (Williams et al., 2006).
L'analyse de la séquence révèle la présence de deux domaines PH1 et PH2 (Pleckstrin Homology), un domaine PDZ (Postsynaptic density protein-95 (PSD-95), the *Drosophila* discs large tumor suppresser protein, *Zonula occludens*-1 protein (ZO-1)) et un domaine hautement conservé SU (Syntrophin Unique).

Le domaine PDZ contient une séquence GLG (F/I) présente dans les protéines de signalisation. Les domaines PH permettent l'ancrage de la syntrophine à la membrane car ce domaine est connu pour lier le PIP_2 (pour revue: Shaw, 1996). Les syntrophines lient la calmoduline en présence ou en l'absence de calcium et ces deux événements s'opèrent sur des sites différents. La liaison calcium-dépendante se passe au niveau des 24 aa dans le domaine SU et la liaison calcium-indépendante réside dans les 173 aa dans la partie N-terminale. De plus, la fixation de la calmoduline sur la syntrophine empêcherait son interaction *in vitro* avec la dystrophine (Newbell et al., 1997). D'autre part, les aa 274-315 du domaine PH et 449-505 du domaine SU contiennent des sites de haute affinité pour la F-actine (Iwata et al., 1998). Des possibilités de phosphorylation par la CaM kinase ont été mises en évidence sur la syntrophine (Madhavan et Jarrett, 1999). D'ailleurs, l'association de la dystrophine et de la syntrophine *in vitro* serait régulée par la CaM kinase II.

4. Fonction des syntrophines: Protéines d'échafaudage

Les syntrophines appartiennent à une famille de protéines ayant de multiples domaines. Elles fonctionnent probablement comme protéine adaptatrice en recrutant des protéines de signalisation à la membrane et au DAP (Fig. 27).

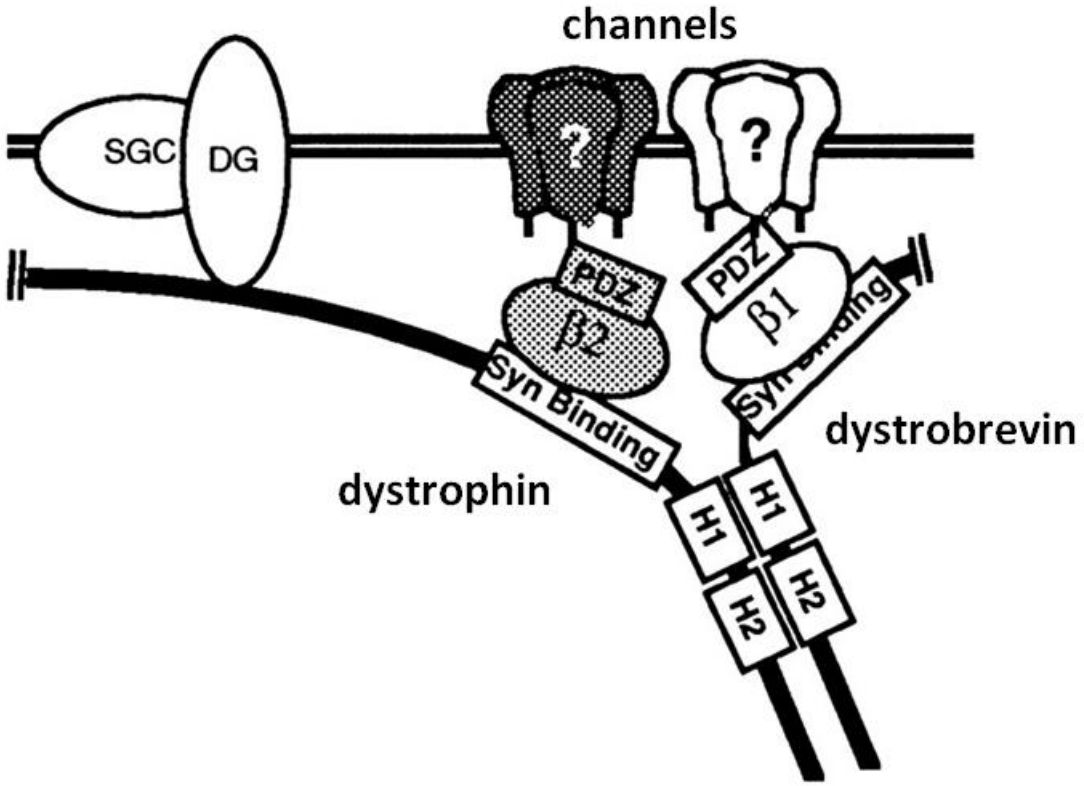


Figure 27: Les syntrophines (exemple avec les isoformes β): molécules adaptatrices qui lient les canaux ioniques au complexe dystrophine (Peters et al., 2007).

Elles peuvent interagir simultanément avec de multiples protéines via ces trois domaines. Comme les isoformes n'ont que 50 % d'homologies les unes aux autres, ceci suggère qu'elles recrutent différentes protéines de signalisation. La syntrophine s'associe avec la dystrophine et autres membres du DAP. L'interaction directe de la syntrophine avec la partie C-terminale de la dystrophine semble impliquer les 56 aa au niveau du domaine SU spécifique de la famille des syntrophines. Par des techniques *in vitro*, les sites de liaison ont été localisés au niveau des résidus 3445-3494 de la dystrophine humaine pour l'α1-syntrophine murine et au niveau des résidus 3495-3544 pour β1-syntrophine (Susuki et al., 1995; Ahn et Kunkel, 1995). Castello et collaborateurs ont isolé à partir du cœur humain, l'ADNc codant pour l'α1-syntrophine et ont montré une interaction *in vivo* entre cette dernière et la dystrophine par la technique de double hybride (Castello et al., 1996). Yang et collaborateurs montrent également une association *in vivo* entre la dystrophine et l'α1-syntrophine dans le muscle squelettique au niveau des aa 3447-3481 de la partie C-terminale de la dystrophine (Yang et

al., 1995). D'ailleurs, toutes les isoformes semblent lier le domaine C-terminal de la dystrophine. D'autre part, la translocation de la dystrophine à la membrane semble devancer celle de la syntrophine puisque, suite à un cycle de régénération induit par la cardiotoxine, la dystrophine réapparait au sarcolemme dans les fibres musculaires du tibia antérieur de rat avant l'α1-syntrophine (Hoshino et al., 2001).

Les domaines PH et SU sont connus pour interagir avec la dystrophine et les autres protéines du DAP (dystrobrévines, utrophine) mais aussi avec Grb2 (Oak et al., 2001). L'α1-syntrophine interagit également avec les sous unités αi, αo, αs et αq des protéines G par ses domaines PH1 et SU (Okumura et al., 2008) dans un système d'expression hétérologue COS-7. La région entre le domaine PH2 et SU de l'α1-syntrophine (aa 399-447) lie la PMCA1 et 4 dans les cellules cardiaques (Williams et al., 2006).

Les syntrophines fixent de nombreuses protéines dans le muscle et le cerveau. Plusieurs de ces interactions utilisent le domaine PDZ des syntrophines et la queue C-terminale des protéines transmembranaires. Le domaine PDZ lie de nombreuses protéines de signalisation telles que les kinases MAST205 (Microtubule-Associated Serine/Threonine 205) et SAST (Syntrophin-Associated Serine/Threonine) (Lumeng et al., 1999), la kinase SAPK3 (Stress-Activated Protein Kinase-3) (Hasegawa et al., 1999), la DGKz (DiacylGlycerol Kinase) (Hogan et al., 2001), le récepteur ICA512 (Islet Cell Autoantigen 512) (Ort et al., 2000), le domaine C-terminal des canaux sodiques voltage-dépendants SkM1 (Skeletal Muscle Na^+ channels) et SkM2 (Gee et al., 1998, Schultz et al., 1998), le canal potassique Kir4.1 (Connors et al., 2004), l'aquaporine AQ4 (Neely et al., 2001) et nNOS (Brenman et al., 1996).

5. Nouvelles fonctions: protéines régulatrices

Un nouveau rôle des syntrophines émerge ces dernières années. En plus d'être une protéine adaptatrice, elle agirait comme élément régulateur.

Munehira et collaborateurs ont montré un rôle de l'α1-syntrophine dans la modulation de la fonction du transporteur ABCA1 (ATP-Binding Cassette transporter A1) (Munehira et al., 2004). En effet, le domaine PDZ de l'α1-syntrophine lierait la partie C-terminale de ce transporteur. La coexpression de ces deux protéines dans les cellules HEK-293 entraine un retard de la dégradation de la protéine ABCA1 et de ce fait augmente la libération de cholestérol. Ces travaux mettent en évidence l'implication de l'α1-syntrophine dans la signalisation intracellulaire. Le domaine PDZ de l'isoforme β1 semble aussi interagir avec le domaine C-terminal de ce transporteur dans les macrophages humains THP-1 et dans le foie de souris. L'inhibition par siRNA de l'isoforme β1 diminue le niveau protéique d'ABCA1 et

diminue donc l'efflux de cholestérol transitant par ce transporteur. La β1-syntrophine régule la distribution cellulaire ainsi que l'activité d'ABCA1 (Okuhira et al., 2005).

Gavillet et collaborateurs ont montré que les canaux sodiques Nav1.5 étaient associés à la dystrophine par l'intermédiaire du domaine PDZ des α et β-syntrophines. L'activité et l'expression de ce canal dans les cardiomyocytes provenant des souris déficientes en dystrophine (*mdx*) sont réduites. Ces résultats suggèrent une implication du complexe dystrophine/syntrophine dans l'expression et la fonction des canaux Nav1.5 dans les cellules cardiaques (Gavillet et al., 2006).

Une étude de Chen et collaborateurs met en évidence pour la première fois une interaction entre les syntrophines et les récepteurs couplés aux protéines G (Chen et al., 2006). Cette interaction requière *in vitro* le domaine PDZ des α, β1 et β2-syntrophines avec l'extrémité C-terminale du récepteur adrénergique α1D. La surexpression stable de l'α-syntrophine dans les cellules HEK-293 augmente significativement l'expression de ces récepteurs suggérant un rôle important de la syntrophine dans la stabilité de ces récepteurs. La mutation du motif PDZ présent sur le récepteur entraine une diminution de l'expression et de la fonction. Par ailleurs, Lyssand et collaborateurs montrent que les souris KO des différentes syntrophines ont une perte complète de la fonction des récepteurs adrénergiques dans les cellules musculaires lisses aortiques (Lyssand et al., 2008). La syntrophine interagirait avec ces récepteurs pour créer un signalosome fonctionnel et essentiel pour la régulation de la pression sanguine et du tonus vasculaire.

Enfin, Luo et collaborateurs ont montré une interaction *in vitro* entre le domaine PDZ des α et β2-syntrophines et ARMS (Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning), substrat des récepteurs EphA4 (Ephrin A4) dans les cellules COS-7 (Luo et al., 2005). L'interaction de l'α-syntrophine avec ARMS a été confirmée *in vivo* au niveau des jonctions neuromusculaires dans le muscle squelettique. La surexpression de l'α-syntrophine induit une agrégation d'ARMS et par conséquent une augmentation du signal EphA4. Par ailleurs, les souris KO α-syntrophine présentent une perturbation de la localisation d'ARMS et EphA4 au niveau des jonctions neuromusculaires et une diminution de l'expression d'ARMS.

6. Les souris KO syntrophines

Les souris KO α1-syntrophine, isoforme prédominante dans le muscle squelettique, ne présentent pas de myopathies, sont mobiles et fertiles. Elles ne présentent pas de défaut dans la contraction musculaire mais nNOS est absente du sarcolemme et est considérablement exprimée dans le cytoplasme (Kameya et al., 1999). Adams et collaborateurs ont montré que

les souris KO α-syntrophine présentaient une membrane post-synaptique anormale avec une réduction considérable de l'expression des récepteurs à l'acétylcholine et des acétylcholine estérases (Adams et al., 2000). De plus, nNOS est absente de la membrane post-synaptique et du sarcolemme malgré la surexpression de la β1 et β2-syntrophine. Ce qui montre que seule l'isoforme α est capable de lier la nNOS *in vivo*. L'absence de la syntrophine n'affecte pas l'expression de la dystrophine mais affecte l'expression de l'α-dystrobrévine2 qui voit son expression fortement réduite au sarcolemme. Le changement le plus drastique chez ces souris est la perte de l'utrophine à la membrane post-synaptique. L'α-syntrophine est un composant essentiel pour former et maintenir le DAP. L'utrophine, comme la dystrophine est connue pour être liée au β-dystroglycane. L'α-syntrophine pourrait stabiliser ces interactions. Le complexe DAP joue donc un rôle dans la stabilisation des synapses. Thomas et collaborateurs ont montré également une diminution de la localisation membranaire de nNOS chez les souris KO α-syntrophine et chez les souris exprimant la syntrophine mutée délétée de son domaine PDZ (Thomas et al., 2003). Ceci a un impact sur la vasoconstriction lors des contractions musculaires. D'autre part, le manque d'α1-syntrophine semblerait, selon Hosaka et collaborateurs, être responsable de l'hypertrophie musculaire (Hosaka et al., 2002). Les souris KO montrent une formation anormale des jonctions neuromusculaires et une réduction de la force musculaire lors de la régénération musculaire induite par la cardiotoxine dans le muscle du tibia antérieur. Toutes ces modifications sont également observées chez les patients DMD. Dans les cellules macrogliales de la rétine de souris KO α-syntrophine, il existe une perte d'expression de l'AQ4 à la membrane mais aucun changement pour le canal Kir4.1. Ceci suggère que l'α1-syntrophine est importante pour l'ancrage à la membrane de l'AQ4 et n'agirait pas sur la localisation du canal potassique dans ces cellules (Puwarawuttipanit et al., 2006).

Adams et collaborateurs ont crée des souris KO β2-syntrophine afin d'étudier la fonction physiologique de cette isoforme (Adams et al., 2004). La souris KO β2-syntrophine ne montre pas de phénotype évident ou de dystrophie musculaire et a une structure des jonctions neuromusculaires normale. Pour voir si les conséquences physiologiques de l'absence de la β2-syntrophine ne sont pas masquées par un effet compensatoire de l'α-syntrophine, ils ont produits des souris ayant perdues ces deux isoformes. Les souris double KO α/β2 ont alors une structure des jonctions neuromusculaires plus aberrante que celle décrite dans la simple KO α-syntrophine. Ces altérations se produisent malgré la présence normale de la dystrophine, la dystrobrévine et les canaux sodiques. Lors d'exercices volontaires, les souris courent à une distance plus courte comparée à la souris sauvage malgré une transmission

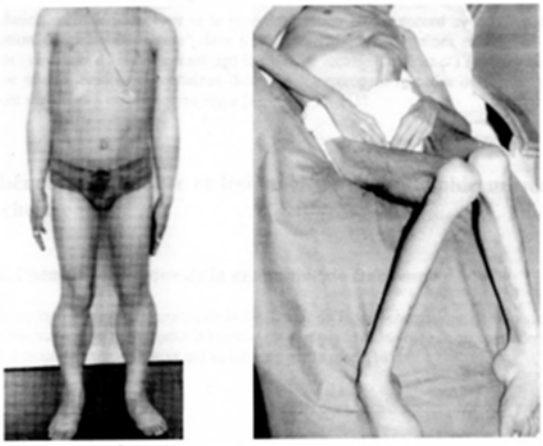
synaptique normale. Ces deux isoformes jouent un rôle distinct et important dans la formation et dans le maintien de la structure des jonctions neuromusculaires et chaque isoforme peut partiellement compenser la perte de l'autre. Contrairement à la souris, l'isoforme β2 est présente au niveau du sarcolemme du muscle squelettique humain post-natal. L'absence de cette isoforme accompagnée de l'absence de l'α-dystrobrévine entrainent chez des patients une faiblesse musculaire congénitale sévère et ils meurent un an après la naissance (Jones et al., 2003).

F. La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

1. DMD: les premières découvertes

Décrite en 1860 par le docteur français Guillaume de Duchenne, à Boulogne-sur-Mer, cette maladie était anciennement nommée 'paraplégie hypertrophique de l'enfance'. Il lui attribua tout d'abord une origine cérébrale puis en 1868, il découvrit que ce trouble était relié aux muscles. Il décrivit alors le remplacement du tissu musculaire par le tissu fibreux ou conjonctif à l'aide de biopsies musculaires pratiquées sur les malades. Finalement, il observa que l'hydrothérapie et des massages accompagnés de stimulations électriques pouvaient améliorer la condition des patients pendant les phases initiales du développement de la maladie.

a



b

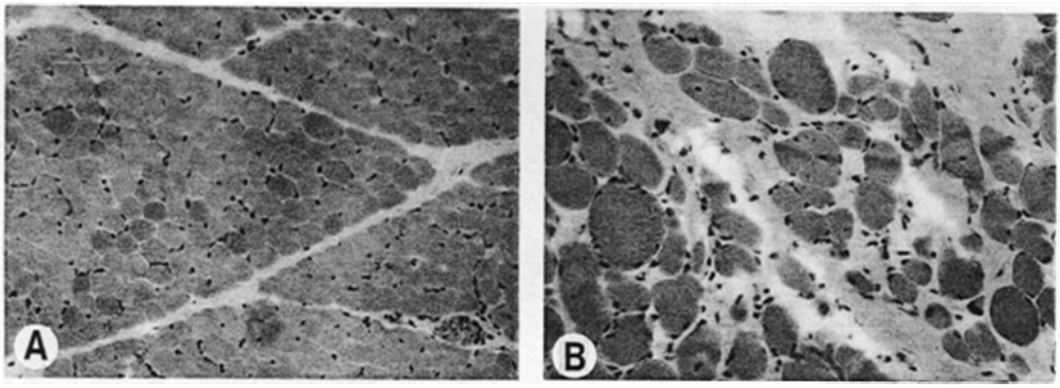


Figure 28: La Dystrophie Musculaire de Duchenne.
a) Enfants atteints de DMD. A gauche, en phase précoce, nous notons une hypertrophie marquée des mollets. A droite, en phase tardive, la plupart des muscles sont atrophiés, des contractures peuvent également survenir.
b) Section musculaire d'une personne atteinte de la myopathie de Duchenne. Toutes ces photos sont prises au grossissement 40X sur des cryosections marquées à l'éosine et à l'hématoxyline. (A) Section transversale d'un muscle humain sain. (B) Section transversale d'un muscle d'un patient atteint de la myopathie de Duchenne (Hoffman et Kunkel, 1989).

2. Evolution de la maladie de Duchenne

La DMD ou myopathie de Duchenne est la plus répandue des myopathies de l'enfant: elle concerne 1 garçon sur 3500 à la naissance. C'est une maladie génétique à transmission

récessive liée au chromosome X: la maladie est transmise par les mères et seuls les garçons sont atteints. Elle est due à des mutations ponctuelles sur le gène DMD codant pour la protéine, dystrophine. Ces mutations entrainent un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP conduisant alors à l'expression d'une protéine tronquée et non fonctionnelle. C'est une maladie neuromusculaire dégénérative qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles squelettique, cardiaque et lisse) (Fig. 28). La DMD se caractérise par des taux sériques de créatine phosphokinase humorale très élevés dès la naissance, ce qui traduit l'altération du fonctionnement des cellules musculaires. L'enfant atteint présente en général peu de signes de la maladie avant l'âge de 3 ans mais il marche parfois tard, tombe souvent et se relève difficilement. Au fil des années, apparaît une faiblesse musculaire progressive des membres et du tronc. Bientôt, la montée des escaliers, puis la marche, vers 10-12 ans, deviennent impossibles et l'utilisation des membres supérieurs se limite progressivement. Une scoliose souvent grave se développe, parfois avant, mais le plus souvent après la perte de la marche. L'atteinte des muscles respiratoires rend l'enfant particulièrement sensible aux infections broncho-pulmonaires. Même si l'atteinte du muscle cardiaque ne se manifeste que tardivement, elle doit être recherchée précocement dès l'âge de 6-7 ans. En général, le recours occasionnel au fauteuil roulant est nécessaire vers l'âge de 8-9 ans, puis son utilisation définitive au début de l'adolescence permet au jeune garçon de conserver une autonomie de déplacement. Au delà du déficit moteur périphérique, ce sont les complications respiratoires (en rapport avec une hypoventilation alvéolaire) et cardiaques (cardiomyopathie) qui dominent le tableau. Les progrès réalisés dans la prise en charge, l'espérance de vie dépasse désormais largement la vingtième année.

3. Origine et évolution de la maladie de Becker

La Dystrophie Musculaire de Becker (DMB) décrite en 1955 par le Professeur Becker est très semblable à la DMD. Cependant, elle progresse beaucoup plus lentement et affecte principalement les jambes et le bassin. Cette maladie touche approximativement un garçon sur 35 000. Les premiers signes cliniques apparaissent généralement entre 7 à 20 ans et la marche reste possible dans plus de la moitié des cas jusqu'à l'âge de 40 ans passés. L'atteinte cardiaque est souvent présente dès le début. Elle est potentiellement grave mais peut bénéficier d'un

traitement médicamenteux voire d'une transplantation cardiaque dans les cas les plus graves. La DMB est également due à une mutation de la dystrophine dans le cadre de lecture conduisant à l'expression d'une dystrophine plus courte ou une expression moindre de cette protéine dans les fibres musculaires.

4. Stratégies thérapeutiques effectives ou expérimentales

À ce jour, les seuls traitements disponibles consistent à améliorer le quotidien et l'espérance de vie des patients, principalement par des séances de kinésithérapie, le suivi des complications cardiaques et respiratoires et l'utilisation d'appareils d'assistance. De nombreuses pistes thérapeutiques sont étudiées expérimentalement dans le cas de la DMD. Les principales approches évaluées à ce jour seront présentées dans ce chapitre.

4.1. Thérapie génique

La thérapie génique est à l'heure actuelle l'approche thérapeutique expérimentale la plus largement étudiée. Elle consiste à introduire dans le cas de la dystrophie musculaire, le gène d'intérêt, celui de la dystrophine, à l'intérieur des fibres musculaires en utilisant différents vecteurs. De manière générale, deux types de thérapie génique ont été tentés *in vivo*: l'injection intramusculaire de plasmides et l'utilisation de vecteurs viraux.

L'injection intramusculaire de plasmides (Acsadi et al., 1991) contenant le gène humain de la dystrophine n'a permis d'observer l'expression de la dystrophine que dans 1 % des fibres musculaires de souris *mdx* (X-linked muscular dystrophy), modèle animal de la DMD. Plus récemment, l'électrotransfert de plasmides, contenant un gène rapporteur, à l'intérieur des muscles de souris *mdx,* a permis d'obtenir une expression atteignant 40 % des fibres (Vilquin et al., 2001). Cette expression a été prolongée à plus de 10 semaines sous une immunosuppression transitoire ou soutenue, comparée à une expression de 3 semaines sans immunosuppression. Dans cette même étude, un plasmide de grande taille contenant le gène de la dystrophine en fusion avec le gène de l'EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") a été transféré par électroporation à l'intérieur de muscles de souris *mdx*. Cette technique nécessite par contre des injections répétées de plasmides pour une expression à très long terme et est limitée par son accès à certains muscles. Dans une autre étude basée sur la transfection d'un plasmide, la dystrophine a été détectée jusqu'à au moins 6 mois après l'unique administration. Après ces résultats encourageants, le premier essai clinique en phase I de thérapie génique de la dystrophie de Duchenne-Becker utilisant cette approche a récemment été concluant. En effet, il a démontré la sécurité des injections intramusculaires

directes de plasmide codant la dystrophine (Romero et al., 2004). La phase I/II est en préparation avec le plasmide MyoDys® qui est injecté par voie intraveineuse dans l'avant-bras. Cependant, le niveau d'expression étant très faible, une amélioration de l'efficacité de transfert est nécessaire. Globalement, ces expériences montrent que le niveau d'expression est trop faible ou trop peu durable, voire les deux.

L'utilisation de vecteurs viraux, non réplicatifs par modification de leur génome, est plus prometteuse. Le principal avantage de ces vecteurs est l'efficacité du transfert de gène, puisque le mode d'infection propre au virus est conservé. L'emploi de l'adénovirus a permis l'introduction du gène de la mini-dystrophine à l'intérieur de 50 % des fibres musculaires 15 jours après l'injection du virus (Ragot et al., 1993). Par contre, l'expression de la mini-dystrophine a été grandement diminuée six mois suivant l'injection. Les adénovirus de première et de deuxième génération ne peuvent se répliquer, mais contiennent des gènes viraux, ce qui les rend très immunogéniques et limite leur capacité d'encapsidation.
Avec le développement de techniques pouvant générer des vecteurs adénoviraux ne contenant aucun gène viral (gutted adenoviral vectors), divers avantages se sont ajoutés à leur utilisation. Ces vecteurs ne peuvent générer de réponses immunes causées par des gènes viraux et ils permettent l'encapsidation d'un transgène de grande taille (variant entre 28 à 30 kb). L'utilisation d'un adénovirus 'gutted' contenant la partie codante complète de la dystrophine et le gène de la β-galactosidase a permis l'expression génique jusqu'à un an dans les muscles de souris immunodéficientes SCID/*mdx*. L'efficacité de cette expression était comparable à celle obtenue à l'aide d'adénovirus modifié de première génération (pour revue: Hartigan-O'Connor et Chamberlain, 2000).
L'approche ayant donné les résultats les plus intéressants pour le muscle squelettique est l'utilisation du vecteur Viral Adéno-Associé (AAV). Ce vecteur non pathogène, peu immunogène ne contient aucun gène viral et est capable de s'intégrer au génome de l'hôte. Par contre, sa capacité d'encapsidation limitée (5 kb) ne permet que l'utilisation du gène de la mini-dystrophine comme traitement de la DMD. Une expression de la mini-dystrophine, bien localisée sous la membrane basale des fibres musculaires, a été détectée six mois après injection de vecteur AAV dans des muscles de souris *mdx* (Wang et al., 2000). L'expression de la mini-dystrophine a permis la restauration du complexe protéique associé à la dystrophine à la membrane et améliore le phénotype dystrophique de la souris. Le transfert de la forme tronquée de la dystrophine (micro-dystrophine) dans les muscles de souris *mdx* s'est

accompagné d'une amélioration partielle de l'aspect histologique du muscle dystrophique (Gregorevic et al., 2006) (Fig. 29).

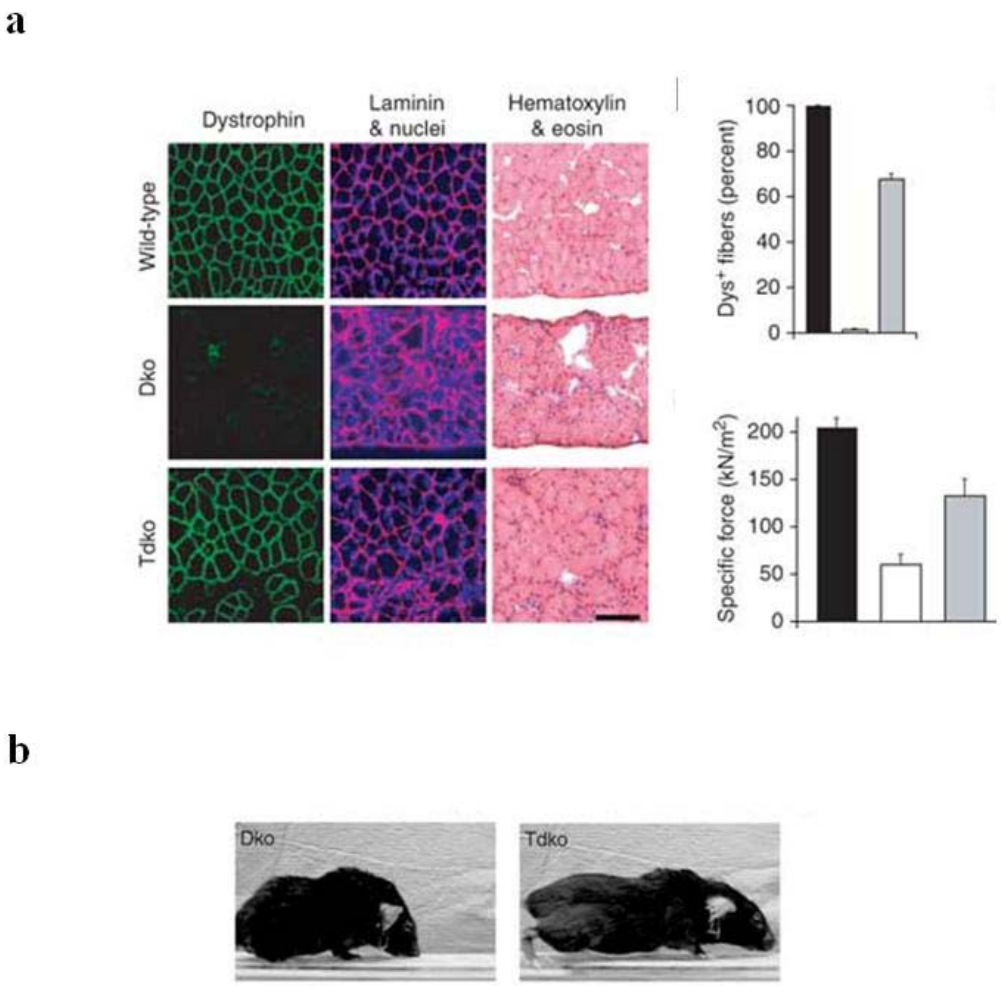


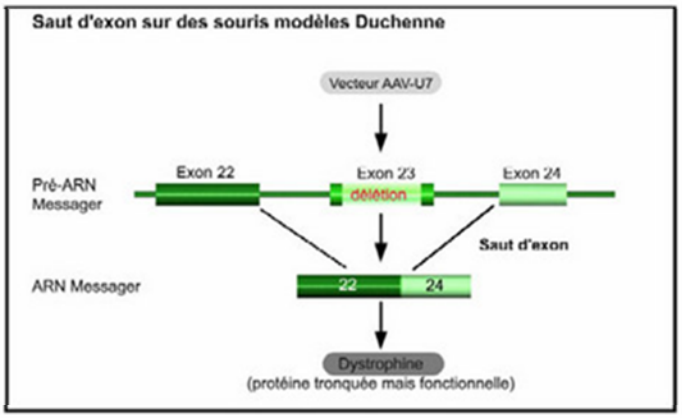
Figure 29: Administration systémique du vecteur rAAV6-micro-dystrophine au niveau du diaphragme de souris *mdx* (Gregorevic et al., 2006).
a) Restauration de l'expression de la dystrophine (marquage vert) dans le muscle du diaphragme de souris traitées (Tdko) contribuant en une meilleure taille et organisation des muscles (rouge: laminine; bleu: noyaux; rose: éosine; violet: hématoxyline) en comparaison avec les muscles non traités des souris *mdx* (Dko) et souris sauvages (WT).
b) Les souris non traitées (à gauche) montrent typiquement le phénotype de la DMD alors que les souris traitées (à droite) ont une musculature plus développée.

Le groupe de Li a récemment montré que la mini-dystrophine pouvait être transfectée dans les muscles *mdx* grâce à des lentivirus dérivant du virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) pouvant contenir de grands plasmides. Ils s'insèrent de façon stable dans le génome des cellules hôtes. Cette technique a permis d'exprimer la mini-dystrophine dans les souris *mdx* pendant 6 mois et de prévenir la dégénérescence des fibres recombinantes (Li et al., 2005).

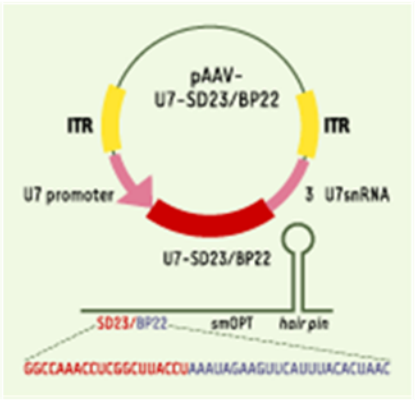
Enfin, l'approche de type saut d'exon a émergé ces dernières années (Fig. 30). Elle vise à corriger directement l'anomalie moléculaire au niveau pré-ARNm endogène. L'utilisation de séquences «antisens» permet de bloquer de manière précise certains sites essentiels pour le processus d'épissage, aboutissant à une suppression ciblée d'un ou plusieurs exons. L'objectif est de permettre la traduction d'un ARNm en une protéine qui comportera une délétion «induite» mais sera néanmoins fonctionnelle. Dans une étude récente, une injection directe intramusculaire d'antisens (2OMeAO) résulte en une augmentation significative de fibres dystrophine-positives chez la souris *mdx* (Lu et al., 2003). L'expression de la dystrophine persiste deux mois après la première injection et la force musculaire chez ces souris est améliorée. Dans le modèle murin *mdx*, une correction des principales caractéristiques pathologiques a été obtenue avec cette stratégie. Des essais cliniques sur des patients DMD utilisant une molécule antisens ('morpholinos') sont prêts à débuter. Des résultats d'une équipe britannique en 2006 d'injections par intraveineuses sur souris *mdx* sont prometteurs, cependant le morpholino n'atteint pas le cœur.

Une autre approche innovante implique l'utrophine. C'est une protéine homologue à la dystrophine qui est normalement présente au niveau des jonctions neuromusculaires et myotendineuses. Elle est plus petite (13 kb) que la dystrophine mais est très similaire plus particulièrement au niveau des parties N et C-terminales. Elle a les mêmes propriétés fonctionnelles et peut lier le cytosquelette d'actine, le DAPs tels que la syntrophine et la dystrobrévine (Peters et al., 1998). Les souris utrophine$^{-/-}$/*mdx* présentent un phénotype plus sévère que les *mdx,* probablement en raison de l'absence de compensation par l'utrophine. La fonction des deux protéines peut être considérée comme similaire et permettrait d'assurer la continuité mécanique entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Comme attendu, la surexpression de l'utrophine chez les souris *mdx* améliore le phénotype en empêchant le développement de la maladie (Tinsley et al., 1998). Malheureusement, il est maintenant établit que, dans le cas de l'utrophine, ce rôle de compensation est uniquement préventif et non réparateur dès lors que les cycles de dégénération ont commencé.

a



b



c

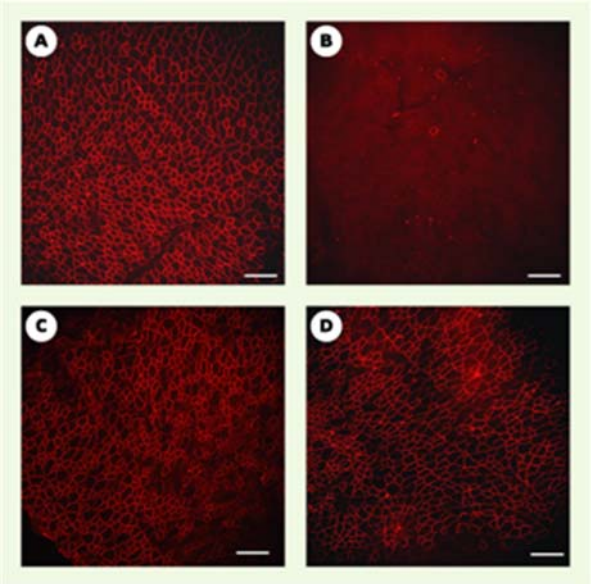


Figure 30: Le saut d'exon.
a) Principe du saut d'exon chez la souris *mdx*.
b) Construction du vecteur pAAV-U7-SD23/BP22. Le U7snARN transformé en U7-SD23/BP22 spécifique de l'exon 23 du gène de la dystrophine murine est cloné entre les deux ITR d'un vecteur AAV2, encapsidé ensuite dans un vecteur AAV de type 1. Ce U7snARN est inséré sous le contrôle de son propre promoteur et de ses régions 3' régulatrices, permettant l'expression d'un petit ARN modifié U7-SD23/BP22.
c) Immunomarquage de la dystrophine. Immunomarquage sur sections de muscles (tibialis anterior) de souris normale C57Bl6 (A), de souris *mdx* non traitée (B), de souris *mdx* 1 mois (C) et 6 mois (D) après l'injection de l'AAV-U7-SD23/BP22 (Goyenvalle et al., 2004).

4.2. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste en la transplantation de cellules souches dont la capacité importante de régénération tissulaire pourrait permettre de réparer la fibre musculaire lésée. Deux types d'utilisation sont actuellement envisagés. Tout d'abord, les cellules souches peuvent être prélevées chez un individu donneur sain et transplantées chez un individu receveur malade afin de corriger son déficit génétique. La seconde approche consiste à prélever des cellules souches/progénitrices directement chez l'individu porteur du déficit génétique, à corriger par thérapie génique *ex vivo* le déficit génétique pendant une courte période de culture cellulaire, puis à réimplanter les cellules génétiquement corrigées chez le même individu. Différents types de cellules souches ont été identifiées comme potentiellement utilisables pour le traitement de dystrophies musculaires.

Les premières tentatives ont porté sur la transplantation de myoblastes dans le cadre de la DMD. Mais la diffusion et la survie des myoblastes transplantés se sont avérées peu importantes et les premières tentatives d'application clinique non concluantes (Gussoni et al., 1992; Karpati et al., 1993; Mendell et al., 1995; pour revue: Mouly et al., 2005). Par ailleurs, dans différents tissus, des cellules souches possédant une capacité de «transdifférenciation» en myotubes ont été identifiées. La transdifférenciation caractérise la possibilité de former, à partir de cellules d'un tissu donné, des cellules d'un autre type tissulaire. En effet, les cellules de la moelle osseuse semblent participer à la formation de fibres musculaires normales, en migrant de la circulation sanguine aux sites de régénération. Dans un modèle *mdx* immunodéficient (*mdx*-SCID), la transplantation de cellules stromales issues de moelle osseuse humaine conduit à une différenciation en fibres musculaires et une régénération du tissu musculaire induite par des dommages répétés (Dezawa et al., 2005).

La technique qui est actuellement la plus prometteuse est basée sur l'utilisation de mésoangioblastes. Ces cellules souches fœtales localisées au niveau des vaisseaux sanguins possèdent une capacité de transdifférenciation en cellules satellites différenciées sous l'influence de facteurs myogéniques (Grassi et al., 2004). L'utilité de ces cellules semble aussi se confirmer chez des animaux de plus grande taille, puisqu'une amélioration remarquable de la fonction musculaire a été obtenue dans le modèle canin de DMD (le chien GRMD) (Sampaolesi et al., 2006) (Fig. 31).

Certains progéniteurs hématopoïétiques circulants exprimant le marqueur de surface AC133 peuvent participer au processus de régénération musculaire en fusionnant avec des fibres musculaires dystrophiques. En effet, la greffe de cellules AC133+ humaines par injection

intra-artérielle dans des souris *mdx*-SCID conduit à une amélioration de la force musculaire (Torrente et al., 2004).

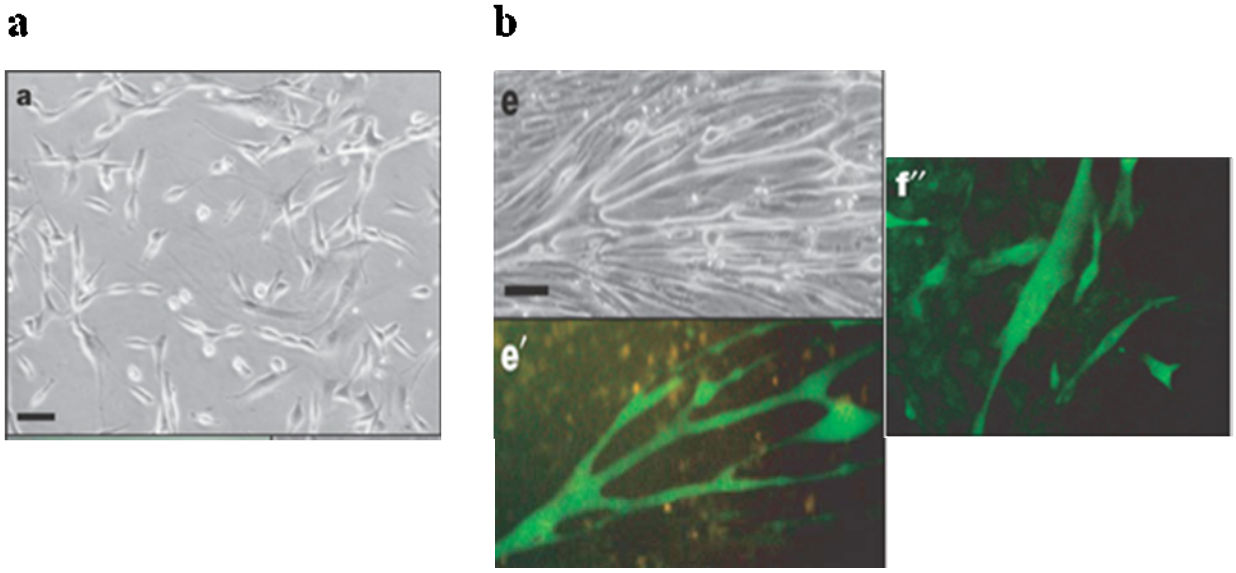


Figure 31: Thérapie cellulaire: Transdifférenciation des mésoangioblastes en cellules musculaires (Sampaolesi et al., 2006).
(a) Morphologie des mésoangioblastes isolés à partir de biopsie de muscles du chien Golden Retriever.
b) Transduction des mésoangioblastes provenant de chiens dystrophiques avec un vecteur lentiviral exprimant la micro-dystrophine humaine présentant un gène rapporteur codant pour l'EGFP sous le contrôle d'un promoteur muscle-spécifique. L'expression de la GFP est détectable suite à la fusion des mésoangioblastes transfectés avec les myoblastes C2C12 donnant naissance à des myotubes plurinuclées.

4.3. Thérapies pharmacologiques

En parallèle à ces stratégies de thérapies géniques et cellulaires, plusieurs équipes ont développé d'autres approches pharmaceutiques. Dans le cas des mutations entraînant la création d'un codon STOP prématuré, une première expérience avec un antibiotique, la gentamycine, a prouvé que cette petite molécule peut supprimer ce signal et conduire à la synthèse de protéines entièrement fonctionnelles (Barton-Davis et al., 1999). Le niveau d'expression de la dystrophine et du DAP reste faible mais suffisant pour protéger les fibres contre les dommages membranaires. Malheureusement, *in vivo*, ce composé entraîne des effets secondaires toxiques. Un composé a été identifié, le PTC124, qui supprime

efficacement la mutation non-sens dans le gène de la dystrophine du modèle murin *mdx* (Welch et al., 2007). Il est actuellement en essai clinique en phase IIb.

Par ailleurs, les muscles affectés dans de nombreuses dystrophies musculaires présentent une élévation néfaste de la concentration intracellulaire de calcium, due à l'activation des protéases de type calpaïnes ubiquitaires 1 et 2. En accord avec cette hypothèse, les souris issues du croisement entre des *mdx* et des souris transgéniques surexprimant la calpastatine, un inhibiteur des calpaïnes 1 et 2, montrent une réduction de la nécrose (Spencer et Mellgren, 2002). Les essais cliniques utilisant des inhibiteurs des canaux calciques (verapamil, nifedipine et diltiazem) n'ont pas été probants. Ceci peut s'expliquer par une faible perturbation des canaux calciques de type L, bloqués par ces composés, dans les muscles DMD et *mdx*. Cependant, le traitement pendant 2 semaines de souris *mdx* avec la streptomycine, inhibiteur des canaux mécanosensibles impliqués dans la surcharge calcique, empêche les dommages musculaires avec une apparition de noyaux centraux réduite (Yeung et al., 2005). Des espoirs, basés sur l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité des calpaïnes, persistent donc. D'autres composants pharmacologiques tels que l'allopurinol, la vitamine E et le sélénium n'ont pas été efficaces contre la progression de la DMD.

L'effet anti-inflammatoire d'un glucocorticoïde, la prednisone pourrait être responsable d'améliorations cliniques observées chez des patients atteints de DMD (Angelini, 2007). Elle aurait un effet bénéfique sur la force et la fonction musculaires ainsi que sur la fonction pulmonaire des patients atteints de la DMD. Cela s'expliquerait par l'implication du système immunitaire et ce traitement aiderait à l'élimination des lymphocytes T (dans le modèle *mdx*). Un dérivé de la prednisone, le déflazacort parait être une alternative efficace dans l'amélioration de la fonction respiratoire avec moins d'effets secondaires chez des patients DMD (Biggar et al., 2001).

Enfin, la limitation de la perte de masse musculaire observée dans de nombreuses dystrophies musculaires est une des voies de recherche évaluées. La description de bovins présentant un développement musculaire excessif a permis la découverte de mutations dans le gène codant pour la myostatine (Grobet et al., 1997). L'invalidation de ce gène dans des modèles murins s'accompagne d'une augmentation considérable du poids, de la taille et de la masse musculaire (McPherron et Lee, 1997; Bogdanovich et al., 2002) , ce qui suggère que le produit de ce gène est impliqué dans le contrôle négatif de la croissance du muscle. D'ailleurs, ces changements sont accompagnés d'une réduction de la dégénération musculaire et du niveau de créatine kinase. Cette fonction a été récemment confirmée chez l'homme: une mutation identifiée au niveau d'un site d'épissage de la myostatine chez un enfant

s'accompagne d'une hypertrophie musculaire (Schuelke et al., 2004). Des approches basées sur l'inhibition de l'action de la myostatine ont donc été initiées. La myostatine se compose d'un propeptide inhibiteur en N-terminal et d'un domaine C-terminal actif. L'injection de propeptide recombinant dans le péritoine de souris *mdx* provoque une augmentation de la masse musculaire, une amélioration du temps d'endurance sur le tapis et de la force absolue (Bogdanovich et al., 2005). De même, des injections d'anticorps anti-myostatine en intrapéritonéal améliorent le phénotype dystrophique de la souris *mdx* (Bogdanovich et al., 2002).

5. Modèles animaux de la DMD

Il existe trois modèles animaux spontanés caractérisés par une absence d'expression de dystrophine dans les fibres musculaires: la souris *mdx* et les dystrophies musculaires canine et féline.

5.1. La souris *mdx*

La souris *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy), premier et principal modèle animal de la DMD, a été découverte accidentellement par Bulfield en 1984 dans la lignée murine C57BL/10ScSn (Bulfield et al., 1984) (Fig. 32a). Ces souris présentaient des taux sériques de créatine kinase très élevés et des lésions de type dystrophique. Par contre, ces souris ont un aspect similaire aux souris normales. La mutation transmise sur le mode récessif liée au chromosome X est une mutation ponctuelle non sens (substitution d'un nucléotide C pour un T) à la position 3185 (exon 23) du gène codant pour la dystrophine (Ryder-Cook et al., 1988; Sicinski et al., 1989). Il en résulte l'apparition d'un codon STOP TAA à la place d'un codon glutamine (CAA) (Sicinski et al., 1989) et l'arrêt prématuré de la traduction. La dystrophine mutante et tronquée ne possède que le domaine N-terminal et sept des séquences répétées du domaine central. De ce fait, elle est rapidement dégradée dans la fibre musculaire. De plus, comme chez les patients DMD, il en résulte une absence marquée du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (Ohlendieck et Campbell, 1991).

De façon intrigante, la souris *mdx* ne présente que peu de phénotypes associés à la maladie par un mécanisme de compensation inconnu qui limite la nécrose des fibres musculaires. Un effet compensatoire par la surexpression de l'utrophine est possible (Matsumura et al., 1992). En l'absence de dystrophine, les α-dystrobrévines1 et 2 ainsi que l'α1, les β1 et β2-syntrophines disparaissent du sarcolemme mais sont présentes au niveau des jonctions neuromusculaires où elles s'associent probablement avec l'utrophine.

a

b

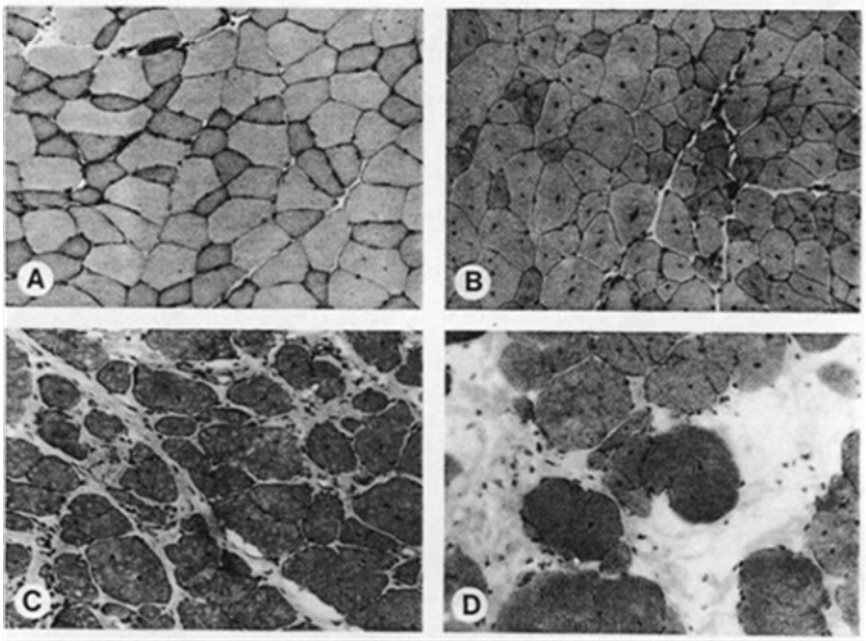


Figure 32: Le modèle animal principal de la DMD: la souris *mdx*.
a) Photographie de la souris *mdx*.
b) Histopathophysiologie de souris *mdx* déficientes en dystrophine. Toutes les photos sont prises au grossissement 40X sur des cryosections marquées à l'éosine et à l'hématoxyline. (A) Section transversale de muscles de souris normales. Les noyaux des fibres musculaires sont tous en position périphérique. La taille des fibres semble uniforme. Il n'apparaît pas de tissu de jonction entre les fibres. (B) Section transversale de souris *mdx* montrant une légère histopathologie caractérisée par un début de mort cellulaire (nécrose). Les noyaux sont situés au centre des cellules. (C) Une section transversale différente d'une souris *mdx*. La prolifération des tissus de jonctions (fibrose) est ici accrue. (D) Le muscle fessier d'une souris *mdx* plus âgée. Perte complète de la concomitance des fibres (Hoffman et Kunkel, 1989).

La perte de l'α1-syntrophine au niveau du sarcolemme affecte aussi la localisation de nNOS et AQ4 qui ne sont pas correctement dirigés vers la membrane (Frigeri et al., 2001; Thomas et

al., 1998). Les mêmes perturbations ont été reportées chez les patients DMD (Compton et al., 2005; Metzinger et al., 1997). Certaines souris *mdx* présentent des fibres dites révertantes exprimant la dystrophine. Ceci est dû au phénomène de saut d'exons qui peut se produire tout au long du développement.

La souris *mdx* présente des lésions primaires proches de celles de la DMD (nécrose et régénération) mais souffre peu de la sclérose qui se développe chez l'homme et la faiblesse musculaire est minime. On observe moins de fibres musculaires en nécrose que chez l'homme et elles sont continuellement remplacées par des fibres régénératrices au lieu du tissu conjonctif. Elles ne présentent pas de symptômes de la maladie au niveau locomoteur et forment donc un modèle imparfait de la DMD. Sa petite taille, sa capacité de reproduction et sa facilité d'élevage en fait toutefois un modèle utile.

Chez la souris *mdx* (femelles homozygotes et mâles dystrophiques), la dystrophie musculaire évolue en plusieurs phases distinctes. Avant l'âge de trois semaines, les fibres sont légèrement hypertrophiques et il existe des fibres hyalines. C'est le stade pré-nécrotique. Celui-ci est suivi d'une vague nécrotique musculaire massive qui affecte de nombreux groupes de fibres suivie de plusieurs cycles de régénération intense, efficace et compensateur. L'apparition des cycles dégénération/régénération se fait à l'âge de 3 semaines jusqu'à deux/trois mois. Les fibres régénérées sont repérables par la présence de leurs noyaux qui restent longtemps centraux (Fig. 32b). Jusqu'à l'âge d'un an, les noyaux centraux persistent et les fibres hypertrophiées sont toujours présentes mais la nécrose se fait rare et l'accumulation de tissu fibreux restreinte. Au contraire, la lésion du diaphragme chez la souris *mdx* est progressive et s'apparente pleinement à celle de la DMD. La nécrose apparaît à partir de l'âge de 25 jours et continue au cours de la croissance. Les fibres sont progressivement remplacées par du tissu conjonctif abondant. Enfin, le muscle lisse digestif des souris *mdx* adultes est atrophié et les lésions du myocarde sont inconstantes: absentes dans certaines colonies ou représentées par des foyers de nécrose dans le ventricule gauche. La fonction cardiaque, normale initialement, évolue progressivement vers une cardiomyopathie dilatée et une hypertrophie des cardiomyocytes. Chez les souris très âgées (17 mois), on observe également une fibrose étendue mais partielle des parois ventriculaires.

5.2. Le chien GRMD

Le chien Golden Retriever atteint de dystrophinopathie est le modèle animal le plus proche de la DMD. L'affection canine, décrite pour la première fois par Valentine en 1986 et Kornegay en 1988 est appelée GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) (Valentine et al., 1986;

Kornegay et al., 1988). La mutation transmise sur un mode récessif lié au chromosome X est une mutation ponctuelle non-sens causée par un changement d'une base (G vers A) à l'intérieur d'un site d'épissage consensus situé à l'extrémité 3' de l'intron 6 du gène DMD, ce qui résulte en une protéine manquant plusieurs exons. Les chiens GRMD expriment en très faible quantité une dystrophine tronquée de 390 kDa (Schatzberg et al., 1998).

Le chien GRMD est cliniquement le modèle animal le plus proche de l'affection humaine. Les chiens dystrophiques ont une fatigabilité excessive, une stature raide et avancent à petits pas d'une démarche chambranlante. Ils ont des difficultés à ouvrir la mâchoire, à aboyer et à se nourrir. A l'âge de 3 mois, ils témoignent d'une insuffisance respiratoire et d'une dysphagie. Ils salivent aussi excessivement à cause de l'épaississement de la base de leur langue. Longtemps normale, la fonction cardiaque peut rapidement et brutalement décliner chez certains chiens âgés. La mort est due à une cardiomyopathie et une détresse respiratoire vers l'âge de deux ans. La plupart des muscles sont atrophiés ou au contraire hypertrophiés. Au niveau histologique, les fibres nécrosées sont graduellement remplacées par du tissu fibreux. Les avantages de ce modèle sont l'existence de colonie de chiens bien établie, une très grande similitude clinique avec la DMD. Les inconvénients sont le prix des animaux, le faible nombre de portée par an et la difficulté d'entretien d'animaux affaiblis par la maladie.

5.3. La dystrophie musculaire féline

La dystrophie musculaire féline hypertrophique HFMD (Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy) met l'accent sur la principale lésion musculaire macroscopique et histologique dans cette espèce: l'hypertrophie. La première description date de 1989 par Carpenter (Carpenter et al., 1989). La myopathie féline est transmise sur le mode récessif lié au chromosome X et l'anomalie génétique n'a pas été identifiée à ce jour mais il ne s'agit pas d'une délétion. Elle présente une ressemblance certaine avec la phase précoce de la DMD (hypertrophie des fibres, absence de fibrose). Les chats malades présentent un élargissement et une raideur musculaires, une langue proéminente, une mobilité affectée et des signes de cardiomyopathie. Sur des coupes de muscles, on observe des amas de fibres musculaires nécrotiques et une faible quantité de dystrophine (Gaschen et al., 1992). Le DAP est présent également en quantité réduite.

En conclusion, les caractéristiques lésionnelles de la dystrophinopathie féline renforcent l'hypothèse selon laquelle la myopathie de Duchenne évolue en deux temps: un temps de nécrose et d'hypertrophie des fibres, résultat de l'absence de la dystrophine, associé à une instabilité membranaire généralisée dans le muscle; et dans un deuxième temps de fibrose

musculaire, présent chez le chien et l'homme mais absent dans les modèles murin et félin qui indique que le remplacement du tissu musculaire par du tissu fibro-adipeux n'est pas un effet constant de l'absence de la dystrophine (Fig. 33).

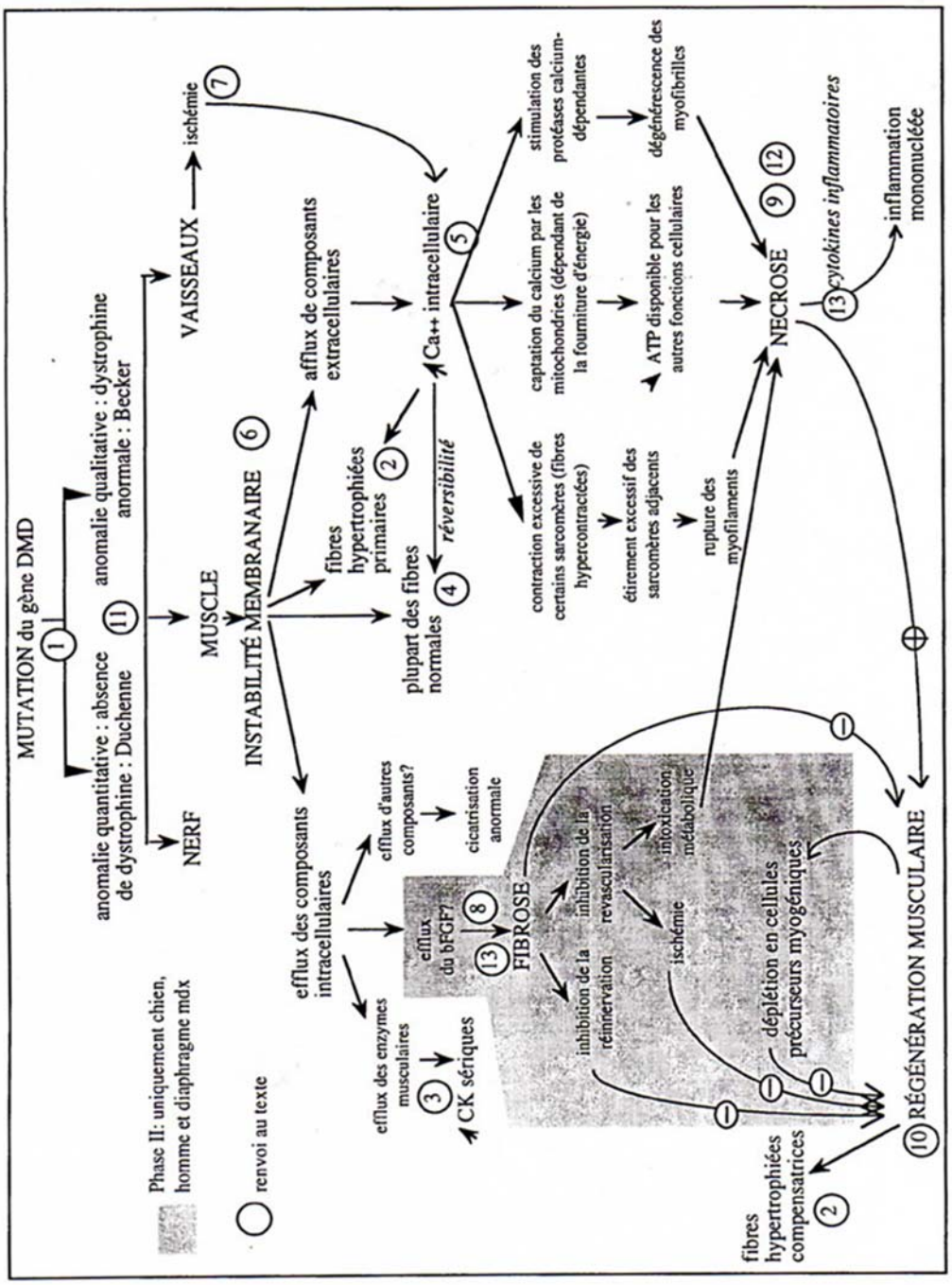


Figure 33: La pathogénie des dystrophinopathies (wwwbibli.vet-nates.fr/theses/2001/nguyen01_8/part1.pdf).

6. Le DAP et la DMD

La perte complète de la dystrophine perturbe la composition structurale du complexe DAP. Tous les membres de ce complexe voient leur expression réduite dans les fibres provenant de patients DMD et de souris *mdx* (Ervasti et al., 1990; Ohlendieck et Campbell, 1991; Metzinger et al., 1997) (Fig. 34).

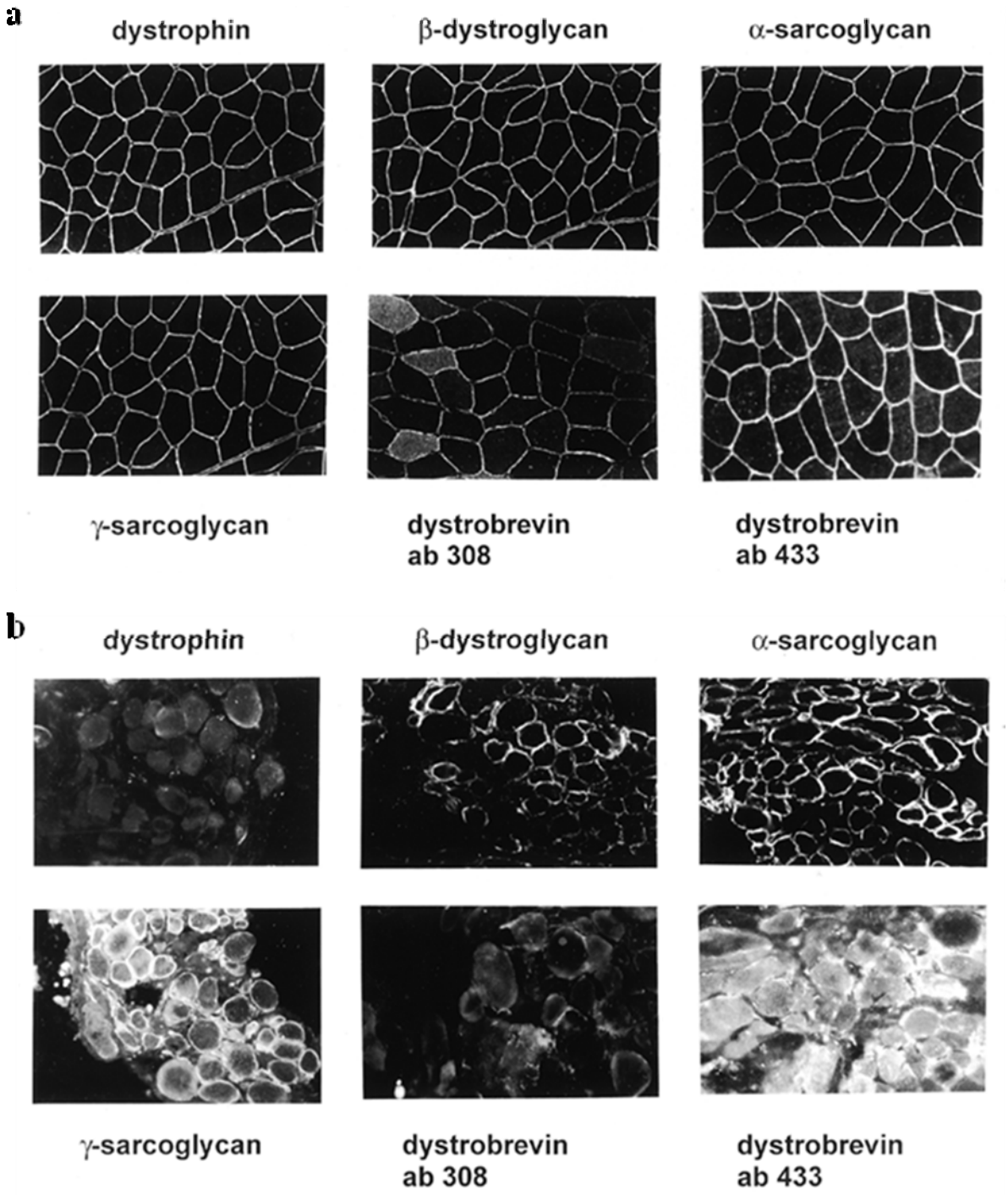


Figure 3-1: Immunomarquages des partenaires de la dystrophine sur muscle humain sain (a) et muscle DMD (b) (Metzinger et al., 1997). L'intensité de marquage au sarcolemme de tous les partenaires (dystroglycane, sarcoglycane et dystrobrévine) est largement réduite dans le muscle DMD (grossissement 400X).

La seule exception est la cavéoline-3 qui est surexprimée dans les muscles déficients en dystrophine (Repetto et al., 1999; Gervasio et al., 2008). La marquante réduction de l'expression du DAP chez les *mdx* et patients DMD suggère que le DAP est important pour maintenir une structure et une fonction normale du sarcolemme (Butler et al., 1992;

Ohlendieck et al., 1993). Dans le muscle squelettique normal, la dystrophine et son complexe DAP sont connus pour ancrer le cytosquelette intracellulaire des fibres musculaires à la matrice extracellulaire (Rybakova et al., 2000; pour revue: Ervasti, 2007). La dystrophine et son complexe associé ont donc un rôle dans la protection de la fibre musculaire contre les dommages engendrés par des cycles répétés de la contraction et de la relaxation musculaires. En l'absence de ce support mécanique, le sarcolemme est sujet à une instabilité membranaire, à des tensions mécaniques excessives pendant l'activité contractile provoquant un déchirement, des micro-ruptures de la membrane. Cette idée est renforcée par des observations où la surexpression de mini-gène codant pour la dystrophine dans les muscles dystrophiques de souris *mdx* augmente la stabilité du sarcolemme et protège les fibres contre les dommages mécaniques (Phelps et al., 1995; Deconinck et al., 1996; Decrouy et al., 1998). De plus, une augmentation de l'entrée de colorants vitaux suggère aussi une instabilité membranaire en l'absence de la dystrophine (McArdle et al., 1994). Les déchirements entrainent alors une succession de cycles de dégénérescence/régénération des myofibres qui épuisent rapidement le réservoir des cellules satellites, résultant en une dégénérescence musculaire progressive caractéristique de la maladie.

7. La syntrophine et la DMD

Le rôle des syntrophines dans la DMD n'a pas beaucoup été étudié, malgré le fait que l'expression des syntrophines au sarcolemme soit dramatiquement réduite chez les patients DMD et souris *mdx* et malgré son rôle important d'ancrage de protéines de signalisation à la membrane. Le défaut des autres protéines associées à la dystrophine est la cause d'autres myopathies dans lesquelles l'expression de la dystrophine n'est pas atteinte. La syntrophine, elle, n'est pas reliée à des myopathies ou autres maladies. La β1-syntrophine est enrichie dans les fibres rapides de type IIb (Peters et al., 1997) qui sont préférentiellement affectées chez les patients DMD (Webster et al., 1988), ceci suggère que le taux de β1-syntrophine pourrait être important pour la fonction et l'intégrité de la membrane. Comme la β1-syntrophine, nNOS est exprimée de manière prépondérante dans les fibres rapides et est liée à la dystrophine au niveau du sarcolemme par l'intermédiaire du domaine PDZ de l'α1-syntrophine (Brenman et al., 1996). De ce fait, Peters et collaborateurs proposent un modèle où la β1-syntrophine fonctionnerait de pair avec l'α1-syntrophine pour permettre un meilleur ancrage de la nNOS au sarcolemme (Peters et al., 1997). La perte du complexe syntrophines/nNOS à la membrane dans les cellules dystrophiques perturberait la voie de vasoconstriction lors de la contraction musculaire (Peters et al., 1997). Adams et collaborateurs ont démontré que malgré la

restauration de l'α1-syntrophine à la membrane chez les souris *mdx* exprimant l'α-dystrobrévine2a palmitoylé, nNOS n'est pas localisée à la membrane, ce qui suggère que nNOS demande la présence à la fois de la syntrophine mais aussi de la dystrophine (Adams et al., 2008).

G. Calcium et DMD

1. Dérégulation de l'homéostasie calcique dans la DMD

1.1. Calcium intracellulaire dans les cellules déficientes en dystrophine

Il est largement admis que le sarcolemme des fibres dystrophiques est plus sensible aux déchirements que celui des fibres saines. Mais le mécanisme par lequel l'absence de la dystrophine exacerbe ces dommages membranaires n'est pas clair. La perte de la force musculaire et la nécrose qui caractérisent la pathologie musculaire de Duchenne pourrait être la résultante d'une augmentation de la perméabilité non sélective du calcium à travers les ruptures du sarcolemme. En effet, au niveau des déchirements, le calcium extracellulaire entrerait massivement de manière passive selon le gradient électrochimique. Mais de manière intrigante, la concentration de sodium intracellulaire paraît normale dans les fibres dystrophiques (Turner et al., 1991). Une autre hypothèse, 'hypothèse calcique', a été envisagée suggérant que l'absence de la dystrophine entrainerait une altération de la fonction et de la distribution des canaux calciques sarcolemmiens (pour revue: Whitehead et al., 2006).

Des études préliminaires ont montré une teneur en calcium totale plus importante dans les myofibres dystrophiques suggérant que la dérégulation calcique peut contribuer à la pathologie dystrophique (Oberc et Engel, 1977; Bodensteiner et Engel, 1978). Pourtant, l'implication du calcium dans la DMD est un fait très controversé.

Un premier groupe en 1988 (Turner et al., 1988) a démontré grâce à la sonde calcique fura-2 une augmentation du niveau de calcium intracellulaire libre au repos dans des myofibres isolées *mdx* et dans des cultures de myotubes *mdx* et myotubes DMD (Fong et al., 1990). Depuis ce temps, de nombreuses autres études ont examinés le niveau de calcium intracellulaire au repos qui parait plus élevé dans les cellules dystrophiques (Turner et al., 1991; Bakker et al., 1993; Imbert et al., 1995; Hopf et al., 1996a; Tutdibi et al., 1999; Fraysse et al., 2004).

Cependant d'autres groupes n'observent aucunes variations calciques globales (Gailly et al., 1993; Pressmar et al., 1994; Collet et al., 1999; Carlson et al., 2003). Les raisons possibles pour que les investigateurs ne perçoivent pas de différences de calcium seraient la variabilité méthodologique (calibration, compartimentalisation, pénétration de l'indicateur fluorescent et cultures cellulaires), la variabilité de l'activité contractile, un système de régulation différent entre les espèces humaines et murines et la maturation du muscle. En effet, les myotubes DMD humains développent une différence de calcium intracellulaire par rapport aux contrôles que lorsque ceux-ci sont en présence de tissu nerveux induisant la contraction musculaire (Imbert et al., 1995) contrairement aux myotubes DMD non innervés (Rivet-Bastide et al., 1993). La coculture nerf-muscle n'est pas nécessaire dans les myotubes provenant de souris *mdx* car ceux-ci présentent une activité contractile spontanée. Une inhibition chronique de la contraction dans les myotubes *mdx* avec de la tétrodotoxine réduit le calcium intracellulaire à un niveau similaire au calcium mesuré dans les cellules normales (Hopf et al., 1996a).

De plus, ce groupe suggère que la détection des différences de calcium intracellulaire dans les muscles normaux et dystrophiques est fonction de la capacité de la recapture calcique ou du système tampon du muscle.

D'autre part, le calcium intracellulaire semble être augmenté dans les cellules dystrophiques suite à différentes stimulations. De manière plus précise, le calcium libre sous le sarcolemme paraît plus élevé dans les muscles dystrophiques. Robert et collaborateurs montrent par l'utilisation de l'aequorine, protéine luminescente capable d'émettre de la lumière en présence de calcium, transfectée dans les myotubes *mdx*, une augmentation soutenue du niveau de calcium après dépolarisation par une solution hyperpotassique ou après application de la caféine (Robert et al., 2001). D'autre part, ce groupe suggère que l'accumulation anormale du calcium mitochondrial précéderait l'altération de la réponse calcique cytosolique et sarcolemmienne. Vandebrouck et collaborateurs ont montré une corrélation entre l'augmentation des influx calciques après la déplétion en calcium des stocks intracellulaires et la régulation du niveau de calcium mitochondrial (Vandebrouck et al., 2006). Cette dérégulation calcique résulterait d'une augmentation d'influx calciques par des canaux perméables au calcium. Ces derniers activeraient des protéases calcium-dépendantes entrainant alors la nécrose musculaire.

Basset et collaborateurs démontrent une augmentation du calcium, induite par le carbachol, sous le sarcolemme qui est au moins 10 fois plus importante que le calcium global mesuré dans le cytoplasme (Basset et al., 2004). L'équipe de Turner montre également un défaut de régulation du calcium sous membranaire dans les fibres *mdx* par l'utilisation de la sonde

calcique fura-2 (Turner et al., 1991). En accord avec ces travaux, Mallouk et collaborateurs montrent par la technique de patch-clamp, en configuration cellule-attachée et inside-out, un seuil d'activation plus bas des canaux potassiques calcium-dépendants à haute conductance dans les fibres *mdx*, suggérant une augmentation 3 fois plus importante du calcium sous le sarcolemme (Mallouk et al., 2000). D'ailleurs, cette équipe a montré l'existence de sites discontinus d'influx passifs de calcium le long du sarcolemme au repos qui seraient plus importants dans les fibres *mdx* (Mallouk et Allard, 2002).

Si une concentration en calcium intracellulaire plus élevée dans le muscle *mdx* semble sujette à controverse, l'élévation du calcium sous sarcolemmien est néanmoins en faveur de l'hypothèse calcique. Il est difficile de savoir si l'altération calcique est le premier événement dans les stades précoces de la maladie ou si c'est le résultat des dommages membranaires.

Le chapitre qui suit décrit l'implication des principaux canaux perméables au calcium: les canaux dits 'de fuite', les SOCs, les canaux MécanoSensibles (MS) ou SACs et les canaux voltage-dépendants.

1.2. Les canaux dits 'de fuite' (leak channels)

Différentes études ont mis en évidence un canal calcique indépendant du voltage avec une activité plus élevée (plus particulièrement la Po) dans les myotubes et myofibres fraîchement dissociées *mdx* (Fong et al., 1990; Hopf et al., 1996a; Fraysse et al., 2004) et myotubes DMD (Fong et al., 1990). Alors que la nifédipine diminue l'activité des canaux voltage-dépendants, son effet sur les 'leak channels' est, de manière surprenante, inverse. Ces canaux de fuite ont la particularité d'être activés par l'agoniste nifédipine et d'être inhibés par des antagonistes DHP tels que AN406 et AN1043 (Hopf et al., 1996b). De plus, Hopf met en évidence un courant capacitatif (ou stock-dépendant) transitant par les canaux de fuite. Ces canaux de fuite seraient en réalité des SOCs. Par leur activité accrue, ils contribueraient à l'augmentation du niveau de calcium intracellulaire dans les myotubes et fibres *mdx* (Fong et al., 1990; Turner et al., 1991) (Fig. 35).

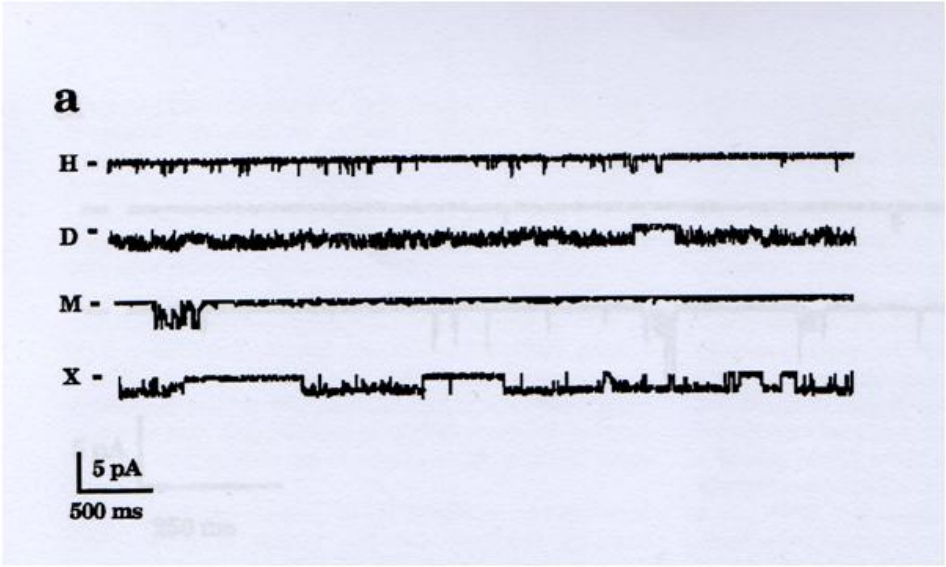


Figure 35: Activité plus importante des canaux dits 'de fuite' dans les myotubes déficients en dystrophine (Turner et al., 1991).
a) Activité des canaux dits 'de fuite' mesurée en patch-clamp (configuration cellule-attachée) sur les myotubes normaux et déficients en dystrophine. H-normal Human, D-Duchenne human, M-normal Mouse et X-dystrophic mouse myotubes.

Comme la protéolyse par la calpaine, protéase calcium-dépendante, est aussi augmentée dans le muscle dystrophique (Turner et al., 1988; Turner et al., 1993), la relation entre la protéolyse et l'activité des canaux de fuite a été explorée. L'inhibition de l'activité des canaux de fuite par AN1043 réduit la protéolyse à un niveau normal dans les myotubes *mdx* (Alderton et Steinhardt, 2000). Inversement, l'inhibition de la protéolyse par la leupeptine réduit l'activité des canaux de fuite et ainsi la concentration en calcium intracellulaire dans les myotubes *mdx* à un niveau normal (Turner et al., 1993). En bref, leur idée est que les ruptures membranaires lors de contractions musculaires entrainent une cascade d'événements calciques qui activerait de manière anormale les canaux de fuite. Ces derniers amplifieraient le phénomène de charge calcique dans les cellules dystrophiques et en retour activeraient de manière accrue la protéolyse dépendante du calcium.

1.3. Les SOCs

Kurebayashi et Ogawa en 2001 ont montré pour la première fois l'existence des canaux SOCs dans les fibres musculaires squelettiques de souris fraichement dissociées (Kurebayashi et Ogawa, 2001). En effet, la déplétion en calcium progressive et partielle du RS par une solution hyperpotassique en présence ou en l'absence d'un inhibiteur de SERCA (CPA) est suffisante pour activer les SOCs. Ces entrées calciques sont inhibées par le Ni^{2+} et résistantes à la nifédipine, inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants. Des résultats similaires

ont été montrés par Gonzalez Narvaez et Castillo sur des fibres FDB adultes de souris suggérant une activation des SOCs indépendante de la déplétion des stocks intracellulaires par les RIP_3 dans le muscle squelettique (Gonzalez Narvaez et Castillo, 2007). Par la suite, les travaux de Vandebrouck et collaborateurs ont considérablement approfondi nos connaissances sur les SOCs dans la DMD (Vandebrouck et al., 2002). Ils décrivent un canal activé par la déplétion en calcium du RS grâce à la thapsigargine ou la caféine avec une occurrence et une probabilité d'ouverture plus importantes dans les fibres *mdx* (Fig. 36).

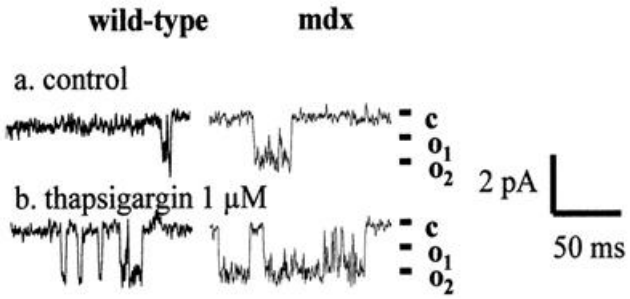


Figure 36: Courant calcique activé par la thapsigargine dans les fibres musculaires adultes normales et fibres *mdx* (Vandebrouck et al., 2002). Tracés originaux d'un courant calcique entrant enregistré par la technique de patch-clamp (configuration cellule-attachée) à un potentiel de membrane de -60 mV avant (control) et après la stimulation par 1 µM thapsigargine dans les fibres normales et fibres *mdx*.

La répression non sélective des protéines TRPC1 et TRPC4 grâce à des antisens diminue significativement l'occurrence des canaux SOCs dans les fibres *mdx* présentant une activité accrue de ces canaux. Ducret et collaborateurs décrivent une signature électrophysiologique identique entre les canaux SOCs et les canaux MS dans les fibres adultes de souris (Ducret et al., 2006). Sachant que TRPC1 est le candidat proposé par Maroto et collaborateurs pour former un canal MS (Maroto et al., 2005), il se pourrait que les SOCs et les canaux MS soient représentés par la même entité moléculaire, les TRPCs.

Les canaux dits 'de fuite' décrits précédemment seraient aussi des SOCs car la mesure de courant calcique unitaire de ce canal par la technique de patch-clamp ou la mesure de l'activité globale par la technique de quenching du fura-2 par le manganèse est augmentée dans les myotubes dont les stocks intracellulaires ont été vidés auparavant en calcium par le CPA (Hopf et al., 1996b). Au contraire des fibres adultes, le CPA seul induit instantanément la déplétion des stocks intracellulaires provenant de myotubes. Collet et Ma ont eux aussi démontré l'existence de SOCEs dans des cellules musculaires squelettiques fœtales obtenues à partir d'embryons de souris âgées de 15 et 16 jours (Collet et Ma, 2004). Gutierrez-Martin et collaborateurs mettent en avant l'existence des SOCEs dans les myotubes C2C12

(Gutierrez-Martin et al., 2005). L'extinction de la fluorescence du fura-2 par le manganèse, qui reflète les entrées cationiques, est plus importante lorsque le RS a été précédemment déplété par l'administration de la thapsigargine et de la caféine. Ces entrées sont sensibles au Ni^{2+}, La^{3+}, Gd^{3+} et 2-APB mais résistantes à la nifédipine, ce qui exclut les canaux calciques de type L dans ces enregistrements. Weigl et collaborateurs montrent également une activation des canaux SOCs par déplétion en calcium du RS grâce uniquement à l'activation des récepteurs à la ryanodine dans des myotubes humains (Weigl et al., 2003). Le mécanisme d'activation ne semble pas impliquer la voie PLC.

1.4. Les canaux MS ou les canaux SACs

Les canaux activés par l'étirement membranaire sont observés dans de nombreux tissus incluant le muscle squelettique (Lansman et Franco-Obregon, 2006). Des études originelles de Lansman et collaborateurs ont montré la présence d'une faible activité des canaux MS au repos. L'application d'une succion au niveau de la pipette de patch induit un étirement à la membrane et de ce fait active les canaux MS dans les myotubes contrôles et les myotubes *mdx* avec une probabilité d'ouverture deux fois plus grande dans les myotubes et fibres isolées *mdx* (Fig. 37) (Franco et Lansman, 1990a et b; Franco-Obregon et Lansman, 1994).

Figure 37: Activité des canaux MS dans les myotubes C57BL/6 et *mdx* (d'après Franco-Obregon et Lansman, 1994).
Tracés originaux d'un courant MS enregistré par la technique de patch-clamp (configuration cellule-attachée) à un potentiel de membrane de -60 mV dans les myotubes wild type et *mdx*.

D'autre part, une forte activité d'un canal inactivé par l'étirement n'est présente uniquement que dans les cellules *mdx* (Franco et Lansman, 1990b). Plus récemment, ce groupe a montré que ces deux canaux seraient représentés par la même entité qui fonctionnerait alors selon deux modes d'ouverture (Franco-Obregon et Lansman, 2002). Ces auteurs ont conclu que le manque de stabilité membranaire et la perte du complexe DAP dans les cellules dystrophiques faciliteraient la transition des canaux vers un état de haute activité après un stress mécanique. Cependant, l'abondance de ces canaux est plus importante dans les cultures de myotubes mais pas dans les fibres isolées (Franco-Obregon et Lansman, 1994). Au contraire, Vandebrouck et collaborateurs ont reporté un canal avec des propriétés biophysiques similaires aux canaux

MS, une augmentation de l'occurrence de ces canaux dans les fibres *mdx* (x1,6) ainsi qu'une augmentation de la probabilité d'ouverture (x2) dans les fibres *mdx* (Vandebrouck et al., 2002) mais également dans les myotubes DMD (Vandebrouck et al., 2001).

D'autres équipes, de manière indirecte, attribuent une augmentation des influx cationiques aux canaux MS par l'utilisation de bloqueurs non spécifiques comme le Gd^{3+}, l'amiloride, 2-APB, le SKF-96365 et la streptomycine (Tutdibi et al., 1999; Carslon et al., 2005; Yeung et al., 2005; Ducret et al., 2006). L'utilisation de bloqueurs MS empêcherait la perte de la force musculaire normalement produite lors de contractions excentriques suggérant que le flux d'ions par les canaux MS est plus prononcé dans les cellules dystrophiques. Il existe un bloqueur connu pour être spécifique des canaux MS, la toxine GsMTx4 (Suchyna et al., 2000; Ostrow et al., 2003; Yeung et al., 2005; Ducret et al., 2006). Le traitement pendant 2 semaines de souris *mdx* avec la streptomycine empêche les dommages musculaires comme l'atteste le fait que l'apparition des noyaux centraux soit réduite (Yeung et al., 2005). Dernièrement, l'équipe d'Allen a proposé l'implication de TRPC1 (comme canal SAC) dans la DMD (Gervasio et al., 2008). Ils ont démontré une augmentation de l'expression de TRPC1, de la cavéoline-3 et de la Src-kinase dans le muscle *mdx* en comparaison avec le muscle normal. La cavéoline-3 favoriserait le transfert vers le sarcolemme de TRPC1 afin qu'il puisse jouer son rôle de canal SOC ou SAC. Ce travail montre également une augmentation (x6) des influx calciques sur des myoblastes C2 surexprimant à la fois la cavéoline-3 et TRPC1. L'activité de ce dernier dépendrait de l'activation de la kinase Src. La production de ROS (Reactive Oxygen Species) semble être augmentée dans le muscle squelettique. De ce fait, Gervasio et collaborateurs suggèrent que la voie ROS-Src kinase serait augmentée et activerait plus TRPC1 entrainant alors cette surcharge calcique sous le sarcolemme dans les modèles dystrophiques (Gervasio et al., 2008).

1.5. Altération des stocks calciques intracellulaires

Normalement, la libération du calcium à partir du RS est étroitement contrôlée par le couplage DHPR/RyR au niveau des tubules T lors d'une dépolarisation. Un défaut de cette régulation peut entrainer une fuite persistante de calcium à partir des stocks et augmenter le calcium cytosolique soit directement ou soit en activant les SOCs. Une étude intéressante de cet aspect a été réalisée par Wang et collaborateurs en examinant les sparks calciques (ou étincelles calciques) (Wang et al., 2005). Ce sont des événements de libération de calcium discrets et localisés. Quelques sparks sont normalement observés dans le muscle squelettique afin de maintenir le RS quiescent et prêt à relarguer du calcium lors des contractions musculaires.

Dans les fibres C57BL/10 contrôles, l'activité sparks induite par des chocs osmotiques disparaît 5 à 10 min, après le retour des fibres dans une solution normale, alors que dans les fibres *mdx*, l'activation des sparks est irréversible. D'autre part, des exercices intensifs entrainent une activité sparks dans les deux types de tissus avec une plus forte activité chez les souris *mdx*. Ces activités seraient dues lors de stress mécaniques à des ouvertures de groupes de RyR qui ont alors échappé aux contrôles des DHPR.

Une altération des libérations calciques provenant du RS a été démontrée pour la première fois par Imbert et collaborateurs dans des myotubes humains DMD stimulés par l'acétylcholine ou par une solution hyperpotassique (Imbert et al., 1995). Ces travaux ont été par la suite confirmés sur le modèle *mdx* par Robert en 2001 et Basset en 2004. Robert et collaborateurs observent une augmentation de la libération calcique provenant du RS après stimulation KCl (Robert et al., 2001). Basset et collaborateurs montrent également une réponse calcique induite par le carbachol plus forte (x4,5) dans les myotubes *mdx* comparé aux myotubes C57BL/10 (Basset et al., 2004). Cette voie serait dépendante des RIP_3 uniquement dans les cellules dystrophiques. De ce fait, la régulation de la voie IP_3 détériorée pourrait augmenter directement l'activité des SOCs ou indirectement par la libération de calcium à partir du RS. D'autre part, Marchand en 2004 et Balghi en 2006 confirment ces données sur des lignées dystrophiques par la mesure du signal calcique stimulé par KCl qui semble être exacerbé dans les lignées dystrophiques Sol8 et SolC1 mais celui-ci est corrigé par la mini-dystrophine (Marchand et al., 2004; Balghi et al., 2006).

Robert et collaborateurs expliquent ce phénomène par une accumulation de calcium dans le RS dans les fibres *mdx* grâce à la transfection de l'aequorine adressée au niveau du RS alors que d'autres ne trouvent pas de différence dans la teneur en calcium luminal (Vandebrouck et al., 1999). En accord avec la dernière équipe, Culligan et collaborateurs ne montrent aucune altération du niveau d'expression des RyR et de la SERCA dans les muscles de souris *mdx* (Culligan et al., 2002). Mais l'activité des SERCA a été montrée comme étant plus faible dans les fibres *mdx* (Kargacin et Kargacin, 1996; Divet et Huchet-Cadiou, 2002). Finalement, Divet et collaborateurs montrent une réduction de la recapture de calcium par les SERCA dans les fibres rapides EDL de souris mais pas dans les fibres soléaires lentes, ce qui est corrélé avec l'augmentation de l'expression de la SERCA2a dans les fibres rapides (Divet et al., 2005). Une autre hypothèse concerne les RIP_3. En effet, une altération de la production d'IP_3 pourrait aussi contribuer à une différence d'activité calcique du RS dans les cellules dystrophiques malgré une prédominance de la libération de calcium par les RyR ou pourrait être responsable de l'augmentation de l'activité des SOCs. Liberona et collaborateurs ont

montré une augmentation de la production IP_3 (2 à 3x) et de la liaison de l'IP_3 sur son récepteur au repos mais aussi après dépolarisation dans les lignées dystrophiques humaines et murines (Liberona et al., 1998). La densité des RIP_3 au niveau nucléaire semble aussi être augmentée. Mondin et collaborateurs montrent également l'implication des RIP_3 de type 1, par l'utilisation de pharmacologie spécifique et de siRNA RIP_3 de type 1, dans l'augmentation de la libération calcique dans les cellules déficientes en dystrophine SolC1. Ceci s'expliquerait par une augmentation de l'expression des RIP_3 (Mondin et al., 2009). Ils suggèrent une suractivation de la voie calcineurine/NFAT qui exacerberait la transcription du gène codant pour les RIP_3 dans les cellules déficientes en dystrophine.

En contradiction avec les études décrites précédemment, Woods et collaborateurs montrent une réduction de la libération calcique à partir du RS stimulée par des pulses électriques dans les fibres *mdx* (Woods et al., 2005). Il faut noter que d'autres études ne trouvent pas de différences dans la libération de calcium par les RyR (Collet et al., 1999; Fraysse et al., 2004).

1.6. Les canaux calciques voltage-dépendants

Quelques groupes ont montré une réduction du courant I_{CaL} dans les modèles *mdx* et DMD (Imbert et al., 2001, Friedrich et al., 2004) qui pourrait alors contribuer à la diminution de la génération de la force musculaire dans le muscle dystrophique. En effet, Imbert et collaborateurs mettent en évidence une diminution de la densité de courant par la technique de patch-clamp des canaux calciques de type L dans les cellules DMD innervées (Imbert et al., 2001). Friedrish et collaborateurs concluent que la dystrophine influence l'activité des canaux calciques de type L via un lien direct ou indirect (Friedrich et al., 2004; Friedrich et al., 2008) qui serait interrompu chez les souris *mdx* et ce lien serait crucial pour initier la libération calcique lors du Couplage Excitation/Contraction. Ce lien moléculaire semble être restauré en présence de la mini-dystrophine. Cette hypothèse reste cependant intrigante puisqu'elle contredit parfaitement l'hypothèse de la surcharge calcique dans les cellules dystrophiques.

POSITION DU PROBLEME ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

La dystrophine est une protéine du cytosquelette normalement exprimée sous la membrane des cellules musculaires squelettiques. Cette large protéine permet le lien entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'un complexe qui lui est associé: le DAP (Dystrophin-Associated Protein). A ce jour, ce complexe compte de nombreuses protéines dont les principales sont les dystroglycanes, les sarcoglycanes, le sarcospane, les dystrobrévines et les syntrophines. L'absence de la dystrophine dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) entraînerait la nécrose des fibres musculaires due à un manque du maintien de l'intégrité des membranes des fibres. La fonction de la dystrophine et du DAP serait donc de protéger la fibre musculaire contre les dommages engendrés par des cycles répétés de contraction et de relaxation.

A cette première hypothèse purement mécanique, s'ajoute l'hypothèse calcique suggérant que l'absence de la dystrophine entrainerait une altération de la fonction et de la distribution des canaux calciques sarcolemmiens, conduisant alors à une perturbation de l'homéostasie calcique. De nombreuses études ont suggéré que dans les cellules humaines DMD et murines *mdx*, l'absence de dystrophine pouvait conduire à une altération de la perméabilité membranaire au calcium (Hopf et al., 1996a; Tutdibi et al., 1999), et à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire libre au repos (Turner et al., 1988; Turner et al., 1991; Imbert et al., 1995). Plusieurs indications sont venues appuyer l'idée qu'une fuite petite mais constante de calcium à travers la membrane plasmique des cellules dépourvues de dystrophine, résultait de l'absence du rôle régulateur de cette protéine en particulier à travers un effet sur les canaux MS (Franco et Lansman, 1990a et b; Franco-Obregon et Lansman, 1994), les canaux dits 'de fuite' (Fong et al., 1990; Turner et al., 1991; Hopf et al., 1996b) et/ou les canaux SOCs (Vandebrouck et al., 2002).

A l'heure actuelle, le lien entre l'absence de dystrophine et l'altération calcique n'est pas bien établi. C'est pourquoi, l'objectif de ce travail a été de tenter de mettre en évidence un lien entre les mouvements de calcium et la dystrophine. Les expériences ont été principalement réalisées sur deux lignées cellulaires: les cellules SolC1 déficientes en dystrophine et les cellules SolD6 exprimant la mini-dystrophine ainsi que sur des cultures primaires de souris normales et de souris *mdx,* modèle animal de la DMD. Parmi les canaux calciques impliqués dans la surcharge calcique, les SOCs ont semblé particulièrement intéressants car ils sont activés par la vidange en calcium du RS (qui se produit à chaque contraction musculaire) et sont impliqués dans la fatigue musculaire (Pan et al., 2002). Précédemment, Vandebrouck C.

et collaborateurs ont montré l'existence de courants calciques, enregistrés au sarcolemme, dépendants de TRPC1 et/ou de TRPC4 dont l'activité est augmentée dans les fibres *mdx* (Vandebrouck et al., 2002). Leurs résultats suggèrent également que ces courants sont dépendants des stocks intracellulaires dans la fibre mature, mais une autre équipe n'a pas obtenu d'enregistrements, effectués en patch-clamp, de courants calciques dépendants des réserves intracellulaires dans les fibres matures (Allard et al., 2006).

Des précédents travaux au sein du laboratoire ont été consacrés à l'étude des mécanismes qui contrôlent les entrées de calcium dans les cellules musculaires squelettiques saines et déficientes en dystrophine et des résultats obtenus sur des myotubes montrent qu'il est possible d'enregistrer, par la technique d'extinction du fura-2 par le manganèse, des influx cationiques après un protocole de déplétion en calcium du RS (Hopf et al., 1996b; Boittin et al., 2006; Vandebrouck et al., 2006) et que ces influx sont régulés par l'expression de la mini-dystrophine ainsi que par l'activité mitochondriale (Vandebrouck et al., 2006). Ces travaux posaient donc la question d'un lien moléculaire entre la dystrophine et les canaux cationiques non dépendants du potentiel qui puisse expliquer cette régulation. L'objectif de ce travail fut alors de déterminer un lien moléculaire entre la dystrophine et les canaux TRPCs et une éventuelle implication de ce lien dans la régulation des canaux cationiques sarcolemmiens constitués par des TRPCs.

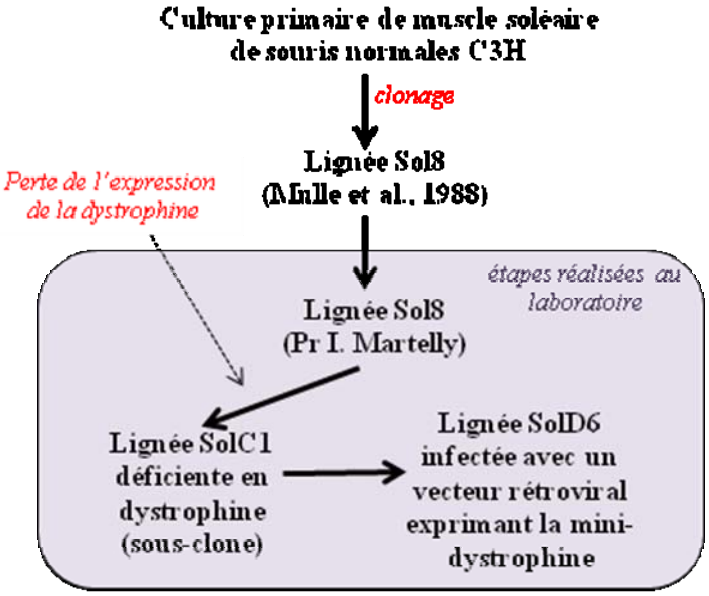
Le premier candidat retenu fut l'α1-syntrophine, isoforme prédominante dans le muscle squelettique et cardiaque. En effet, les syntrophines, appartenant au complexe DAP, fonctionnent comme des protéines adaptatrices (ou protéines d'échafaudage) en recrutant des protéines de signalisation à la membrane et au DAP. Elles peuvent interagir simultanément avec de multiples protéines via ces trois domaines (PH, PDZ, SU). Le domaine PDZ lie de nombreuses protéines de signalisation telles que la DGKz (Hogan et al., 2001), le récepteur ICA512 (Ort et al., 2000), le domaine C-terminal des canaux sodiques voltage-dépendants SkM1 et SkM2 (Gee et al., 1998, Schultz et al., 1998), le canal potassique Kir4.1 (Connors et al., 2004), l'aquaporine AQ4 (Neely et al., 2001) et nNOS (Brenman et al., 1996). Nous avons donc décidé d'étudier les interactions de l'α1-syntrophine avec les canaux TRPCs et son éventuel rôle dans la régulation des influx cationiques, ainsi que de confirmer l'implication de TRPC1 et TRPC4 dans ces influx par la technique spécifique de siRNA.

Dans un second temps, nous avons voulu caractériser le mécanisme impliqué dans l'augmentation des entrées cationiques par TRPC1 dans les cellules déficientes en dystrophine ou en α1-syntrophine. La fonction SOC de TRPC1 est largement discutée et controversée. De ce fait, nous nous sommes posés la question de savoir si celui-ci ne dépendait pas de

messagers secondaires libérés ou activés lors du protocole de déplétion. En effet, les mécanismes d'activation des SOCs restent encore élusifs dans de nombreux types cellulaires. Des hypothèses comme le CIF, le couplage structural RIP_3/SOC, la fusion de vésicules et STIM1 sont énoncés. D'autres études, plus rares, montrent également une implication de l'activité basale de la PLC (Rosado and sage, 2000b; Broad et al., 2001; Tu et al., 2005; Patterson et al., 2002; Litjens et al., 2007), du calcium (Haverstick et Gray, 1993; Zitt et al., 1997) ou de la PKC (Ahmmed et al., 2004; Zhang et al., 2006; Smani et al., 2008) dans l'activation des SOCs.

Or, il est maintenant admis que les cellules déficientes en dystrophine présentent une production d'IP_3 plus importante dans les cellules déficientes en dystrophine humaines et murines (Liberona et al., 1998) et une augmentation de la libération calcique dépendante des RIP_3 dans les lignées SolC1 déficientes en dystrophine (Balghi et al., 2006; Mondin et al., 2009). Sachant que ces derniers sont activés par l'IP_3, second messager produit de l'hydrolyse du PIP_2 par la PLC, il a été suggéré une suractivation de la voie PLC dans les cellules déficientes en dystrophine. Dans cette étude, nous avons voulu savoir si cette voie PLC faisait partie intégrante du processus impliqué dans la dérégulation des entrées cationiques dans les myotubes déficients en dystrophine. Pour cela, des tests pharmacologiques couplés à des mesures d'influx cationiques par la technique d'extinction du fura-2 par le manganèse ont été réalisés sur les myotubes SolD6 et SolC1.

a



b

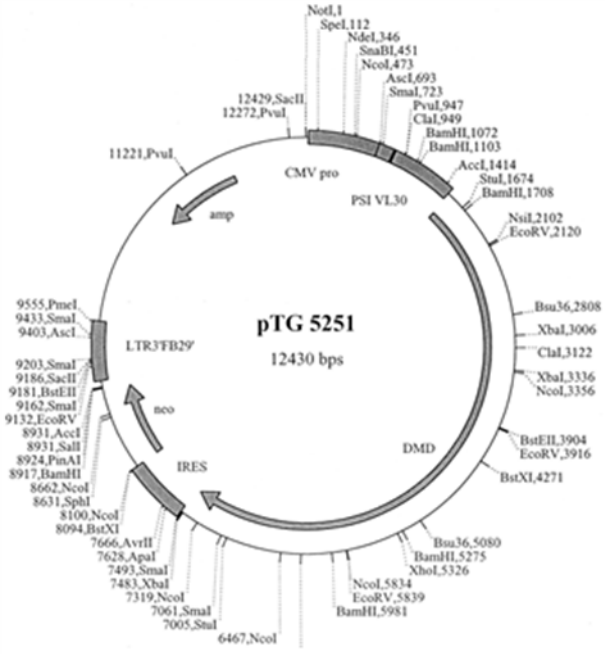


Figure MII: Les lignées cellulaires dys- SolC1 et minidys+ SolD6.
a) Filiation entre les différents types cellulaires issus de la lignée Sol8 (d'après Marchand et al., 2004).
b) Carte du plasmide pTG 5251 codant pour la mini-dystrophine.

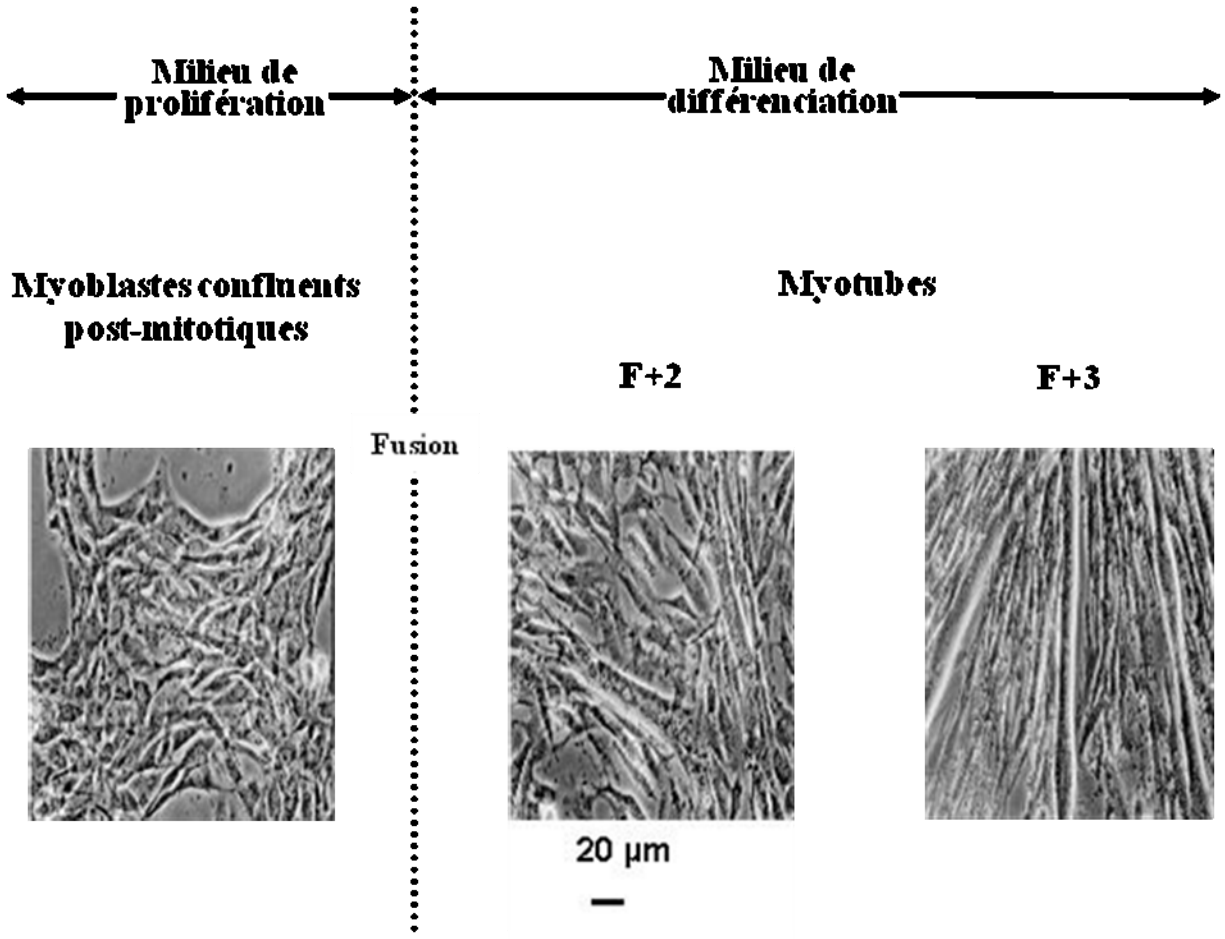


Figure MM2: Aspects morphologiques du développement des lignées dys- SolC1 et minidys+ SolD6 en culture.
Les photographies sont réalisées par microscopie photonique à transmission en contraste de phase.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Le matériel biologique

1. Les différentes lignées myogéniques

Les études ont été effectuées sur des lignées de cellules musculaires squelettiques. La lignée SolC57dys+, fournie par le Professeur Urs Ruegg (Université de Genève), exprime la dystrophine, qui s'adresse correctement à la membrane au cours de la différenciation cellulaire. Ces cellules proviennent d'une culture primaire de muscles soléaires prélevés chez la souris normale C57BL/10. Cette lignée a la capacité de proliférer sous forme de myoblastes mononuclées. Après l'alignement de ces derniers, ils peuvent fusionner pour donner des myotubes polynuclées qui constituent alors la différenciation terminale. D'autres lignées

cellulaires (dys- SolC1 et minidys+ SolD6) ont été clonées à partir de la lignée myogénique Sol8 fournie par le Professeur Isabelle Martelly (Université de Paris XII, Créteil). Cette lignée a été isolée à partir d'une culture primaire de muscles soléaires de souris C3H normales (Mulle et al., 1988). La lignée dys- SolC1 n'exprimant pas la dystrophine est un sous clone, infecté avec un vecteur vide, de la lignée Sol8 (Fig. MM1a). Les SolC1 présentent les mêmes caractéristiques que les Sol8 mais avec un indice de fusion plus élevé. La lignée minidys+ SolD6, infectée par un rétrovirus contenant l'ADNc de 6,3 kb codant pour la mini-dystrophine (229 kDa), a été établie à partir de la lignée SolC1 (Fig. MM1a). Ainsi, elle exprime de manière stable la mini-dystrophine. Le vecteur d'expression utilisé pour l'infection est le vecteur pTG 5251, vecteur plasmidique contenant le gène codant pour la mini-dystrophine (Fig. MM1b). Ce vecteur possède également une séquence Psi d'encapsidation, responsable de l'incorporation du plasmide dans les particules virales, une séquence neo, sous le contrôle de la séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site), permettant une sélection par la néomycine et un promoteur rétroviral LTR (Long Terminal Repetition) contrôlant l'expression forcée de la mini-dystrophine dans les cellules infectées. Les aspects morphologiques et le développement de ces lignées ont été étudiés et publiés par Marchand et collaborateurs (Marchand et al., 2004). Leurs comportements en culture semblent identiques avec un développement plus régulier et plus stable pour les sous clones SolC1 et SolD6. Comme pour la lignée SolC57dys+, elles prolifèrent sous forme de myoblastes, s'alignent, et se différencient en myotubes (Fig. MM2). Enfin, des études ont été réalisées sur la lignée myogénique Sol8P pourvue de dystrophine. Ces quatre lignées ne présentent pas d'activités contractiles spontanées ou induites.

2. Conservation et entretien des cellules

2.1. Congélation/Décongélation des cellules

Afin d'éviter toute contamination des cultures cellulaires par des bactéries et des champignons, toutes les manipulations sont effectuées en condition d'asepsie.

Ces quatre lignées sont conservées dans plusieurs cryotubes stériles plongés dans de l'azote liquide (-196 °C). Lors de la décongélation, un milieu dit de décongélation est préalablement préparé et chauffé à 37 °C (Fig. MM3). Le cryotube contenant les cellules est ensuite décongelé rapidement par des passages rapides dans le bain-marie puis est resuspendu dans 2 ml de milieu de décongélation afin de diluer le DMSO très toxique pour les cellules présent dans le milieu de conservation. Les cellules sont ensuite mises en présence de 10 ml de milieu

de prolifération (Fig. MM3) puis ensemencées dans deux flacons à bouchon ventilé dont la surface favorise l'adhésion cellulaire.

	Milieu de prolifération Sol°1, Sol°6, Sol°8	Milieu de fusion	Milieu de décongélation	Milieu de congélation	Milieu de prolifération Sol°5
DMEM* (Lonza)	44 %	96 %	38 %	68 %	19 %
Ham's F-12 (Lonza)	44 %	-	38 %	-	57 %
Sérum de veau fœtal (Boehringer)	10 %	-	20 %	20 %	20 %
Sérum de cheval (Gibco)	-	2 %	-	-	-
Ultroser G	-	-	2 %	-	2 %
L-Glutamine (Sigma-Aldrich)	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
Antibiotiques** (Sigma-Aldrich)	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
Insuline (Sigma-Aldrich)	-	10 µg ml	-	-	-
DMSO (Sigma-Aldrich)	-	-	-	10 %	-

* Dulbecco's Modified Eagle's Medium
** Streptomycine (50 µg/ml), Pénicilline G (60 µg/ml)

Figure MM3: Composition des milieux de culture des lignées cellulaires.

Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37 °C sous une atmosphère saturée en humidité avec 5 % de CO_2 et 95 % d'air. Les cellules sont alors dans un environnement favorable à leur développement. Après 24 h d'incubation, le milieu de décongélation est remplacé par le milieu de prolifération afin d'éliminer toutes traces de DMSO. Le milieu de prolifération est riche en sérum de veau fœtal pour favoriser la prolifération des cellules grâce aux facteurs de croissance, aux vitamines. La concentration finale en calcium dans ce milieu est faible défavorisant alors la fusion des myoblastes. Lorsqu'elles ont atteint un niveau de confluence de 60 %, les cellules sont alors repiquées.

Afin de maintenir une réserve constante, les cellules sont régulièrement recongelées dans un cryotube à l'aide d'un milieu de congélation à 4 °C (Fig. MM3) puis entreposées dans une boîte de congélation toute une nuit à -80 °C permettant alors un refroidissement délicat d'un degré par minute pour éviter tout choc thermique et donc limiter la mort cellulaire. Le lendemain, les cryotubes sont mis à -196 °C dans l'azote liquide.

2.2. Le repiquage des cellules (trypsinisation et ensemencement)

Afin d'entretenir les cellules et d'éviter l'initiation de la fusion, les cellules sont repiquées de manière régulière. Il est important de préciser que le degré de confluence ne doit pas dépasser 80 % car, dans ce cas, les cellules rentrent dans la phase de différenciation et perdent leur capacité de prolifération. A 60 % de confluence, les cellules subissent une dissociation enzymatique en présence de 2 ml de trypsine-EDTA (Gibco), enzyme protéolytique, pendant une minute. Le milieu est ensuite aspiré puis le flacon placé dans l'incubateur pendant 5 min afin de faciliter le décollement des cellules du flacon en plastique. Le bon décollement des cellules est contrôlé grâce à un microscope inversé. Elles sont alors resuspendues par aspiration et refoulement dans 5 ml de milieu de prolifération. Les cellules sont ensuite comptées sur cellule de Malassez et sont ensemencées dans des plaques 6 puits contenant des lamelles en verre gélatinées (gélatine 1 % (Sigma-Aldrich) de 30 mm de diamètre ou dans des plaques 12 puits contenant des lamelles en verre gélatinées de 18 mm de diamètre pour des études calciques ou d'immunomarquages à F+3 et F+4 (trois et quatre jours après la promotion de la fusion des myoblastes). Pour l'entretien, les cellules sont ensemencées dans de nouveaux flacons de routine à compter de 150 µl complétés avec 5 ml de milieu de prolifération par flacon pour une confluence trois jours après. A chaque repiquage, les cellules peuvent perdre certaines caractéristiques, elles sont donc repiquées une vingtaine de fois maximum.

2.3. La différenciation des cellules

Les études se font essentiellement sur des cellules différenciées en myotubes à F+3 et F+4, stade où la (mini-)dystrophine est correctement adressée à la membrane. Les cellules confluentes peuvent amorcer la différenciation mais celle-ci est accélérée sous l'influence d'un milieu de fusion (encore appelé milieu de différenciation) présentant une augmentation de la concentration en calcium, une suppression du sérum de veau fœtal et l'introduction de sérum de cheval (Fig. MM3). Les cellules, accolées entre elles par contact entre leurs membranes, fusionnent pour donner des myotubes polynuclées.

3. Culture primaire des muscles squelettiques de souris jeunes

La culture de cellules consiste à maintenir hors de l'organisme, dans un milieu proche des conditions physiologiques, des cellules capables de se diviser et/ou de conserver un métabolisme et des fonctions spécifiques observées *in vivo*. L'isolement des cellules organisées en tissu requière des méthodes fondées sur la dissection et la digestion enzymatique du tissu d'origine. Dans le muscle néonatal de souris, une grande partie des précurseurs myogéniques prélevés est constituée d'une population particulière de myoblastes: les cellules satellites. Elles se trouvent étroitement accolées aux fibres sous la lame basale et l'endomysium qui entourent la fibre musculaire et assurent la croissance et la régénération musculaire. Leurs comportements *in vitro* rappellent les étapes de différenciation *in vivo* et ainsi elles nous permettent d'en étudier les mécanismes. Le but est de prélever, de dissocier et de mettre en culture les cellules satellites provenant des muscles des pattes postérieures de souris de la souche C57BL/10 et de souris *mdx* âgées de 3 à 6 semaines. Les cellules satellites mises en culture sont ainsi capables de proliférer, de s'aligner, de fusionner et enfin de présenter les caractéristiques du muscle différencié.

La souris est tout d'abord euthanasiée par dislocation cervicale puis lavée au savon bactéricide et à l'alcool iodé. Une incision de la peau est effectuée au niveau des pattes postérieures afin de mettre en évidence les muscles. Les muscles sont alors prélevés sans tissu conjonctif, ni tendons. Ceux qui nous intéressent sont le muscle soléaire (muscle lent à métabolisme oxydatif), le gastrocnémien, l'EDL (Extensor Digitorum Longus: muscle rapide à métabolisme glycolytique), le tibialis et le quadriceps. Ils sont ensuite déposés dans du PBS (Phosphate Buffer Saline: NaCl 130 mM; KCl 2,07 mM; Na_2HPO_4 1,5 mM; KH_2PO_4 8 mM) stérile chaud supplémenté de 1 % d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine) (Sigma-Aldrich). Le PBS ne contient ni Ca^{2+} ni Mg^{2+} permettant ainsi une dissociation grossière puisque l'absence de ces deux cations divalents favorise la dissociation tissulaire en déstabilisant les liaisons intercellulaires. Les muscles ainsi disséqués, sont découpés en petits morceaux pour faciliter l'action des enzymes de digestion et nettoyés afin d'éliminer les tendons et amas graisseux. Des étapes de centrifugation sont nécessaires pour éliminer les cellules autres que musculaires telles que les cellules sanguines, les ostéoblastes et ostéoclastes, les débris de cellules mortes etc. Les morceaux de muscles subissent une dissociation enzymatique pendant 45 min à 37 °C sous agitation. La solution enzymatique contient 1,5 mg/ml de collagénase de type I (Sigma-Aldrich), 2 mg/ml de protéase de type IV (Sigma-Aldrich) diluées chacune dans 10 ml de Ham's F-12 (Lonza), 300 µl d'HEPES et de Pénicilline/Streptomycine stériles. Les enzymes protéolytiques vont digérer la membrane

basale puis l'endomysium et ainsi libérer les cellules myogéniques progénitrices. Quand la dissociation est suffisante, d'autres étapes de centrifugation (5 min à 90 g) et de filtration (filtre 21 µm) sont réalisées. Subséquemment, les cellules musculaires sont mélangées dans du milieu de prolifération (Fig. MM4) adapté à ce type cellulaire afin de neutraliser l'action des enzymes et de stopper la digestion et subissent une étape de pré-ensemencement (preplating) d'une durée de 45 min à 37 °C. Cette dernière étape permet d'éliminer une grande partie des fibroblastes qui ont la propriété d'adhérer plus rapidement au support en plastique. Le surnageant est récupéré puis ensemencé dans des flacons à bouchon ventilé.

	Milieu de prolifération	Milieu de fusion	Milieu de dissociation
DMEM (Lonza)	78 %	93 %	-
Ham's F-12 (Lonza)	78 %	-	98 %
Sérum de veau fœtal (Boehringer)	10 %	-	-
Sérum de cheval (Gibco)	10 %	5 %	-
L-Glutamine (Sigma-Aldrich)	1 %	1 %	-
Antibiotiques (Sigma-Aldrich)	1 %	1 %	1 %
HEPES (10 mM) (Sigma-Aldrich)	-	-	1 %
Protéase IX (Sigma-Aldrich)	-	-	45 mg
Collagénase I (Sigma-Aldrich)	-	-	60 mg

Figure MM4: Composition des milieux de culture des cultures primaires de muscles squelettiques de souris.

Durant les premières heures d'ensemencement, les cellules arrondies vont adhérer progressivement au fond des flacons. A ce stade, les myoblastes sont difficilement discernables des fibroblastes qui n'ont pas pu être entièrement éliminés lors du preplating. Peu à peu les cellules arrondies deviennent fusiformes avec un cytoplasme réduit et un noyau

volumineux. Les cellules vont se multiplier jusqu'à atteindre un état de confluence où elles s'alignent et forment un tapis cellulaire. Lorsque les cellules atteignent un niveau de confluence important, elles peuvent alors être repiquées (protocole similaire à celui des lignées). Pour les mesures calciques, les myoblastes sont ensemencés dans des plaques 6 puits sur des lamelles de 30 mm de diamètre préalablement traitées avec du Matrigel (BD Biosciences) au 1/20ème. Les concentrations des cellules sont en général entre 150 000 et 300 000 cellules par puits. La différenciation terminale est favorisée par un milieu de fusion (Fig. MM4) adapté à ce type cellulaire. Durant les trois premiers jours de différenciation, les myotubes possèdent des noyaux en position centrale. Dès le quatrième jour, il est possible d'observer des myotubes présentant des contractions spontanées. Au cours du temps, ces myotubes se développent et les noyaux sont repoussés à la périphérie. Des striations alignées correspondant aux protéines sarcomériques apparaissent dans l'axe transversal des myotubes. L'activité des myotubes est mesurée à F+6 (6 jours après promotion de la fusion des myoblastes), stade où la dystrophine est adressée à la membrane. La durée de vie de la culture primaire dépend de la fréquence de contractions, qui, lorsqu'elle devient trop importante, entraîne le décollement des cellules du fond de la boîte.

B. Les différentes méthodes de transfection

La transfection est un processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes, non-médié par un virus, par opposition à la transduction. Elle est typiquement réalisée par l'ouverture transitoire de "trous" dans les cellules pour permettre l'entrée de molécules extracellulaires, comme un plasmide d'ADN, un siRNA (silencing interfering RNA), ou autres.

Il existe différentes méthodes pour introduire un ADN exogène dans une cellule.

- L'une des plus classiques est la transfection par phosphate de calcium.
- Une méthode très efficace est l'inclusion de l'ADN à transfecter dans des liposomes, c'est-à-dire des micelles possédant des propriétés structurelles analogues à celles des membranes cellulaires, et leur permettant de fusionner effectivement avec elles, libérant l'ADN dans la cellule.
- D'autres méthodes utilisent des agents polycationiques pour lier l'ADN et le transporter dans la cellule.
- D'autres encore utilisent l'électroporation par des impulsions électriques.

Afin de surexprimer ou de réprimer nos protéines d'intérêts dans nos modèles cellulaires, trois méthodes bien distinctes ont été utilisées.

1. Lipides cationiques

1.1. Principe

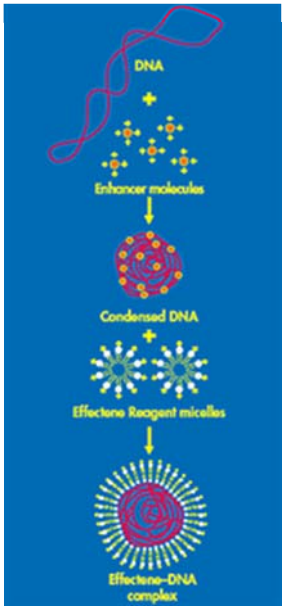
Nous avons évalué la capacité de 3 agents lipidiques commerciaux de transfection (DreamFect™, jetPEI™, Effectene™) à introduire nos plasmides d'intérêts dans les différentes lignées myogéniques et dans les cultures primaires C57BL/10 et *mdx*, afin de déterminer lequel des 3 était le plus efficace en transfection, tout en étant le moins cytotoxique. Nous avons alors choisi l'Effectene™ (Qiagen). L'Effectene est un agent de transfection basé sur le principe de la lipofection. C'est un mélange de lipides cationiques non liposomiques qui se fixe aux groupements phosphates négatifs de l'ADN et l'englobe entièrement. Le complexe formé est globalement positif et va pouvoir se fixer aux polysaccharides de la membrane plasmique, qui sont négatifs. Une fois fixé à la membrane, le complexe est endocyté et adressé à l'endosome. Par un processus encore mal connu, le complexe ADN-polycation quitte l'endosome, et est transféré dans le noyau, où il est exprimé (transfection transitoire) ou intégré au génome puis exprimé (transfection stable). Pour réaliser la transfection, l'Effectene est utilisé en conjonction avec un enhancer et un tampon de condensation de l'ADN (Buffer EC) permettant ainsi la formation de micelles avec l'ADN (Fig. MM5a). Cette méthode est très efficace et reproductible malgré les différents types cellulaires.

1.2. Protocole expérimental

Les expériences de transfection sont réalisées sur plaques 12 ou 6 puits préalablement revêtues d'une solution aqueuse de Matrigel au 1/20ème pour les cultures primaires et la lignée SolC57dys+ ou de gélatine à 1 % pour les lignées SolD6 et SolC1 ou sur boîte de pétri 90 mm. Pour chaque condition expérimentale, différentes quantités d'ADN sont utilisées (0,5 µg, 1 µg, 2 µg/puits) et le volume adéquat d'Effectene à rajouter est calculé de façon à obtenir le rapport ADN/agent de transfection aux valeurs désirées. Les expériences ont été réalisées systématiquement quelques heures après l'ensemencement des cellules au stade myoblastes. Pour les transfections faisant appel à l'Effectene, l'ADN est dilué dans du tampon de condensation pour un volume final de 100 µl. Après addition de l'enhancer, l'ensemble est brièvement agité au vortex et incubé à température ambiante pendant 5 min. Puis le volume

requis d'Effectene est versé dans le même tube. Après incubation de 10 min, un volume déterminé de milieu de prolifération est ajouté au complexe de transfection puis immédiatement le complexe final est ajouté sur les cellules à transfecter. Les cultures sont placées à 37 °C dans un incubateur, pendant 12 à 16 h, après quoi le milieu est renouvelé. La révélation de l'expression de la protéine se fait 24 h après. Les volumes utilisés pour l'enhancer, le BEC et l'Effectene sont donnés dans la figure MM5b.

a



b

	Ratio ADN/agent Effectene		
ADN (µg)	1:10	1:25	1:50
0,5	0,5 µg ADN 4 µl enhancer 5 µl Effectene	0,5 µg ADN 4 µl enhancer 12,5 µl Effectene	0,5 µg ADN 4 µl enhancer 25 µl Effectene
1	1 µg ADN 8 µl enhancer 10 µl Effectene	1 µg ADN 8 µl enhancer 25 µl Effectene	1 µg ADN 8 µl enhancer 50 µl Effectene
2	2 µg ADN 16 µl enhancer 20 µl Effectene	2 µg ADN 16 µl enhancer 50 µl Effectene	2 µg ADN 16 µl enhancer 100 µl Effectene

Figure MM5: Transfection de plasmide par l'Effectene.
a) Principe de la transfection par le lipide cationique Effectene (www.ebiotrade.com/.../qiagen/301425.htm).
b) Différentes quantités d'ADN avec le volume adéquat d'Effectene.

2. La Nucléofection

2.1. Principe

La technologie Nucleofector (Amaxa, Amaxa Biosystems, Germany) est une méthode de transfection fondée sur le principe de l'application d'un programme de pulses électriques en combinaison avec des tampons de transfection spécifiques à chaque type cellulaire. Pour la première fois, cette technologie permet le transfert de gènes non viraux dans des cellules primaires ou des lignées cellulaires avec une efficacité incomparable. Elle utilise le principe reconnu de l'électroporation, cependant modifié et amélioré. Ce qui rend cette technologie unique, c'est sa capacité à transférer l'ADN directement dans le noyau des cellules, indépendamment de la division cellulaire. Cela résulte en des rendements de transfert exceptionnellement élevés. La nucléofection est une méthode efficace pour la transfection de plasmide mais aussi de siRNA.

2.2. Protocole expérimental

Des plaques 6 puits sont préalablement préparées avec des lamelles de verres de 30 mm de diamètre recouvertes de gélatine 1 %, recouvertes avec 2 ml de milieu de prolifération puis pré-incubées dans l'incubateur afin que le milieu soit à une température idéale pour une transfection optimale. Les cellules, confluentes à 60 %, sont trypsinisées afin de les décoller des flacons en plastique puis comptées à l'aide de la cellule de Malassez. Le nombre de cellules nécessaire à la nucléofection est centrifugé pendant 10 min à 90 g. Après avoir retiré le surnageant, le culot de cellules est resuspendu dans une solution de transfection appelée Nucleofector Solution V pour une concentration finale d'environ 1 million de cellules/100 µl. Les cellules ne doivent pas être en présence de cette solution plus d'un quart d'heure, car ceci réduirait la viabilité cellulaire et l'efficacité du transfert de gène. Cette solution est additionnée de 2 µg d'ADN ou 4 µg de siRNA, transférée dans des cuvettes certifiées Amaxa, puis placées dans l'appareil Nucleofector Amaxa Biosystems permettant, avec un programme approprié à notre type cellulaire (B-032), la transfection des plasmides ou siRNA directement dans le noyau des cellules. 500 µl de milieu de prolifération pré-incubés à 37 °C sont ajoutés aux cellules transfectées et ce mélange est versé goutte à goutte dans les puits de façon à obtenir environ 500 000 cellules transfectées/puits pour une confluence le lendemain. En parallèle, 150 000 cellules non transfectées sont ensemencées dans les puits dits 'contrôles'. Par cette technique, l'expression du plasmide ou du siRNA est détectable 4 à 8 heures après la

transfection. Le lendemain ou surlendemain, le milieu de fusion est substitué au milieu de prolifération afin d'amorcer le processus de différenciation.

3. Autres lipides cationiques et siRNA

3.1. Principe

Lullaby™ est un agent de transfection de siRNA idéal pour l'extinction de gènes cibles. Il a été testé avec succès dans de nombreux types cellulaires. C'est un réactif spécifique pour le transport de siRNA. Le Lullaby™, à base de lipides cationiques et de polymères, est un agent efficace pour une utilisation de faible dose de siRNA. Il protège le siRNA des dégradations extracellulaires, transporte remarquablement les siRNA à travers les membranes cellulaires. Par conséquent, un fort taux de siRNA est délivré dans le cytoplasme assurant une efficacité importante de transfection avec une cytotoxicité faible.

3.2. Protocole expérimental

Il est recommandé d'ensemencer les cellules sur plaques ou sur boîtes de pétri un jour avant la transfection par le Lullaby^{TM} pour une confluence de 50 à 70 % le lendemain afin d'obtenir une efficacité d'extinction optimale. Dans des tubes eppendorf, 400 nM de siRNA dirigé contre l'α1-syntrophine ou contre TRPC1 et TRPC4 sont dilués dans 100 µl de milieu de culture classique DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza) chaud sans sérum et parallèlement, 16 µl de Lullaby^{TM} sont dilués aussi dans 100 µl de DMEM chaud. La solution de siRNA diluée est délicatement mélangée à la solution de transfection puis incubée pendant 20 min à température ambiante. Ensuite, ce complexe siRNA/Lullaby^{TM} est ajouté goutte à goutte sur les myoblastes ensemencés de la veille. Les expérimentations se réalisent trois jours après l'initiation de la fusion. Pour une transfection sur des boîtes de pétri de 60 mm, les concentrations de siRNA et les volumes de lullaby et de DMEM sont doublés. L'efficacité de transfection, donc d'extinction des gènes codant pour l'α1-syntrophine, TRPC1 et TRPC4 a été vérifiée par RT-PCR quantitative et par western blot. D'ailleurs, l'extinction de ces trois gènes semble très importante au bout de 48 h puis diminue au cours du temps mais reste majoritaire à F+3 (environ 60 % au bout de 72 h).

3.3. Définition et principe du siRNA

Dans une cellule, chaque protéine, sur laquelle reposent une ou plusieurs fonctions cellulaires est codée par un ARN spécifique, dit ARNm. L'ARN «traduit en protéine» assure ainsi

l'expression de l'information génétique portée par le gène au niveau de l'ADN dont il représente une copie. L'ARN interférent est un processus correspondant à un mécanisme de défense naturel de la cellule face à une infection virale ou à des mouvements de transposons (rétrovirus endogènes). Ce mécanisme a été découvert pour la première fois par David Baulcombe chez la plante, puis peu de temps après, chez les mammifères par Thomas Tuschl. L'ARN interférent assure la dégradation dans la cellule du (ou des) ARN du virus, la réduction voire l'absence des protéines correspondantes qui en résulte, bloquant ainsi la propagation de l'agent infectieux. Au niveau moléculaire, l'ARN infectieux est capable de s'associer à des petits fragments d'ARN ('small interfering RNA' ou 'silencing RNA', siRNA) en fonction de la complémentarité des bases de leurs séquences. L'hybride formé est sensible à une activité enzymatique spécifique qui entraîne la dégradation de l'ARN infectieux et l'absence de protéines. Il est possible d'inactiver fonctionnellement un gène choisi avec une remarquable spécificité et d'évaluer son implication fonctionnelle dans un processus physiologique ou physiopathologique. La connaissance de la séquence (même partielle) d'un ARN permet la synthèse de siRNA capable d'induire sa dégradation.

Les siRNA sont de petits ARN double brin de 20-25 nucléotides (Fig. MM6). La structure du siRNA résulte de l'activité d'une RNAse nucléaire de type III (ou ribonucléase) appelée Dicer. Elle clive, par hydrolyse de l'ATP, l'ARN double brin (dsRNA) en de courts fragments double brin que sont les siRNA avec deux bases libres aux extrémités 3'. Dicer contient deux domaines à activité RNAse et un domaine PAZ (Piwi Argonaut and Zwille), la distance entre ces deux régions détermine la longueur des siRNA ainsi produits. Les siRNA à l'état de double brin sont alors reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique nommé RISC (RNA Induce Silencing Complex). Celui ci s'active en libérant le brin complémentaire de l'ARN (ou brin sens). Ce complexe activé va reconnaître son transcrit cible, un ARNm, par complémentation des bases nucléiques. Ce système de reconnaissance assure la haute spécificité de ce mécanisme. Une fois la cible liée, l'endonucléase Argonaute, faisant partie du complexe RISC, va couper le transcrit au niveau du site de reconnaissance. Les deux morceaux du transcrit clivés par Argonaute vont être rapidement dégradés via leurs extrémités par des exonucléases. La transfection de siRNA dans les cellules a donc pour conséquence la destruction spécifique des ARNm ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par cet ARNm.

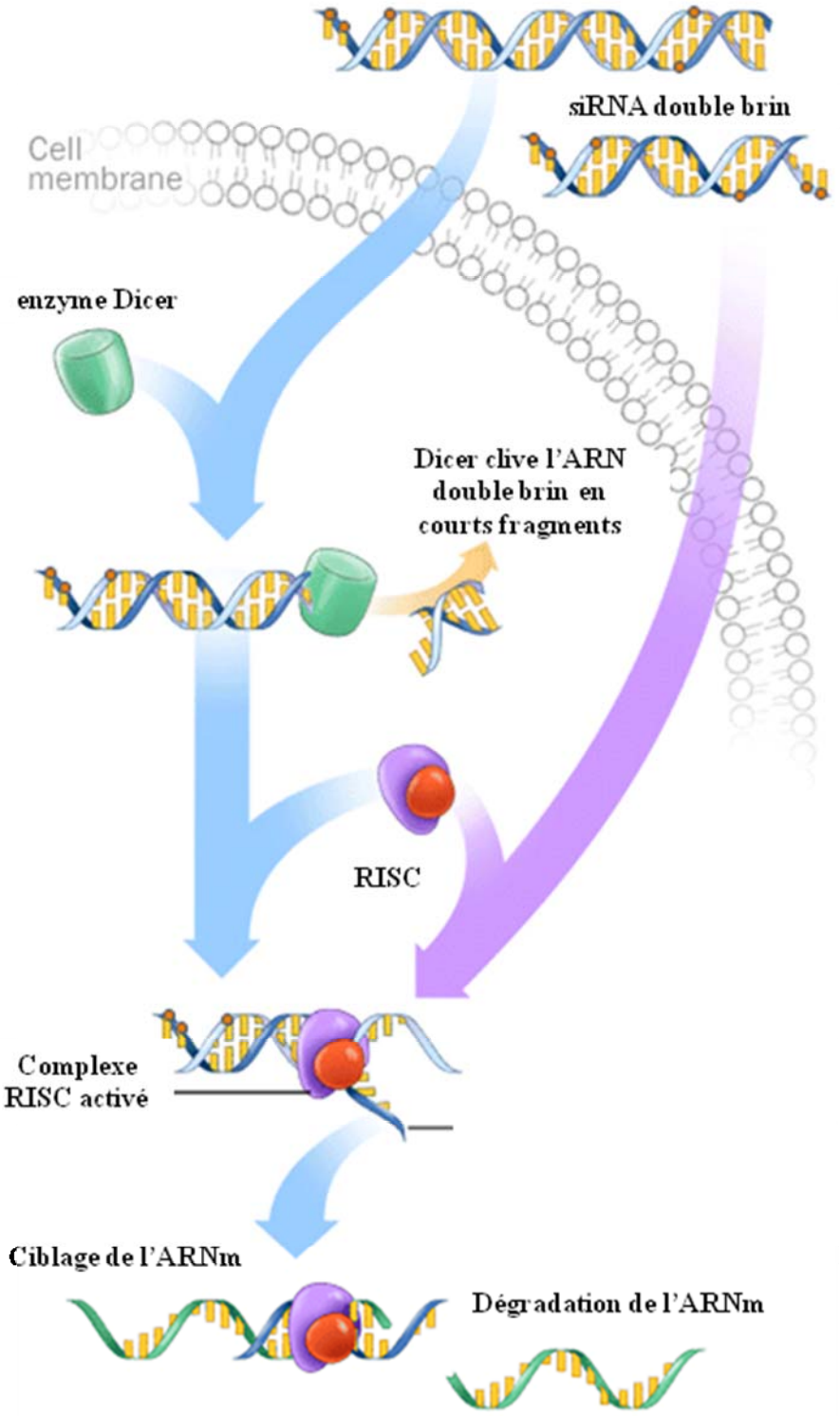


Figure MM6: La technique de siRNA. Principe général du siRNA (modifiée d'après le site www.mdrnainc.com/mdrna/delivery)

C. Techniques de physiologie cellulaire

1. Mesure d'influx calcique: extinction du fura-2 par le manganèse

Cette technique permet de mesurer un influx cationique transmembranaire grâce à la sonde fura-2/AM même si celui-ci est porté par un courant faible. Ici, les mesures ont été réalisées après vidange calcique du RS par la caféine et le CPA.

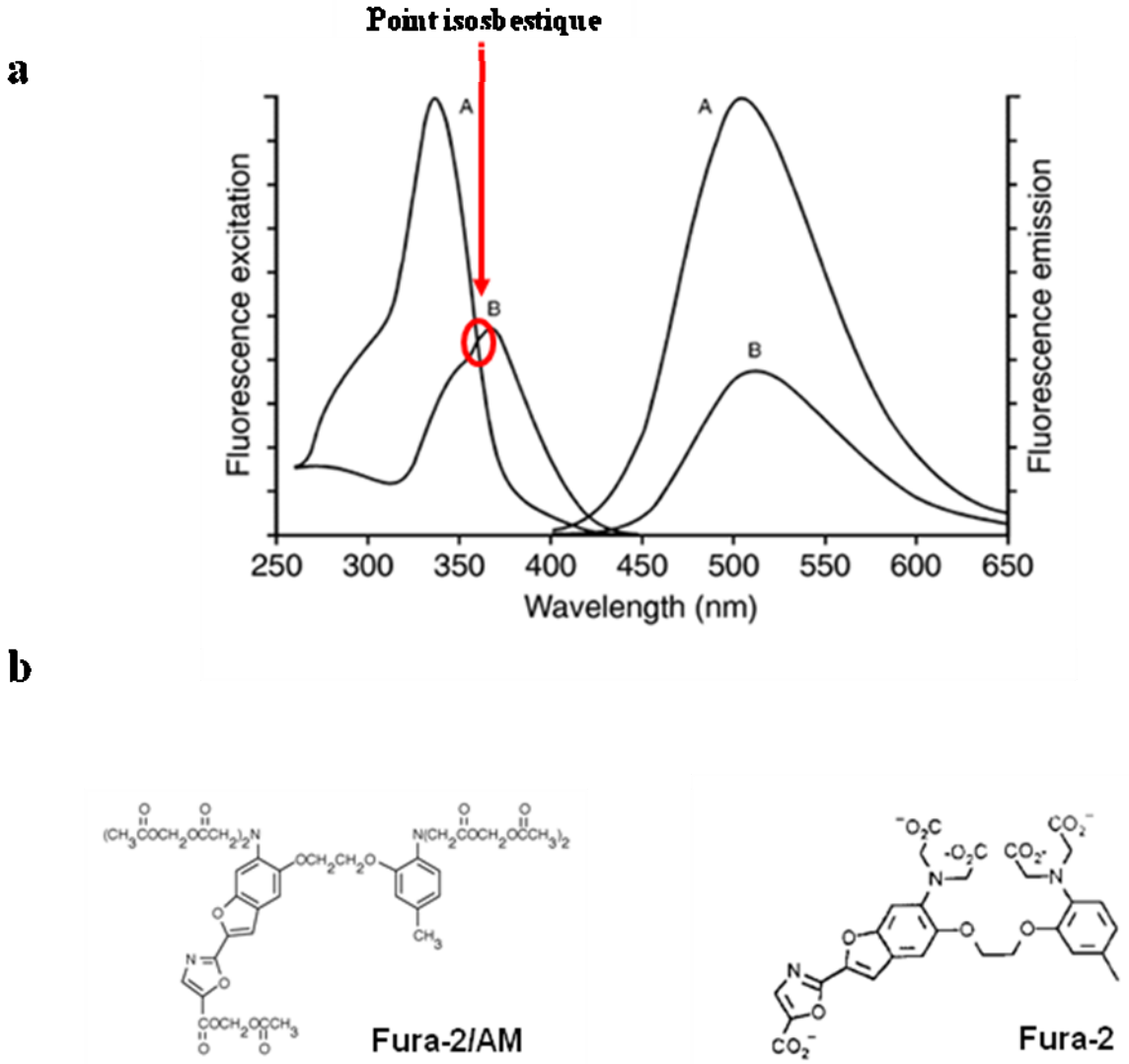


Figure MM°: La sonde calcique fura-2.
a) Spectre d'excitation et d'émission du fura-2. Le spectre A représente la sonde liée au calcium et le spectre B, la sonde libre. Le point isosbestique (360 nm) correspond au croisement des deux spectres d'excitation (modifiée d'après le site www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Pr...).
b) Structures chimiques de la sonde fura-2/AM et fura-2.

1.1. Principe

Le fura-2/AM (1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester) (Grynkiewicz et al., 1985) est une sonde calcique qui possède deux longueurs d'ondes d'excitations dépendantes de la concentration calcique: 340 nm (forme liée au calcium, A) et 380 nm (forme libre, B) et une longueur d'onde d'émission à 510 nm (Fig. MM7a). Elle est composée d'une partie fluorophore de type stylbène et d'une structure tétracarboxylée octocoordonnée caractéristique des molécules chélatrices de calcium comme l'EGTA et le BAPTA dont elle dérive (Fig. MM7b). L'excitation de la sonde à son point isosbestique, correspondant au croisement des deux longueurs d'ondes d'excitation à 360 nm, permet d'enregistrer la variation de fluorescence (à 510 nm) indépendante de la concentration intracellulaire de calcium (Fig. MM7a). Le manganèse (Mn^{2+}) est capable d'éteindre ('quencher') la fluorescence du fura-2. De plus, le manganèse a la capacité de traverser les canaux calciques soit en même temps que le calcium ou à la place du calcium. Lors d'une excitation du fura-2 à 360 nm, la diminution ou 'quenching' de la fluorescence par le manganèse peut alors être reliée à son entrée par les canaux cationiques. La mesure de la pente de diminution de fluorescence du fura-2 au point isosbestique, fonction de l'entrée de manganèse dans le cytoplasme, permet d'évaluer quantitativement l'influx cationique (Tutdibi et al., 1999).

1.2. Appareillage

L'appareillage est schématisé sur la figure MM8. La source lumineuse d'excitation est une lampe au xénon (ARC Lamp Power Supply, CAIRN) couplée à un monochromateur CAIRN (Cairn Research Limited, Faversham, U.K.). Ce monochromateur permet de sélectionner une longueur d'onde précise ainsi que la largeur de la bande passante. Pour exciter la sonde fura-2, la longueur d'onde choisie est 360 nm ± 10 nm, pour visualiser les cellules transfectées avec la GFP, la longueur d'onde est de 450 nm ± 10 nm. Cette lumière est transmise au microscope inversé Olympus IX70 le long d'une fibre optique. Elle traverse ensuite l'objectif à immersion à eau (x 40), pour atteindre l'échantillon. La fluorescence émise par l'échantillon est dirigée vers une caméra CCD (Photonic Science Limited, Robertsbridge, U.K.) qui a pour avantage d'enregistrer l'activité de plusieurs myotubes en même temps dans le champ du microscope. Les images sont transmises à l'ordinateur et sont traitées par le logiciel Imaging Workbench 5.2 (AIW 5.2) software (Indec BioSystems, Inc, Mountain View, CA, USA). Ce logiciel sert également à contrôler le monochromateur.

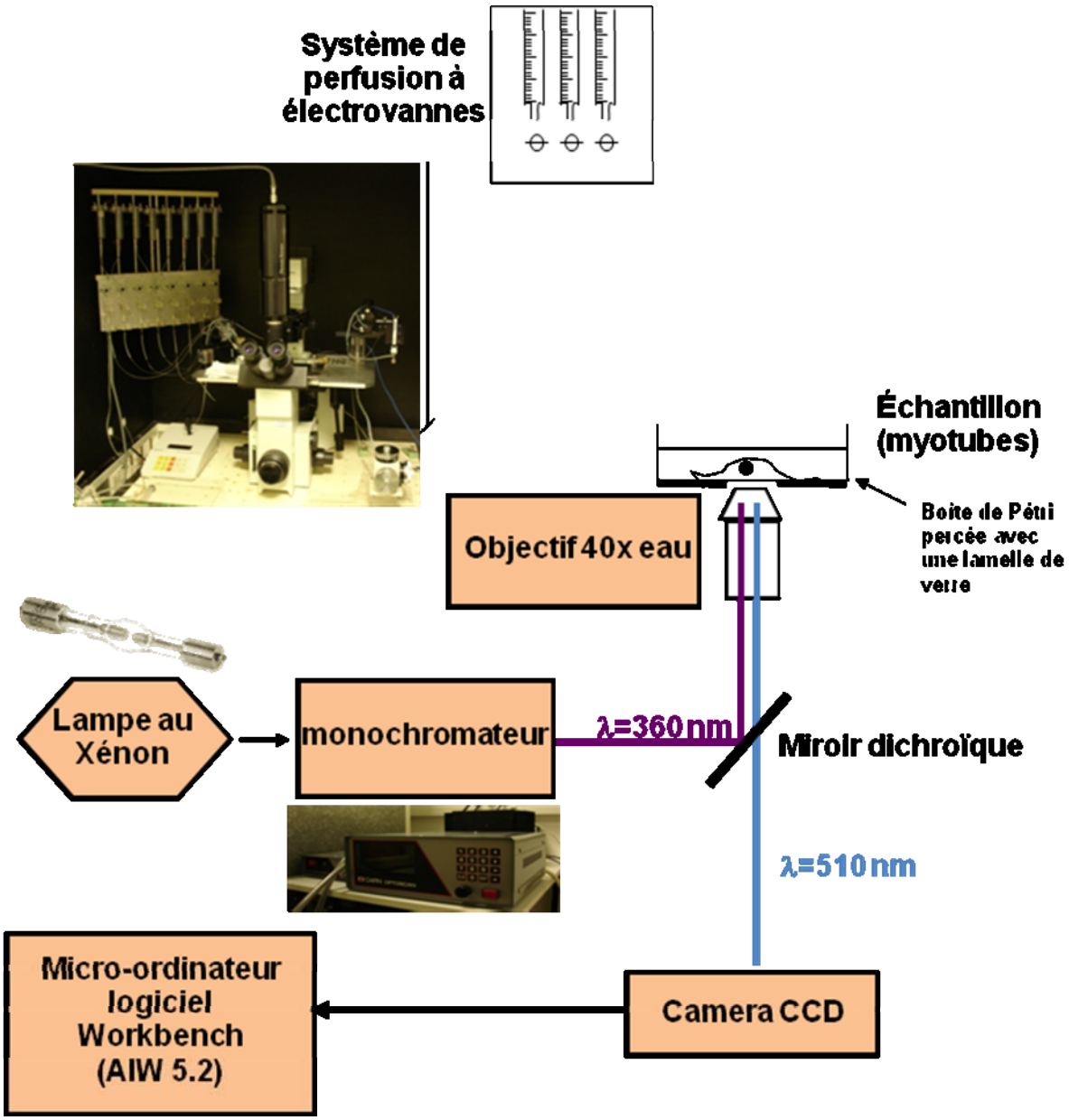


Figure MM8: Dispositif expérimental pour la mesure de la fluorescence du fura-2/AM.

1.3. Protocole expérimental

1.3.1. La charge des cellules

La sonde fura-2 est excitée dans les UV à 360 nm, or les UV sont absorbés par le plastique des boîtes de 35 mm, les cellules sont donc cultivées sur des lamelles de verre de 30 mm pour les mesures d'influx calcique. Après rinçages avec du milieu 1,8 mM Ca^{2+} (Fig. MM9), milieu de type Mac Even, les cellules sont incubées dans le milieu de charge 1,8 mM Ca^{2+}, contenant 3 µM de fura-2/AM (FluoProbes) pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La

charge à température ambiante permet d'éviter la compartimentalisation de la sonde. Le fura-2 est un anion polycarboxylé qui ne peut traverser la bicouche lipidique que sous sa forme non chargée et hydrophobe c'est-à-dire la forme AcétoxyMéthylester (AM). Une fois dans le milieu intracellulaire, la molécule sera clivée par des estérases endogènes qui vont libérer le fura-2 alors capable de se lier au calcium. C'est pourquoi les cellules sont ensuite incubées 15 min à 37 °C pour permettre une désestérification plus efficace de la sonde. Les cellules subissent d'autres rinçages avec le milieu 1,8 mM Ca^{2+} afin d'éliminer le fura-2 extracellulaire et la lamelle est installée sur un portoir en plexiglas adapté à la platine du microscope. Elles sont alors immergées dans le milieu dépourvu de calcium (Fig. MM9).

	Milieu 1,8 mM Ca^{2+}	Milieu 0 calcium	Milieu 1,8 mM Ca^{2+} + $MnCl_2$
NaCl (mM)	130	130	130
KCl (mM)	5,4	5,4	5,4
$CaCl_2$ (mM)	1,8	-	1,8
$MgCl_2$ (mM)	0.8	0,8	0,8
EGTA (mM)	-	0,1	0,1
HEPES (mM)	10	10	10
Glucose (mM)	5,6	5,6	5,6
$MnCl_2$			50 µM
pH (NaOH)	7,4	7,4	7,4
Osmolarité (mOsm)	300	300	300

Milieux utilisés pour vider les stocks intracellulaires:

- milieu 0 calcium
- milieu 0 calcium + 10 mM caféine + 5 µM CPA
- milieu 0 calcium + 15 µM CPA

Milieu utilisé pour visualiser l'influx:

- milieu 1,8 mM Ca^{2+} + 50 µM $MnCl_2$

Figure MM9: Milieux salins utilisés pour les mesures d'influx calciques.

1.3.2. Etude des variations du calcium après stimulation

Les variations transitoires du calcium sont enregistrées sur un champ de cellules. Des zones d'intérêt peuvent être délimitées sur les cellules à partir de l'image numérique obtenue après

excitation de la sonde à 360 nm. Les variations d'intensité de fluorescence seront alors mesurées et enregistrées dans ces zones délimitées (valeur moyenne des pixels de la zone considérée). La stimulation des cellules est réalisée à l'aide d'un système de perfusion par gravité (Fig. MM8). Ce système permet de changer rapidement le microenvironnement qui entoure les cellules d'intérêts. Les solutions testées sont placées dans des seringues fixées à un portoir placé en hauteur. Des tubulures acheminent les solutions vers un embout conique que nous plaçons à proximité des cellules. L'écoulement des solutions est commandé par des électrovannes, permettant de changer rapidement de milieu. Le débit (environ 10 µl/s) est continu afin d'éviter tout artefact provenant d'un changement de flux.

Afin d'étudier l'activité des SOCs, le RS est tout d'abord vidé en présence d'un milieu 0 calcium suivi de trois stimulations successives de caféine activant les RyR (10 mM caféine + 5 µM CPA), alternées par la perfusion de milieu 15 µM CPA (inhibiteur réversible de la SERCA). Après vidange des stocks calciques du RS, une solution 1,8 mM Ca^{2+} + 50 µM Mn^{2+} est administrée permettant alors une entrée de cations dans la cellule (Fig. MM9). S'en suit donc l'extinction du fura-2 par le Mn^{2+}. Plusieurs inhibiteurs des influx dépendants des réserves intracellulaires ont également été testés, le SKF-96365, le Gd^{3+} et la toxine GsMTx-4 pour valider la présence de ces influx.

1.3.3. Traitement des résultats

Les variations de fluorescence du fura-2 obtenues dans les régions d'intérêt peuvent être tracées sous Origin 5.0 (Originlab, Northampton, MA, USA) afin d'être analysées. L'intensité de fluorescence est alors exprimée en pourcentage de fluorescence par minute, en prenant comme base la moyenne des intensités précédant l'application de Mn^{2+} dans le milieu extracellulaire. La pente est ensuite calculée par régression linéaire. Les moyennes des pentes peuvent être représentées sous forme d'histogramme et peuvent être comparées entre chaque type cellulaire et entre chaque condition expérimentale grâce au t test de Student. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives quand $P<0.05$*, $P<0.01$** et $P<0.001$***.

2. La technique de patch-clamp

2.1. Principe

Inventé par Neher et Sakmann en 1976, le patch-clamp est la technique de référence permettant d'enregistrer l'activité électrique d'un fragment microscopique de membrane cellulaire. Cette activité électrique est générée par des canaux ioniques présents à la membrane. Chaque canal est traversé par un flux ionique élevé et génère un courant électrique. Ces canaux ne représentent qu'une faible partie des protéines cellulaires mais ils jouent un rôle essentiel dans la fonction de la cellule.

Cette technique consiste à faire transiter jusqu'à un amplificateur, à travers une électrode de verre (ou pipette de verre) remplie d'une solution conductrice et étroitement liée à une portion de la membrane cellulaire, les courants qui passent au travers de structures membranaires spécialisées dans le transport des ions. Le flux d'ions électrogène transitant entre le milieu intracellulaire et le milieu intrapipette est enregistré sous forme de courant électrique, par référence à une électrode plongée dans la solution ionique externe. Afin d'isoler un fragment de membrane, la pipette, manœuvrée à l'aide d'un micromanipulateur, est approchée de la surface d'une cellule, puis 'scellée' sur la membrane en imposant une dépression à l'intérieur du capillaire de verre par une aspiration douce de sorte à obtenir une évagination de la membrane à l'intérieur de la pipette. L'interaction entre les composants de la membrane cellulaire et le verre inerte de la pointe de la pipette, crée un scellement de haute résistance (de l'ordre du GΩ). Celui-ci est nécessaire afin d'amener la majeure partie des courants ioniques traversant la membrane, à transiter à travers la pipette jusqu'au système d'enregistrement. Cette configuration est appelée 'giga-seal'. La haute résistance d'un giga-seal réduit le bruit de fond qui masque le signal biologique recherché et permet d'imposer un potentiel donné (voltage-clamp) à une portion de la membrane isolée sous la pipette ou bien à la cellule entière. Deux paramètres fondamentaux sont contrôlés afin d'enregistrer l'activité d'une population de canaux dans des conditions donnés: le potentiel transmembranaire (correspondant à la différence de potentiel électrique entre la face interne et la face externe de la membrane plasmique) et la composition ionique des milieux intracellulaires ou extracellulaires.

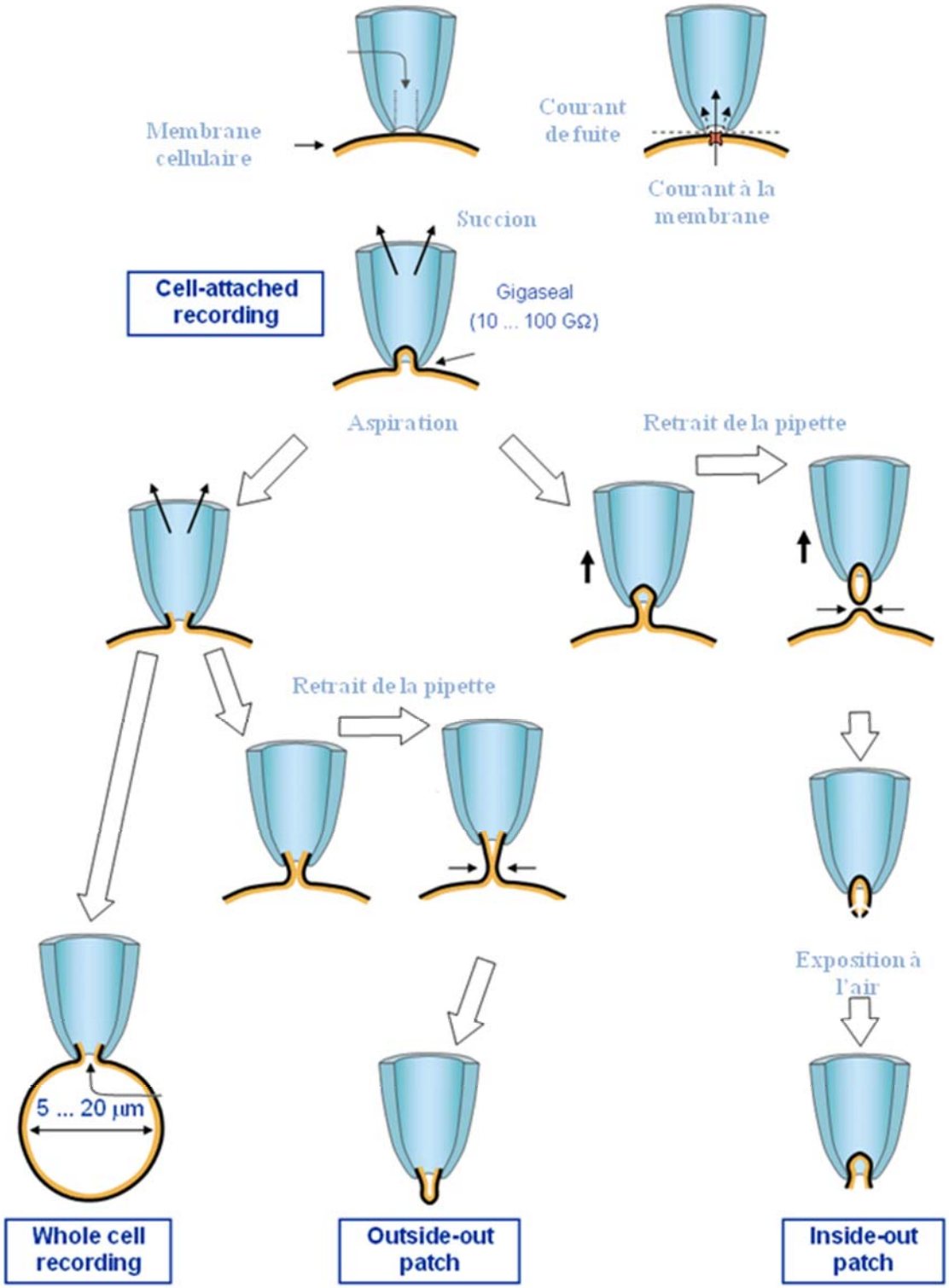


Figure MM10: Les différentes configurations du patch-clamp (modifiée d'après le site www.bem.fi/book/04/04x/0427x.htm).

Différentes configurations sont utilisées afin d'enregistrer soit des courants électriques unitaires provenant de l'activité d'un canal ionique individuel soit des courants macroscopiques provenant d'une population de canaux ioniques répartis sur toute la surface membranaire (Fig. MM10).

1. La configuration 'cell-attached' ou 'cellule-attachée' provient de l'arrangement de départ, dans lequel l'orifice de la pipette est scellé par formation d'un giga-seal sur une cellule intacte. Le milieu intracellulaire est préservé mais non contrôlé, et le potentiel de membrane est imposé à la surface de la membrane électriquement isolée sous la pointe de la pipette. C'est la configuration la plus physiologique car l'intégrité biologique de la cellule est conservée, ce qui en fait son intérêt majeur. Elle permet l'enregistrement de courant unitaire. Le potentiel imposé (Vi) correspond ainsi à la différence entre le potentiel à l'intérieur de la cellule (Vm) et celui à l'intérieur de la pipette (Vpip) soit Vi=Vm-Vpip.

2. La configuration «inside-out» est obtenue, après excision du fragment de membrane isolé sous la pipette en configuration cell-attached, par un léger retrait de la pipette. La face interne ou cytoplasmique se retrouve exposée au milieu ionique extracellulaire de composition déterminée, et le potentiel imposé à la portion de la membrane est alors l'opposé de celui de la pipette soit Vm=-Vpip. Elle permet l'enregistrement de courant unitaire.

3. La configuration «whole-cell» nous concerne plus particulièrement, puisque les enregistrements sont réalisés dans cette configuration. Elle est obtenue à partir de la configuration cell-attached par l'application d'une succion supplémentaire dans la pipette afin d'ouvrir le morceau de membrane situé sous la pipette, ce qui donne accès à l'intérieur de la cellule et aux courants globaux transitant à travers les canaux présents sur toute la surface membranaire. Dans ces conditions, le potentiel de la cellule correspond au potentiel imposé passant par la pipette soit Vi=Vpip. Donc, cette configuration, contrairement aux autres, permet d'enregistrer les courants ioniques transitant au niveau de l'ensemble de la membrane cellulaire. En se plaçant dans des conditions de potentiel approprié, il est possible d'isoler les courants traversant une population de canaux identiques en fixant la composition du milieu de façon à bloquer les autres types de canaux.

4. La configuration «outside-out» est obtenue à partir de la configuration whole-cell par éloignement de la pipette. Une portion de membrane est arrachée puis, en se rabattant, forme une vésicule membranaire qui referme l'orifice de la pipette en orientant sa face extracellulaire vers l'extérieur. Dans ce cas, le potentiel imposé est égal au potentiel de pipette soit Vm=Vpip. Elle permet aussi l'enregistrement de courant unitaire.

Les principaux éléments constituant le schéma électrique correspondant à la configuration whole-cell comprennent (Fig. MM11):

-Rs: résistance en série avec la résistance de la pipette représentent à elles deux la résistance d'accès. Les résistances série sont généralement faibles (3 à 10 MΩ pour une pipette de 2,5 MΩ par exemple).

-Rseal: résistance du seal (comprise entre 5 et 10 GΩ), c'est-à-dire du 'milieu' entre la face intérieure de la pipette et la portion de membrane collée à la paroi de la pipette de verre. Il est essentiel que celle-ci soit beaucoup plus grande que la résistance série afin que la grande majorité des courants circulant entre la pipette et le milieu extracellulaire passe à travers la membrane.

-Rm: résistance membranaire, est variable selon le type cellulaire étudié, le nombre de canaux présents et de leur conductance au repos.

-Cm: capacité membranaire en pF, varie également selon les dimensions de la cellule c'est à dire la surface membranaire.

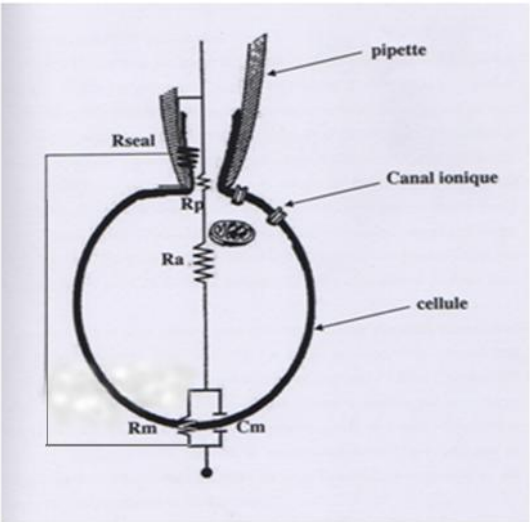


Figure MM11: Schéma du circuit électrique de la configuration cellule entière (thèse N. Imbert, 1995).
Rm et Cm: résistance et capacité membranaires.
Rp: résistance de la pipette.
Ra: résistance d'accès en série avec la membrane.
Rseal: résistance du seal.

2.2. Dispositif expérimental

2.2.1. Pipettes et portoir

Le verre choisi pour la confection des pipettes est un verre mou de type Micro Hématocrite Assistent (1,5 mm de diamètre extérieur, 1,16 mm d'épaisseur de paroi). L'étirage des pipettes s'effectue en 2 étapes avec une étireuse horizontale (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller). Le filament de Nichrome (Nickel-Chrome) chauffe la partie centrale du capillaire fixé à ses deux extrémités et le tube est étiré sur une distance de quelques mm, rétrécissant la partie centrale à un diamètre d'environ 200-300 µM. Un second étirage, à température plus faible, entraîne la rupture de la partie centrale du capillaire. Deux pipettes à la pointe de géométrie appropriée et de diamètre intérieur de 1 à 2 µM sont ainsi obtenues puis microforgées afin d'obtenir une forme de pointe idéale pour obtenir un giga-seal. Les pipettes sont alors remplies à l'aide d'un capillaire souple d'un milieu interne (intrapipette) conducteur, passé sur filtre millipore (diamètre des pores: 0,22 µM) afin d'éviter l'introduction d'impuretés venant gêner la formation du scellement. Après avoir ôté les bulles pouvant obstruer l'extrémité de la pointe, la pipette est placée dans le portoir, de façon à ce que le fil d'argent chloruré (Ag/AgCl) relié à la tête de l'amplificateur (Axopatch 200B, Axon Instruments), plonge dans le liquide conducteur. L'amplificateur constitue un convertisseur courant/tension, impose un potentiel à la membrane par l'intermédiaire de la pipette de patch, corrige le potentiel de jonction et permet d'appliquer des signaux tests (pour la mise en place du seal par exemple). Le potentiel de commande est ainsi appliqué entre l'intérieur de la pipette et l'électrode de référence (Ag/AgCl) plongée dans la solution saline externe. Le portoir de la pipette est également relié à un tube en U rempli de mercure, permettant d'appliquer des pressions positives ou négatives dans la pipette. La tête de l'amplificateur est fixée sur un micromanipulateur (Narishige) permettant une approche précise de la pipette. L'ensemble du dispositif de mesure, ainsi que le microscope inversé, sont disposés sur un socle reposant sur une table antivibratoire, et placés dans une cage de Faraday (Fig. MM12).

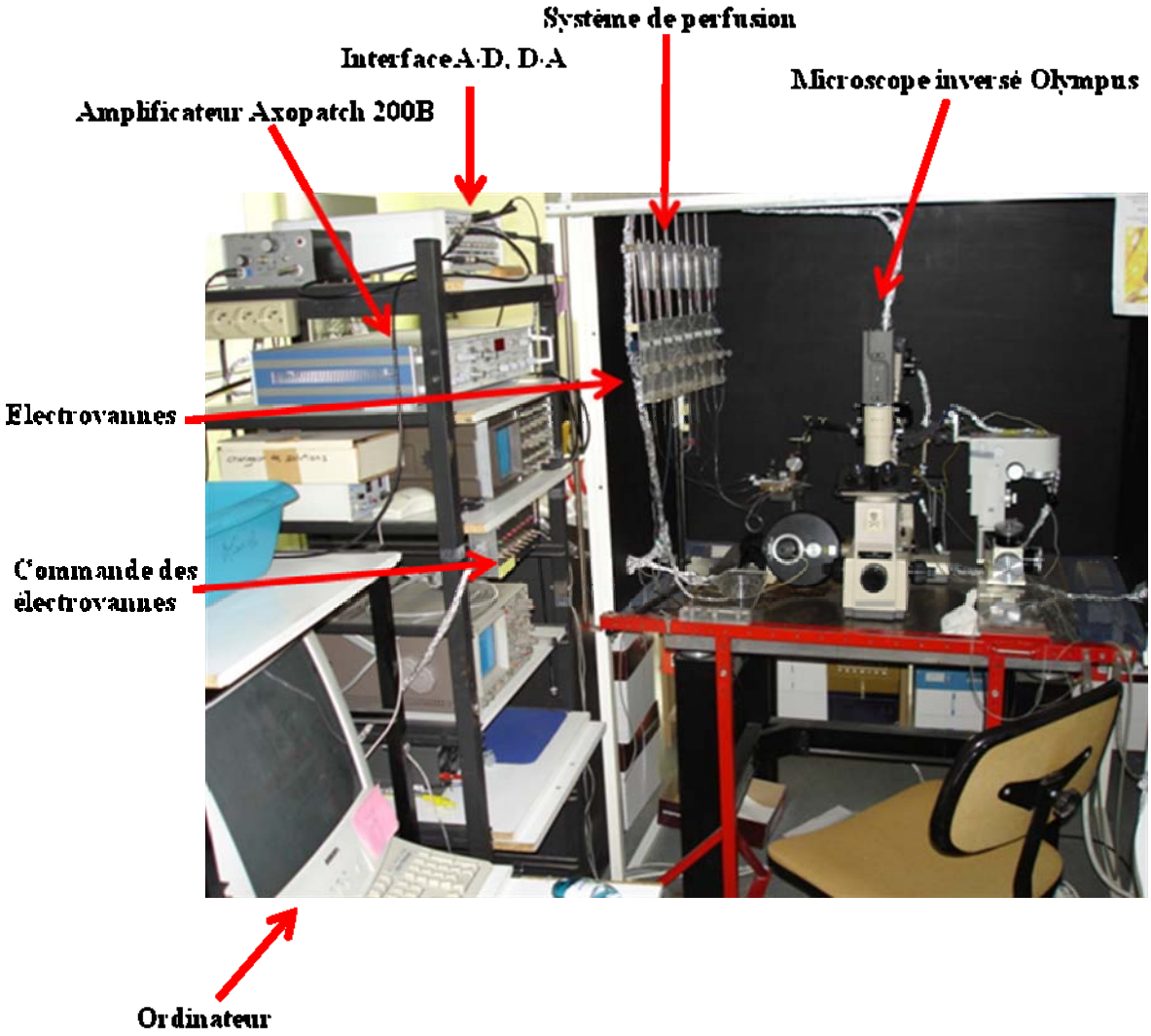


Figure MM12: Dispositif expérimental de patch-clamp.

2.2.2. Système de perfusion

Ce dispositif permet de changer rapidement la constitution du milieu autour d'un petit groupe de cellules, en approchant l'embout du système de perfusion près des cellules de façon à créer un microenvironnement (Fig. MM12). Cet embout est relié à plusieurs voies d'arrivées contenant les solutions extracellulaires. L'écoulement des solutions par gravité est commandé par des électrovannes.

2.2.3. Système de visualisation

L'observation des cellules lors de l'approche du système de perfusion et de la pipette de patch s'effectue grâce à un microscope inversé à visée binoculaire (Olympus IMT 2), en contraste de phase (Fig. MM12).

2.2.4. Système de mesure

Les signaux de courants provenant de l'amplificateur sont visualisés et transférés en temps réel sur un microordinateur de type IBM-PC compatible, muni d'un système d'exploitation Windows en passant par une carte de conversion A/D-D/A (DIGIDATA 1320A, Axon Instruments). Le logiciel p-clamp 8 permet de gérer l'ensemble du système. L'analyse et les représentations des résultats sont réalisées à l'aide du logiciel Origin 5.0.

2.2.5. Protocole expérimental: Whole-Cell Recording (WCR)

Après avoir rincé le milieu de culture par le milieu externe carencé en calcium, la boîte de pétri est fixée sur la platine du microscope. Une surpression est appliquée à la pipette, par l'intermédiaire du manomètre et du portoir, afin d'éviter que le milieu extracellulaire ne se mélange au milieu intrapipette, ou que les débris ne bouchent les extrémités. La pipette est plongée dans le milieu ionique externe à l'aide du micromanipulateur. Après avoir corrigé le potentiel de jonction, la résistance de la pipette est mesurée. Celle-ci doit être entre 2,5 et 5 MΩ. Le potentiel de jonction résulte de l'inégalité de la mobilité des différents ions des deux milieux intracellulaires et extracellulaires en contact. C'est pourquoi il doit être corrigé. Lorsque la pipette est ensuite amenée au contact de la membrane cellulaire, une diminution du courant est observée, traduisant une augmentation de la résistance d'accès due au contact avec la membrane cellulaire. Cette diminution de courant est accentuée après application d'une dépression supplémentaire, ce qui traduit l'augmentation de la résistance de seal et par conséquent l'installation du giga-seal (1 à 10 GΩ).

La valeur du potentiel imposé est fixée à -80 mV afin de placer le potentiel de la cellule à une valeur proche du potentiel de repos physiologique lorsque la membrane sera rompue sous la pointe de la pipette (Vi=Vpip). L'application d'une succion supplémentaire rompt la portion de membrane sous la pipette sans déstabiliser le seal. Une brusque augmentation des capacités est alors observée lors de la rupture grâce à l'enregistrement des courants capacitifs membranaires de la cellule entière. Les valeurs de capacités membranaires pour les myotubes sont supérieures ou égales à 100 pF. Si le seal n'est pas suffisant lors de la configuration cell-attached alors le passage en WCR peut s'accompagner d'une rupture du seal ou d'une augmentation du courant de fuite. Une fois le whole-cell atteint, le programme de stimulation peut être lancé. Dans notre cas, afin d'activer les SOCs, les stocks calciques du RS sont préalablement vidés par application d'une solution carencé calcium en présence de 1 µM thapsigargine (inhibiteur irréversible de la SERCA) pendant 3 min. Une fois le RS vidangé, une solution calcique est alors administrée dans le milieu extracellulaire et le calcium va alors

passer à travers les canaux SOCs dont l'ouverture a été provoquée par la déplétion en calcium des réserves intracellulaires. La mesure du potentiel membranaire a été réalisée en condition de repos mais également après vidange calcique du RS.

2.2.6. Milieux ioniques pour la mesure des SOCs

La composition des différents milieux est indiquée dans la figure MM13a.

a

	Milieu extracellulaire 2,5 mM Ca^{2+}	Milieu extracellulaire carencé en calcium	Milieu intracellulaire
TEACl (mM)	135	135	-
CsCl (mM)	-	-	145
$CaCl_2$ (mM)	2,5	-	0.005
$MgCl_2$ (mM)	0,8	3,3	1
EGTA (mM)	-	-	1
HEPES (mM)	10	10	10
Glucose (mM)	5,6	5,6	5,6
pH (NaOH)	7,4 (avec TEAOH ou Tris Base)	7,4 (avec TEAOH ou Tris Base)	7,2 (avec Tris Base)
Osmolarité (mOsm)	300	300	280

b

	Milieu extracellulaire 1,8 mM Ca^{2+}	Milieu intracellulaire
NaCl (mM)	130	-
KCl (mM)	5,4	140
$CaCl_2$ (mM)	1,8	0.005
$MgCl_2$ (mM)	0,8	1
EGTA (mM)	-	1
HEPES (mM)	10	10
Glucose (mM)	5,6	5,6
pH (NaOH)	7,4 (avec NaOH)	7,2 (avec KOH)
Osmolarité (mOsm)	300	280

Figure MM13: Milieux salins utilisés pour les mesures d'influx calciques et de potentiel de membrane par la technique de patch-clamp.

- L'absence d'ions Na^+ dans les milieux externes permet d'écarter l'intervention des courants sodiques rapides. Ceux-ci sont remplacés en quantité équimolaire par les ions TEA qui bloquent les conductances potassiques «TEA-sensibles» (conductance de type BK et conductance potassique retardée).
- Dans le milieu intrapipette, les ions Cs^+ se substituent aux ions K^+ intracellulaires afin de réduire le transport d'ions aux travers des canaux potassiques.
- Le calcium intracellulaire est ajusté à une valeur de repos grâce à un chélateur, l'EGTA (EthyleneGlycol-$_{bis}$ (β aminoethylether)-N-N' TetraAcetic acid). La concentration d'EGTA doit être suffisante pour maintenir la concentration calcique interne au repos, au dessous du seuil d'activation de la contraction, mais pas trop importante pour que l'augmentation de calcium lors de la vidange calcique du RS, déclenche l'activation des SOCs.
- Les pH interne et externe sont maintenus autour des valeurs respectives de 7,2 et 7,4 par un tampon HEPES, puis, ajustés suivant les milieux avec les bases TEAOH, KOH, Tris Base.
- Les milieux internes et externes contiennent du glucose afin de préserver le métabolisme cellulaire.

2.2.7. Milieux ioniques pour la mesure du potentiel de membrane

La composition des différents milieux est indiquée dans la figure MM13b.

D. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction d'un vecteur plasmidique

La préparation d'ADN plasmidique à partir de bactéries est l'une des techniques les plus courantes de la biologie moléculaire, également connue sous les noms de minipréparation, midipréparation et maxipréparation en fonction du volume de la culture bactérienne utilisée. Le principe de l'extraction est connu sous le nom de lyse alcaline. Cette méthode permet de préparer sélectivement l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien

1.1. Minipréparation de l'ADN plasmidique à l'aide d'un kit Promega

Les bactéries transformées (processus de transfert génétique au cours duquel de l'ADN en solution est introduit dans une bactérie réceptrice, puis intégré au chromosome) sont mises en culture sous agitation dans 10 ml de milieu LB (Luria Broth: Bactotryptone 10 g; Bacto yeast extract 5 g; NaCl 10 g; pH 7 avec NaOH) contenant l'antibiotique de sélection, pendant 12 à 20 heures à 37 °C (en général une nuit). Nous avons utilisé le kit Wisard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega) pour la minipréparation de l'ADN plasmidique. Cette méthode dérive de la lyse alcaline. Une fois la culture amplifiée, une centrifugation de 5 min à 14000 rpm est réalisée afin de culotter les bactéries. Après avoir ôté le surnageant, le culot bactérien est resuspendu dans 250 µl de solution de resuspension. 250 µl de solution de lyse sont ajoutés puis mélangés délicatement afin de lyser la paroi des bactéries et de libérer le matériel biologique (ADN bactérien, ADN génomique et les protéines bactériennes) pendant 5 min à température ambiante. Une solution avec des protéases alcalines (10 µl) est additionnée pendant 5 min à température ambiante afin de précipiter l'ADN et les protéines bactériennes. 350 µl de solution de neutralisation sont ajoutés afin de stopper la lyse bactérienne. Cette neutralisation entraîne un rappariement rapide de l'ADN plasmidique. Ce mélange est par la suite centrifugé à 14000 rpm pendant 10 min afin d'éliminer les résidus. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est prélevé puis transféré sur une colonne de purification contenant une résine échangeuse d'anion qui fixe l'ADN en solution. Il subit alors plusieurs étapes de centrifugation et de lavages pour une pureté optimale. L'ADN plasmidique est enfin élué dans 100 µl d'eau stérile dépourvue de nucléase. Le plasmide est alors stocké à -20 °C.

1.2. Maxipréparation de l'ADN plasmidique à l'aide d'un kit Qiagen

Les maxipréparations sont réalisées dans le but de disposer d'une quantité importante d'ADN plasmidique. Les bactéries contenant le plasmide recombinant sont mises en culture une nuit sous agitation dans 100 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié. La maxipréparation est réalisée avec le kit Maxiprep de Qiagen (France). La culture bactérienne est centrifugée à 6000 g pendant 15 min à 4 °C. Le culot bactérien est repris dans 10 ml de solution de resuspension P1 (Tris HCl 50 mM, pH 8; EDTA 10 mM; RNase A: 100 µg/ml). Les bactéries sont ensuite lysées dans 10 ml de solution de lyse P2 (NaOH 200 mM; 1 % SDS) pendant 5 min à température ambiante. Le lysat alors apparaît visqueux. Lors de l'addition de 10 ml d'une solution de neutralisation P3 (acétate de potassium 3 M, pH 5,5) sur

glace et pendant 20 min, l'ADN génomique, les protéines et les débris cellulaires sont précipités puis l'ensemble est centrifugé à 20 000 g pendant 30 min. Le surnageant contenant uniquement l'ADN plasmidique est chargé sur une colonne échangeuse d'anions Qiagen-tip 500, préalablement équilibrée avec 10 ml de tampon d'équilibration QBT (NaCl 750 mM; MOPS (MOrpholinePropaneSulfonic acid) 50 mM, pH 7; isopropanol 15 %; Triton X-100 0,15 %). La taille des pores (100 µm), la haute densité des groupements échangeurs d'anions ainsi qu'une force ionique croissante réalisent cette purification. Après passage du surnageant par gravité dans la résine, la colonne est lavée deux fois avec 30 ml de solution de lavage QC (NaCl 1 M; MOPS 50 mM, pH 7; isopropanol 15 %). L'ADN est ensuite élué avec 15 ml de solution d'élution QF (NaCl 1,25 M; Tris HCl 50 mM, pH 8,5; isopropanol 15 %) dans un flacon de 50 ml. L'ADN plasmidique est alors précipité avec 10,5 ml d'isopropanol puis centrifugé pendant 30 min à 15 000 g à 4 °C. Le culot contenant l'ADN est lavé avec 5 ml d'éthanol 70 %, puis centrifugé pendant 10 min à 15000 g. Le culot obtenu est séché puis repris dans 1 ml d'eau stérile. L'ADN est dosé par spectrophotométrie et sa qualité est évaluée par migration en gel d'agarose.

1.3. Digestion enzymatique des plasmides et analyse sur gel

Pour s'assurer de la présence de l'insert dans les plasmides et de la taille correcte de cet insert, 2 µl de plasmide sont digérés par 1 ou 2 enzyme(s)de restriction appropriée(s) (0,5 µl) en présence du tampon de restriction adéquate (Promega) dans un volume réactionnel complété à 10 µl avec de l'eau stérile. La digestion enzymatique se fait pendant 1 à 3 h à 37 °C au bain-marie. Les produits de digestion sont analysés sur gel d'agarose 1 à 2 % (selon la taille du plasmide) en présence de Bromure d'EThidium (BET). Celui-ci s'intercale entre les doubles brins d'ADN et permet la visualisation de l'ADN sous UV. L'ADN est chargé grâce à 2 µl de tampon de charge 6X (0,25 % bleu de bromophénol; 0,25 % xylène cyanol; 15 % Ficoll (Type 400; Pharmacia) dans eau désionisée) puis l'ensemble est déposé dans les puits du gel d'agarose. La migration s'effectue dans du tampon TAE 0,5 X (Tris Base 20 mM; Acide acétique 10 mM; EDTA 0,5 mM) à 100 V pendant 10 à 30 min. Les plus gros fragments migrent moins vite que les petits. Si le plasmide contient l'insert d'intérêt, deux bandes sont observées après visualisation du gel aux UV: une bande correspondant au vecteur plasmidique vide et une bande de la taille attendue pour l'insert. La taille des fragments est évaluée à l'aide du marqueur de taille ADN de phage λ coupé par Hind III (fragments de tailles comprises entre 125 et 23130 pb).

2. La RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction) quantitative

2.1. Principe

La RT-PCR comporte deux étapes distinctes: la transcription inverse des ARN totaux (obtenus après extraction) en ADNc et l'amplification de l'ADNc du ou des gène(s) d'intérêt et du gène de référence par PCR. La quantification de l'amplification se fait par détection d'un signal fluorescent qui est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé. La fluorescence est mesurée à chaque cycle de la PCR, permettant de suivre l'amplification en temps réel. La technique utilisée ici est basée sur l'utilisation de deux amorces (sens et anti-sens) spécifiques pour l'amplification de l'ADNc des gènes d'intérêt ainsi que d'un agent intercalant fluorescent (Fig. MM14). La PCR est une répétition de 40 cycles comportant deux étapes de transition de température. L'ADN polymérase (AmpliTaq Gold® Polymerase, Applied Biosystems) doit être au préalable activé à 95 °C pendant 10 min pour obtenir un ADN double brin. La première étape de dénaturation permet d'obtenir des ADN linéaires simple brin (95 °C, 15 s). La deuxième étape dite d'hybridation et d'élongation permet l'hybridation des amorces sens et anti-sens (60 °C, 1 min) suivie de la liaison du SYBR® Green (Applied Biosystems) sur l'ADN double brin. Le SYBR® Green est un agent intercalant fluorescent qui ne se lie qu'à l'ADN double brin. Lorsque le SYBR® Green est lié à l'ADN double brin, sa fluorescence augmente fortement. Dans le cadre de la PCR en temps réel, nous l'utilisons donc pour mesurer la quantité d'ADN double brin produite au cours de la réaction. Grâce à sa très grande stabilité, il permet d'effectuer un grand nombre de cycles sans dégradation de la fluorescence émise.

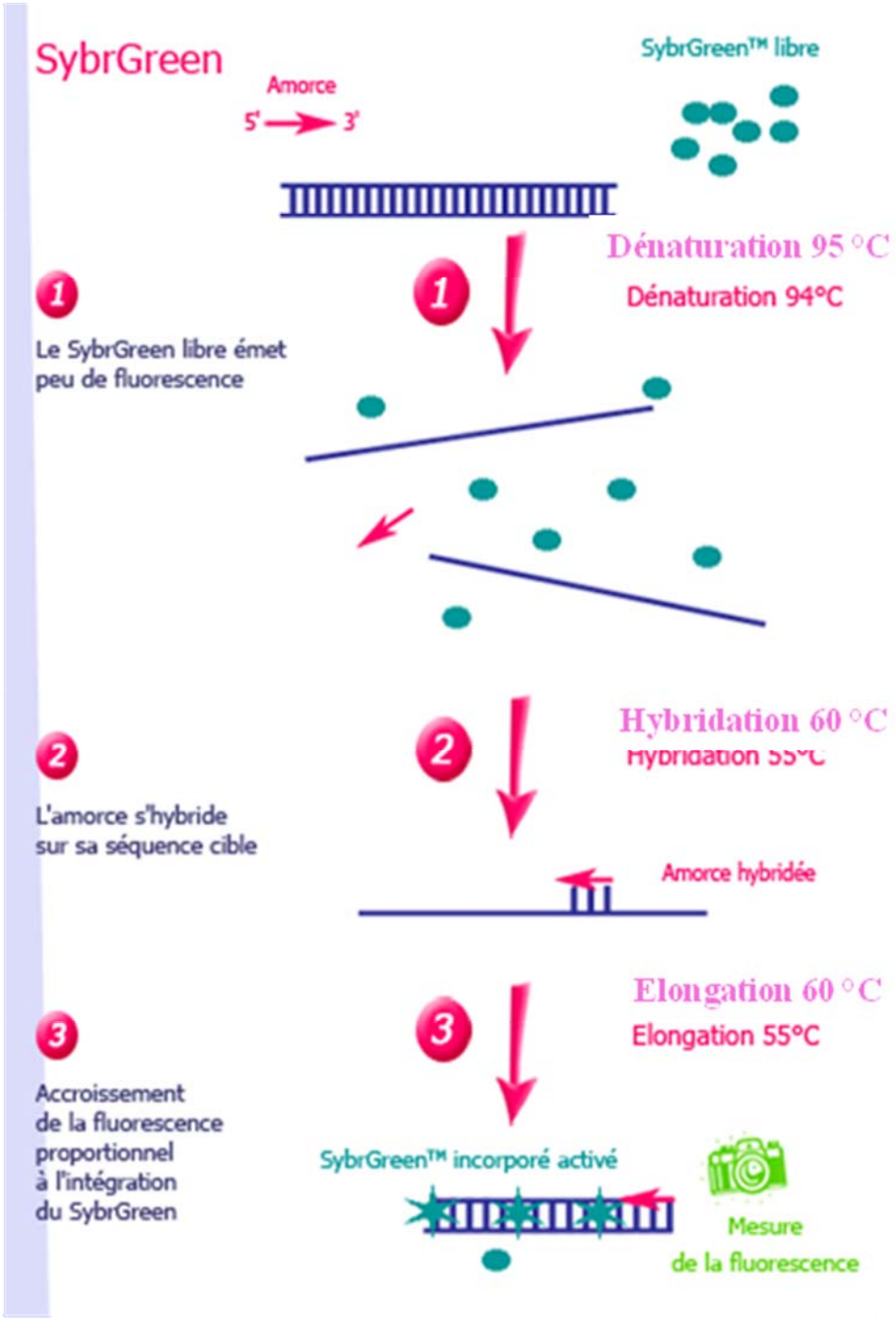


Figure MM14: Les différentes étapes de la PCR quantitative (modifiée d'après le site www.ilm.pf/files/u1/SybrGreen6.jpg).

2.2. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits de tissus ou de cellules en culture. Les myotubes subissent trois rinçages consécutifs au TBS 1X (Tris Buffered Saline: Tris Base 200 mM; NaCl 1,54 M; $MgCl_2$ 20 mM; EGTA 20 mM, pH 7,4) dans leurs boîtes de culture puis sont lysés par grattage dans un tampon d'extraction d'ARN totaux appelé RNAble, contenant du phénol qui

contribue à la lyse des cellules et à la dégradation des protéines (Eurobio). Un volume de 100 µl de chloroforme pour 500 µl de RNAble est ajouté sur l'échantillon puis l'ensemble est agité vigoureusement puis incubé dans la glace pendant 5 min. L'incubation est suivie d'une centrifugation à 14000 rpm à 4 °C pendant 15 min afin d'obtenir une phase supérieure aqueuse et incolore contenant les ARN totaux. La phase inférieure dite organique contient les protéines et débris cellulaires. La phase aqueuse est alors récupérée et un volume équivalent d'isopropanol 100 % y est ajouté (précipitation des ARN totaux). Après une incubation de 15 min sur glace, l'ensemble est centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 min à 4 °C afin de culotter les ARN totaux. Ce culot est lavé avec de l'éthanol 75 % puis séché avant d'être élué dans de l'eau désionisée stérile (10 µl). L'extraction des ARN totaux est ensuite vérifiée par migration en gel d'agarose.

2.3. Transcription inverse: obtention d'ADNc simple brin

La transcription inverse (ou reverse transcription) se fait à partir des ARN totaux précédemment extraits. La technique appliquée est basée sur l'utilisation d'hexamères nucléotidiques aléatoires qui vont se fixer de manière aléatoire sur l'ARN afin d'amorcer la synthèse du brin d'ADNc. Après redissolution des ARN totaux (5 min à 65 °C), 12 µl de pré-Mix sont ajoutés à 10 µl de solution d'ARN. Le pré-Mix est composé de 5 µl de tampon 5 X (Tris HCl 250 nM, pH 8,3; KCl 375 mM; $MgCl_2$, Gibco), de 2,5 µl de DTT (DiThioTheritol 100 mM, Gibco), de 1 µl de dNTP (désoxyNucléotideTriPhosphate 25 mM, Boeringher), de 1,5 µl d'hexamères nucléotidiques (1600 ng/µl, Pharmacia) et eau désionisée qsp 12 µl. Les ARN totaux et le pré-Mix sont incubés 2 min à 65 °C puis sont refroidis sur glace. Une fois les tubes refroidis, 1 µl de RNAsine à 40 U/µl (inhibiteur de RNAse) et 2 µl de M-MLV (Reverse transcriptase, Moloney-Murine Leukemia Virus) à 200 U/µl sont ajoutés au mélange. La synthèse des ADNc se fait pendant 1 h au bain-marie à 37 °C. A la fin de la réaction, 125 µl d'eau désionisée stérile sont ajoutés puis l'ensemble est incubé 2 min à 100 °C afin de détruire les enzymes et de casser les hybrides ARN/ADNc. Les ADNc peuvent être conservés à -20 °C.

2.4. La PCR quantitative en temps réel

La réaction d'amplification se fait sur plaques 96 puits. La quantité de produit amplifié à chaque cycle se fait par détection de fluorescence grâce à un appareil ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Le volume final de mélange réactionnel est de 15 µl par puits comprenant 10 µl de Mix et 5 µl d'ADNc. Le Mix est préparé pour chaque

ADNc à amplifier car il contient les amorces spécifiques pour chaque gène d'intérêt: 7,5 µl de Master Mix 2 X Power SYBR® Green; 0, 675 µl d'amorce sens (900 nM); 0, 675 µl d'amorce anti-sens (900 nM) et eau désionisée qsp 10 µl. Le Master Mix contient l'agent intercalant, la Taq polymérase, le tampon de l'enzyme, les bases libres et un catalyseur. Ce Mix est reparti dans chaque puits de la plaque auxquels sont ajoutés 5 µl d'échantillon d'ADNc.

Gène d'intérêt PLCβ1
Amorce sens: 5'-CGG-AGC-TGG-AGC-AAG-AAT-AC-3'
Amorce anti-sens: 5'-TCA-CCT-TTG-CAG-CAT-CTG-AG-3'

Gène d'intérêt PLCγ1
Amorce sens: 5'-GAC-TCA-CTG-GAG-AAC-TGG-TC-3'
Amorce anti-sens: 5'-CCC-TTT-CTG-AGT-TCC-AGC-AG-3'

Gène de référence α-tubuline
Amorce sens: 5'-ACC-TGG-AAC-CCA-CGG-TCA-T-3'
Amorce anti-sens: 5'-AGC-TGC-TCA-GGG-TGG-AAG-AG-3'

2.5. Analyse des résultats

L'efficacité de PCR est calculée grâce à une gamme d'étalonnage. Les échantillons de cette gamme sont de concentration initiale en ADNc croissante et connue. Le Ct (Cycle threshold) est déterminé pour chacun des échantillons de la gamme et correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence émise soit significative par rapport au bruit de fond. Une PCR est acceptable si l'efficacité de PCR est d'au moins 95 %.
Afin de s'affranchir de la variabilité de la quantité d'ADNc d'un échantillon à un autre, les valeurs d'ADNc sont exprimées en valeur relative. La normalisation du gène d'intérêt se fait par rapport à un gène endogène de référence, l'α-tubuline, dont l'expression reste constante. La normalisation se fait par le rapport Ct gène d'intérêt/Ct gène de référence. Ce calcul est effectué pour chacune des conditions et chacun des gènes d'intérêt de la PCR. Une analyse statistique à l'aide du t test de Student est ensuite effectuée sur ces valeurs relatives pour chaque condition.

E. Techniques de biochimie

1. Lysat cellulaire

Les myotubes à F+4 pour les lignées et les myotubes à F+6 pour les cultures primaires subissent trois rinçages consécutifs au TBS 1X (Tris Base 200 mM; NaCl 1,54 M; $MgCl_2$ 20 mM; EGTA 20 mM, pH 7,4) dans leurs boîtes de culture puis sont lysés par du tampon de lyse appelé RIPA pour RadioImmunoPrecipitation Assay (Tris HCl 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; NP-40 0,05 %; DOC 1 %; Triton X-100 1 %; SDS 0,1 %, pH 7,4) mélangé avec 1 % d'un Cocktail d'Inhibiteurs de Protéases (CIP: PMSF 1 µM; leupeptine 20 µM; aprotinine 0,8 µM et pepstatine 10 µM). Pour la lyse cellulaire de tissus, les muscles de la patte postérieure de la souris sont prélevés puis rincés dans du PBS à 37 °C. Ils sont ensuite broyés directement dans le tampon de lyse supplémenté avec le CIP. Les protéines sont alors récupérées dans un tube à l'aide d'un racloir et une dissociation mécanique est effectuée par plusieurs passages au travers d'une aiguille à insuline. Le lysat, bien homogénéisé, est par la suite centrifugé 5 min à 14 000 rpm afin d'éliminer les débris cellulaires. La quantité totale de protéines est mesurée par le Kit Biorad DC protein assay basé sur le principe de la méthode colorimétrique de Lowry. Ce lysat cellulaire peut être utilisé directement pour réaliser des ImmunoPrécipitations (IP), des coimmunoprécipitations (Co-IP), des Western Blots (WB), des GST Pull-down ou alors peut être conservé à -80°C.

2. Immunoprécipitation et coimmunoprécipitation

L'immunoprécipitation est une méthode immunochimique traditionnelle employée ici dans la purification des protéines.

Pour cela, 3 volumes de tampon NET (Tris Base 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM; NP-40 0,05 %, pH 7,4) sont ajoutés aux 200 µl de lysat cellulaire. Ce tampon est utilisé afin de diluer les détergents présents dans le RIPA. Afin de précipiter nos protéines d'intérêts, ces 800 µl d'échantillon sont incubés toute une nuit sous agitation à 4 °C avec 2 µg d'anticorps primaires spécifiques des protéines d'intérêt. Pour récupérer le complexe protéine-anticorps, 40 µl de billes de protéine G-sépharose (Amersham Pharmacia Biotech) pour les anticorps monoclonaux ou de billes de protéine A-sépharose (Amersham Pharmacia Biotech) pour les anticorps polyclonaux sont incubés avec le lysat cellulaire pendant une heure à 4 °C. Les protéines alors complexées aux billes, sont lavées 3 fois par du tampon NET froid puis dénaturées dans du tampon de Laëmmli 2X (Tris Hcl 0,38 g; SDS 10 % 11,5 ml; β-

mercaptoéthanol 5 % (p/v) 2,5 ml; Glycérol 7,5 ml; bleu de bromophénol 0,1 % (p/v) 0,5 ml et eau désionisée qsp 50 ml, pH 6,8) pendant 5 à 10 min à 90 °C. Le succès de l'immunoprécipitation dépend de l'affinité de l'anticorps primaire pour la protéine d'intérêt ainsi que pour les protéines A ou G. Les protéines sont séparées en gel SDS-PAGE, et les protéines immunoprécipitées ou coimmunoprécipitées sont mises en évidence par western blot à l'aide d'un anticorps approprié.

3. Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse permet la séparation de protéines en fonction de leurs poids moléculaires. C'est la migration de particules chargées négativement placées sous l'influence d'un champ électrique à travers un gel de polyacrylamide, en présence de Sodium DodécylSulfate. Nous parlons alors de SDS-PAGE pour SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

3.1. Préparation du gel coulé

Le gel de polyacrylamide est un gel réticulé obtenu après polymérisation de monomères d'acrylamide en présence d'une petite quantité de bisacrylamide. Le bisacrylamide est l'équivalent de deux monomères d'acrylamide liés par un groupement méthyl et est utilisé comme agent pontant. La réaction de polymérisation est catalysée par le TEMED (TEtraMEthyl-1-,2-Diaminométhane) et est initiée par le PerSulfate d'Ammonium (PSA) 10 %. Les gels de polyacrylamide peuvent varier en composition d'acrylamide et de bisacrylamide. En fonction des différents taux de ces deux substances, nous obtenons différents maillages et donc différentes densités de gel (Fig. MM15). Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée, et plus les mailles du réseau sont serrées. En conséquence, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les protéines volumineuses peuvent migrer. Par exemple, pour visualiser TRPC1 (90 kDa), un gel de séparation de 10 % est utilisé alors que pour l'α1-syntrophine (59 kDa), un gel de 12 % est utilisé.

Le système comprend deux gels différents coulés entre deux plaques de verres espacées d'un mm: le gel de concentration puis le gel de séparation. Le gel de concentration, comme son nom l'indique, permet d'obtenir des bandes extrêmement fines de protéines qui se concentrent à un endroit donné, ce qui permet de déposer un volume relativement grand sans perte de résolution. Le gel de séparation permet de différencier les protéines lors de la migration grâce à leurs poids moléculaires. Le passage d'un gel à l'autre requière une augmentation de pH et une augmentation de la concentration en acrylamide/bisacrylamide.

Gel de séparation

Pour 6 ml	7 %	9 %	10 %	12 %
Acryl/Bis* 40 % (ml)	1.05	1.35	1.5	1.8
Tampon Hcl 1M, pH 8,8 (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5
H_2O (ml)	3.45	3.15	3	2.7
TEMED (µl)	3	3	3	3
PSA 10 % (µl)	30	30	30	30

*Acrylamide/Bisacrylamide

Gel de concentration

Pour 4 ml	4 %	7 %
Acryl/Bis 40 % (ml)	0,6	1.05
Tampon Hcl 1M, pH 6,8 (ml)	1	1
H_2O (ml)	2.4	1.95
TEMED (µl)	2	2
PSA 10 % (µl)	20	20

Figure MM15: Composition des différents gels de polyacrylamide.

3.2. Préparation du gel pré-coulé

Le système utilisé est un système de gel de polyacrylamide pré-coulé horizontal GeBaGel® conçu spécialement pour la migration de protéines. Ces gels 10 %, 12 % ou 4 %/12 % sont très simples d'utilisation et fonctionnent avec les mêmes tampons que les gels qu'il faut couler. La migration se fait généralement de 1 à 2 h à 160 V. Après migration, les protéines seront transférées sur une membrane de nitrocellulose par la méthode classique de western blot.

3.3. Dépôts et migration

Les lysats protéiques et les immunoprécipitations sont mélangés à un égal volume de tampon de dénaturation 2X (ou tampon de Laëmmli) puis dénaturés pendant 5 à 10 min à 90 °C avant d'être déposés dans les puits du gel. La migration s'effectue entre 1 à 3 h selon la taille de la protéine à 110 V dans un tampon de migration appelé Running Buffer 1X (Tris Base 25 mM; Glycine 192 mM; SDS 10 %; eau désionisée qsp, pH entre 8,2 et 8,5 sans NaOH). Le tampon de migration est une solution d'électrolytes qui permet aux anions de se déplacer vers l'anode et inversement aux cations de se déplacer vers la cathode. Les protéines sont chargées négativement grâce au SDS donc elles se dirigeront vers l'anode. La progression de la migration peut être suivie en direct grâce à un marqueur de taille coloré (Rainbow ™ protein molecular weight marker, Amersham). Le bleu de bromophénol présent dans le tampon de charge n'est absolument pas ralenti et indique le front de migration électrophorétique.

4. Western blot

4.1. Electrotransfert

Les protéines séparées par électrophorèse en présence de SDS sont transférées sur un support immobilisant, la membrane de nitrocellulose de 0,22 µM (Protran BA 85 Nitrocellulose, Whatman®). Le gel d'acrylamide est placé sur la membrane de nitrocellulose immergée dans un tampon de transfert (Running Buffer 1 X 10 %; méthanol 10 %; SDS 1 %). Un sandwich est alors formé, comportant du pôle positif au pôle négatif: une plaque de mousse, une feuille de papier Whatman (Whatman®), la membrane de nitrocellulose, le gel, une feuille de papier Whatman et une plaque de mousse. Le principe du transfert sur la membrane est le même que l'électrophorèse. Les protéines, après séparation, sont toujours entourées de SDS donc elles vont migrer de la cathode vers l'anode sous l'influence d'un champ électrique de 35 V pendant 1 à 2 h dans un dispositif Miniprotean III® (Biorad). Le méthanol présent dans le tampon de transfert, est un solvant polaire qui 'active' le gel en enlevant le SDS des protéines et en augmentant la liaison des protéines à la membrane. Le succès du transfert peut être évalué à l'aide d'un colorant spécifique des protéines qui est le rouge ponceau.

4.2. Détection immunologique des protéines

Après l'électrotransfert, la feuille de nitrocellulose est lavée trois fois au TBS 1X (Tris Base 20 mM; 150 mM NaCl) Tween-20 0,2 % (v/v) à 1 % BSA (Bovin Serum Albumin) puis incubée une heure sous agitation dans une solution de saturation contenant le même tampon

additionné de 2 % BSA et 5 % lait écrémé. La BSA et le lait sont des protéines inertes permettant de bloquer les sites aspécifiques. Cette étape est très importante car c'est elle qui assure la spécificité de la méthode empêchant ainsi à l'anticorps primaire de se fixer sur des sites aspécifiques. Le Tween-20, lui, agit comme supplément aux agents de saturation en minimisant l'adsorption non spécifique protéine-protéine et protéine-matrice. 3 nouveaux lavages de 5 min sont effectués afin d'éliminer l'excédent de lait et de BSA. Par la suite, la membrane est mise en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué au 1/200ème dans du TBS Tween-20 0,2 % à 1 % BSA, c'est l'immunodétection. Après 3 nouveaux lavages, la membrane est baignée dans l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase ou couplé à un fluorophore qui est dirigé contre le type d'immunoglobuline correspondant à l'anticorps primaire (dilué au 1/3000ème dans du TBS Tween-20 0,2 % à 2 % BSA) pendant une heure sous une agitation faible. Puis, 3 lavages au TBS Tween-20 0,2 % à 2 % BSA de 10 min sont effectués. Les complexes immunologiques sont alors visualisés par chémiluminescence avec le Kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham). La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par un film photographique en quelques secondes. En ce qui concerne les anticorps couplés à un fluorochrome, le système de détection de fluorescence est le Typhoon Trio (GE Healthcare). C'est un photosenseur à caméra CDD qui permet de révéler la fluorescence des bandes spécifiques en excitant à l'aide d'un faisceau monochromateur les fluorochromes des anticorps secondaires à leur longueur d'onde d'excitation. Une fois les fluorochromes excités, ils émettent un signal détecté par le Typhoon.

F. Expériences d'affinité in vitro (Pull Down)

Cette technique vise à étudier *in vitro* la liaison physique entre différentes protéines. Pour cette expérience, des protéines recombinantes en fusion GST (Gluthation S Transférase) ont été construites et produites par Jérôme Rivet (équipe Pathologie Moléculaire de l'Adressage et de la Signalisation, UMR 6187, Université de Poitiers).

1. Production et purification de protéines recombinantes en fusion GST

Le domaine PDZ de l'α1-syntrophine a été cloné dans le vecteur d'expression pGEX-5x-3 (Pharmacia). Ce domaine sera ainsi fixé à des billes de gluthation-sépharose. Lors du passage

d'un lysat cellulaire sur ces billes, les protéines interagissant avec ce domaine seront retenues et pourront être isolées afin de les identifier ultérieurement par immunoblot.

Pour effectuer cette construction, il a été utilisé un système permettant d'exprimer chez *E. coli* des protéines de fusion entre la GST et la protéine que nous désirions produire. Les deux protéines sont séparées par une séquence de clivage par une protéase de restriction, le facteur Xa. Pour cela, l'ADNc codant pour la protéine à produire est cloné dans le vecteur pGEX-5x3, en phase avec la séquence de la GST.

Une préculture d'une nuit à 37 °C est réalisée avec une souche de *E. coli* BL21 transformée par le plasmide, en milieu LB plus ampicilline 100 µg/ml. La synthèse de la protéine de fusion est alors induite par ajout d'1 mM IPTG (IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside). La culture est poursuivie 3 à 5 h, puis les cellules sont récupérées par centrifugation et lavées dans du PBS (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 1,8 mM, pH: 7,3).

Les étapes suivantes se déroulent à 4 °C. Les bactéries sont reprises dans un tampon de lyse (Triton X-100 1% (v/v), EDTA 1 mM, leupeptine 25 µg/ml, pepstatine 1,4 µg/ml (ou PMSF 1mM)). Les cellules sont lysées par sonification douce (3 x 1 min) puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation de 30 min à 15 000 g. Le surnageant est mis en contact avec des billes de Gluthatione Sepharose®4B (Pharmacia) (100 µl de suspension de billes pour 100 ml de culture) pendant 30 min sous agitation à 4 °C. Après une centrifugation de 5 min à 4 000 g, les billes sont lavées 3 fois avec du PBS Triton X-100 1%.

Pour la purification des protéines de fusion, les billes peuvent être éluées avec du glutathion réduit 10 mM dans du Tris HCl 50 mM, pH 8. Les billes sont incubées 3 fois pendant 10 min dans un volume de tampon d'élution égal au volume de suspension de billes utilisé. Pour le clivage de la protéine recombinante de la GST, les billes sur lesquelles sont fixées les protéines de fusion sont lavées avec du tampon de coupure (NaCl 100 mM; Tris HCl 50 mM, pH 8; $CaCl_2$ 1 mM) puis incubées 2 à 3 heures à 4 °C dans ce tampon de coupure (contenant du facteur Xa, Boehringer), dont le volume est égal à celui de la suspension de billes utilisé. La présence des protéines recombinantes purifiées dans les différentes fractions est contrôlée en gel SDS-PAGE. La quantité de protéines peut être estimée en faisant migrer les échantillons en parallèle avec une gamme de BSA.

2. Précipitation par affinité de partenaires moléculaires (Pull-down)

Les myotubes SolD6 et SolC1 sont lysés avec la méthode décrite précédemment. 60 µg de la protéine recombinante, ici le domaine PDZ, liée aux billes GST et 60 µg de billes GST seules

sont incubées avec 600 µg de lysat total dans un volume de tampon de solubilisation NET toute une nuit à 4 °C sous agitation. Les complexes protéiques liés aux billes, sont lavés trois fois par du tampon NET ou du tampon de lyse RIPA, dilués avec un égal volume de tampon de dénaturation 2X, dénaturés pendant 5 à 10 min à 90 °C, puis déposés en gel SDS-PAGE.

G. Le marquage immunologique

1. Principe

La technique d'immunomarquage indirecte permet la visualisation qualitative de la localisation de protéines dans les cellules (Fig. MM16). Après fixation des constituants cellulaires et perméabilisation du sarcolemme, la préparation est incubée avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine recherchée. Dans un second temps, un anticorps secondaire conjugué à un fluorophore est appliqué. Cet anticorps secondaire a une spécificité dirigée contre les IgG (Immunoglobuline G) de l'espèce animale qui a fourni l'anticorps primaire. L'excitation du fluorophore conjugué à l'anticorps secondaire permet la détection de la protéine recherchée. La technique du marquage indirecte présente l'avantage d'être plus sensible qu'une méthode directe. L'utilisation d'anticorps non perméants pour le marquage de protéines intracellulaires nécessite que la cellule soit au préalable fixée et perméabilisée afin de permettre l'accès des anticorps aux épitopes recherchés. La fixation doit également conserver au mieux les constituants cellulaires étudiés ainsi que la cytoarchitecture et la distribution subcellulaire de ses constituants.

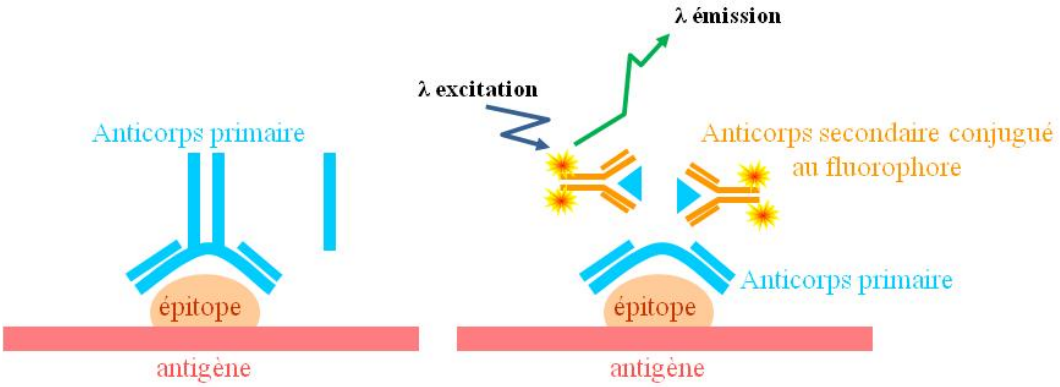


Figure MM16: Principe de marquage fluorescent indirect de protéines à l'aide d'anticorps.

2. Immunocytochimie: fixation des lignées cellulaires et cultures primaires au paraformaldéhyde

Les cellules sont préalablement ensemencées sur des lamelles de 12 à 18 mm de diamètre dans une plaque 12 puits. Après plusieurs rinçages au TBS 1X (20 mM Tris Base; 154 mM NaCl; 2 mM EGTA; 2 mM $MgCl_2$, pH 7.5), les cellules sont fixées avec du ParaFormAldéhyde 4 % (PFA) dilué dans le TBS 1X pendant 20 min sur une balancelle. Le PFA est un fixateur additif qui crée des ponts entre les protéines. Après 3 lavages avec du TBS 1X, les cellules sont ensuite perméabilisées avec du Triton X-100 0,5 % dans du TBS 1X pendant 10 min sur la balancelle pour les myotubes ou 5 min pour les myoblastes. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du TBS 1X, puis incubées dans une solution de saturation TBS 1X BSA 1 % pendant 10 min sur la balancelle. La saturation de 10 min poursuit la perméabilisation et permet de bloquer les sites aspécifiques grâce à l'albumine. Sera ajouté alors l'anticorps primaire de la protéine d'intérêt dilué dans la solution de rinçage TBS-BSA 1%. L'application de 20 µl d'anticorps dilué se fait sur un couvercle d'une boîte de pétri recouvert d'un parafilm sur lequel repose la lamelle en contact avec les 20 µl d'anticorps primaires. L'incubation dure une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4 °C dans une chambre humide. Les cellules sont rincées 3 fois 10 min et par la suite sont incubées en présence de l'anticorps secondaire pendant 30 min à température ambiante dans la chambre humide. Les anticorps secondaires sont préparés dans l'obscurité. Les cellules sont une dernière fois rincées avant d'être montées sur lamelle avec un milieu de montage Vectashield pour être observées au microscope confocal ou être conservées à 4°C.

3. Immunocytochimie: fixation des lignées cellulaires et cultures primaires au méthanol et acétone

Le protocole d'immunomarquage indirect reste le même sauf que le méthanol 100 % et l'acétone 100 % fixent et perméabilisent à la fois les cellules remplaçant alors le PFA et le Triton X-100 qui peuvent poser problème pour l'immunomarquage des protéines transmembranaires. La perméabilisation et la fixation se fait par une incubation de 6 minutes dans du méthanol ou dans de l'acétone à -20 °C sur la balancelle.

4. Immunohistochimie: fixation des coupes de tissus au paraformaldéhyde

4.1. Prélèvement et préparation des muscles

Différents muscles sont prélevés et plongés dans une solution de PBS à température ambiante. Les muscles sont nettoyés et affranchis du tissu conjonctif qui les entoure. Les tissus sont alors fixés pendant 3 h à température ambiante dans un tampon phosphate (NaH_2PO_4 0,03 M;

NaCl 0,27 M, pH 7,4 ajusté avec NaOH) supplémenté de 0,01 M de sodium m-periodate (Sigma-Aldrich), de 0,075 M lysine et de 3 % PFA. Cette fixation assure généralement une préservation correcte des tissus. Après la fixation, les tissus sont lavées plusieurs fois dans du PBS.

4.2. Imprégnation

L'imprégnation est une démarche qui consiste à effectuer différents bains dans du saccharose afin de cryoprotéger les muscles avant leur congélation. Dans un premier temps, les muscles sont baignés dans un premier bain de PBS avec 5 % de saccharose pendant une heure puis à nouveau une heure dans un bain de PBS avec 10 % de saccharose à température ambiante et enfin toute une nuit à 4 °C dans un bain de PBS avec 25 % de saccharose. Le lendemain, les tissus sont plongés dans du tissu Tek (Bayer Diagnostics) puis congelés dans de l'isopentane refroidi dans l'azote liquide ou à -80 °C. Des sections de tissu de 10 µm d'épaisseur sont ensuite coupées à l'aide d'un cryostat (Leica, CM 3050 S) à -20 °C. Les coupes longitudinales de tissus sont déposées sur des lames préalablement recouvertes de gélatine 1 % séchée à température ambiante.

4.3. Marquage des coupes de tissu

Ce marquage se fait préférentiellement sur des coupes cryostat fraîches, mais il peut également se faire sur des coupes cryostat conservées à -20 °C.

Les coupes de tissus sont tout d'abord réhydratées dans du TBS 1X pendant 10 min à 4 °C puis sont saturées dans du TBS 1X avec 1 % BSA pendant 20 min à température ambiante. Les coupes de tissus sont alors incubées dans l'anticorps primaire dilué dans le TBS 1X 1 % BSA toute une nuit à 4 °C et en chambre humide. Après 3 lavages successifs au TBS BSA 1%, les coupes sont incubées dans l'anticorps secondaire pendant 30 min à 1 h en chambre humide. Cette incubation sera suivie de plusieurs rinçages. Les coupes sont enfin montées sur lamelle avec un milieu de montage Vectashield pour être observées au microscope confocal ou être conservées à 4 °C. Le marquage immunohistochimique peut également être réalisé à partir d'une perfusion de 30 min de 3 % PFA sur souris entière. La souris, ainsi fixée, peut être alors disséquée afin de prélever les muscles des pattes postérieures.

RESULTATS ET DISCUSSION

AVANT-PROPOS

La partie 'Résultats et discussion' de ce manuscrit expose les données expérimentales obtenues pendant le travail de trois années de thèse. Ces résultats seront décrits au travers de trois articles scientifiques, rédigés en anglais et présentés sous la forme où ils ont été acceptés pour publication pour le premier et le deuxième article. Le troisième article est présenté sous la forme où il sera soumis. Le premier article a été publié en 2007 dans le journal *FASEB* (2ème auteur). Dans cet article, j'ai participé à la moitié des expérimentations, c'est pourquoi il figure dans le manuscrit. Le deuxième article (1er auteur) est publié dans le journal *JBC* (*Journal of Biological Chemistry*). Quant au troisième, il sera soumis dans le journal *Cell Calcium* (1er auteur). A ces trois articles, viennent s'intercaler des résultats complémentaires.
Les 'Résultats et discussion' s'organisent en trois parties: la première et la deuxième partie correspondent aux deux premiers articles et décrivent la régulation des canaux SOCs via le complexe dystrophine/α1-syntrophine. La troisième partie, correspondant au troisième article, décrit l'implication de la voie PLC dans les influx cationiques anormaux dans les cellules déficientes en dystrophine.

I. ARTICLE 1: REGULATION OF CAPACITATIVE CALCIUM ENTRIES BY α1-SYNTROPHIN: ASSOCIATION OF TRPC1 WITH DYSTROPHIN COMPLEX AND THE PDZ DOMAIN OF α1-SYNTROPHIN

A. Contexte

La dystrophine est une large protéine du cytosquelette exprimée sous la membrane des cellules, en particulier musculaires. Elle permet le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine via un complexe protéique qui lui est associé, appelé DAP (Dystrophin-Associated Protein). L'absence de la dystrophine dans la DMD entraîne la perte de ce complexe DAP et la nécrose des fibres musculaires. La diminution de la force et la nécrose musculaire qui caractérisent cette maladie semblent être la résultante d'une dérégulation de l'homéostasie calcique. Cette altération calcique conduit à une augmentation maintenue de la concentration en calcium libre dans le myoplasme. Des premiers travaux dans les années 90 au sein de l'équipe de Poitiers (Imbert et al., 1995, Imbert et al., 1996; Imbert et al., 2001)

furent menés pour étudier les anomalies de l'homéostasie calcique dans les cellules musculaires humaines DMD avec l'idée que ces altérations pouvaient conduire à la nécrose des cellules.

De nombreuses études menées par d'autres groupes ont suggéré que dans les cellules humaines DMD et murines *mdx*, l'absence de dystrophine pouvait conduire à une altération de la perméabilité calcique de repos de la membrane des cellules (Hopf et al., 1996a; Tutdibi et al., 1999), et à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire libre au repos (Turner et al., 1988; Turner et al., 1991; Imbert et al., 1995). Plusieurs indications sont venues appuyer l'idée qu'une fuite petite mais constante de calcium à travers la membrane plasmique des cellules dépourvues de dystrophine, résultait de l'absence du rôle régulateur de cette protéine en particulier à travers un effet sur les canaux mécanosensibles (Franco et Lansman, 1990a et b; Franco-Obregon et Lansman, 1994), les canaux dits ‘de fuite’ (Fong et al., 1990; Turner et al., 1991; Hopf et al., 1996b) et les canaux SOCs (Vandebrouck et al., 2002).

Afin de mettre en évidence le lien entre la dystrophine et les mouvements de calcium, deux lignées cellulaires ont été construites au sein du laboratoire afin d’étudier l’influence de la dystrophine sur l’homéostasie calcique (Marchand et al., 2004):

-les cellules dys- SolC1 qui n'expriment pas la dystrophine.

-les cellules minidys+ SolD6 qui, par transfection stable, expriment la mini-dystrophine.

La mini-dystrophine fait l’objet de nombreux essais thérapeutiques chez des patients atteints de la DMD. C’est une protéine tronquée au niveau de son domaine central, qui garde la capacité d’interagir avec l’actine et le complexe DAP.

Au début de la décennie, le groupe de P. Gailly à Bruxelles s’est intéressé plus particulièrement aux canaux SOCs qui semblent être impliqués dans la surcharge calcique des fibres *mdx* (Vandebrouck et al., 2002). Ils décrivent un canal, activé par la déplétion en calcium du RS obtenue grâce à la thapsigargine ou la caféine, avec une occurrence et une probabilité d’ouverture plus importantes dans les fibres *mdx*. De plus, l’utilisation d’antisens non sélectifs abaissant le taux des protéines TRPC1 et TRPC4 a démontré que ces courants calciques dépendants des stocks intracellulaires transitaient au moins par l’une de ces protéines. A Poitiers, les travaux de Vandebrouck A. et collaborateurs (Vandebrouck et al., 2006) ont donc été consacrés à l’étude des mécanismes qui contrôlent les entrées de calcium dans les cellules musculaires squelettiques saines et déficientes en dystrophine. Ils ont mis en évidence par les techniques d’extinction du fura-2 par le manganèse et de mesure de

variations calciques par la sonde ratiométrique Indo-1, un influx calcique anormalement élevé dans les myotubes SolC1 déficients en dystrophine.

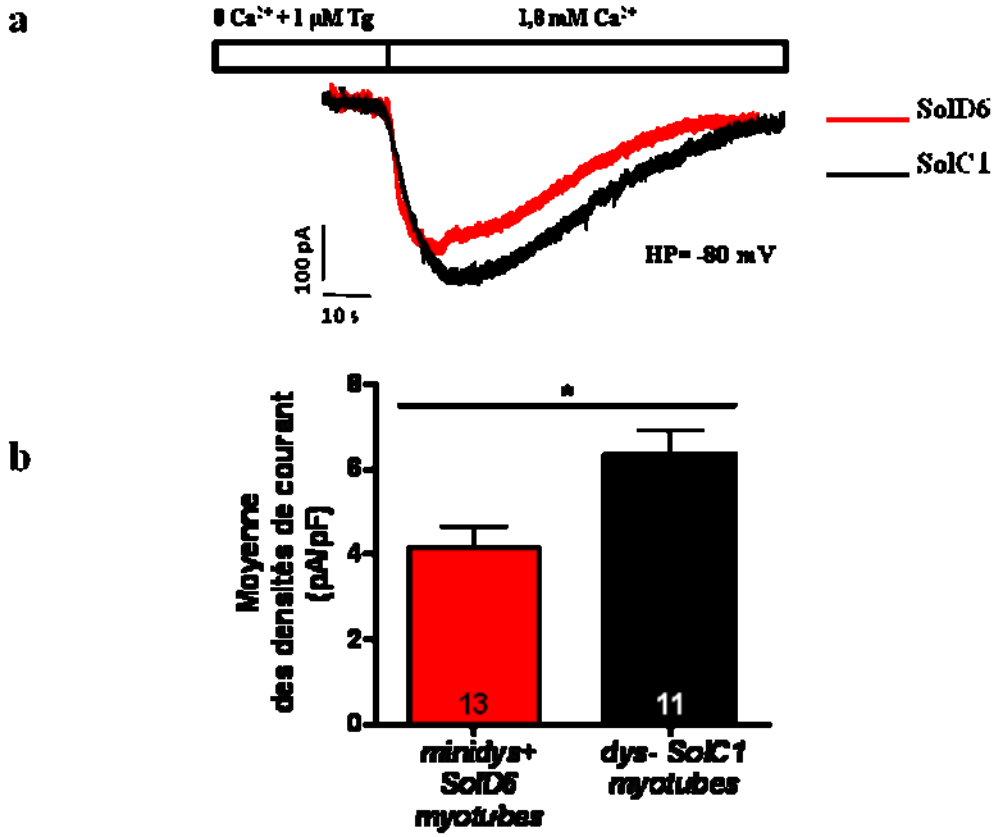


Figure S1: Mesure par la technique de patch-clamp (configuration whole-cell) d'un courant calcique global dépendant des stocks intracellulaires dans les myotubes SolD6 et SolC1.
a) Exemple de tracés représentant un courant calcique entrant stimulé par 1 µM thapsigargine dans les SolD6 et SolC1.
b) Histogrammes représentant les moyennes des densités de courant (± S.E.M) (amplitude de courant (en pA) en fonction de la capacité membranaire (en pF)). La différence entre les valeurs moyennes est mesurée puis considérée significative à l'aide du t test de Student à partir de $P<0.05$ ($^*P<0.05$).

La présence d'un courant calcique entrant stimulé par 1 µM thapsigargine a été observée par la technique de patch-clamp en configuration whole-cell. La densité de courant dépendant des stocks en calcium du RS est statistiquement plus importante dans les myotubes SolC1 (Fig. S1a et b). Par contre, les cinétiques d'activation et d'inactivation sont identiques entre les deux modèles cellulaires (Fig. S1a). La différence des densités de courant entre les deux types cellulaires n'est pas flagrante. Cette technique n'est sans doute pas la plus adaptée pour la mesure des courants SOCs qui sont probablement peu électrogéniques. La technique avec le

fura-2, plus globale, met en évidence un influx calcique qui sera amplifié grâce à la sonde et parait plus appropriée dans cette étude. D'ailleurs, l'équipe d'Allard en 2006 n'enregistrait pas de courants calciques dépendants des stocks intracellulaires par la technique de patch-clamp (Allard et al., 2006) alors que la mesure de cet influx calcique par la technique d'extinction du fura-2 par le manganèse a été récemment possible par cette équipe (Berbey et Allard, 2009).

Vandebrouck A. et collaborateurs ont démontré par la suite que la réintroduction de la mini-dystrophine dans les myotubes déficients en dystrophine conduisait à une réduction des SOCEs (Vandebrouck et al., 2006). Pour cela, la (mini-)dystrophine doit impérativement être adressée au sarcolemme, ce qui est le cas dans les myotubes à F+3 et F+4 (trois et quatre jours après l'initiation de la différenciation). Ces résultats préliminaires ont montré un rôle prépondérant de la dystrophine dans le contrôle des entrées de calcium dépendantes des réserves intracellulaires suggérant que la dystrophine influence l'activité des SOCs par un lien direct ou indirect (Vandebrouck et al., 2006). Mais quel est le lien moléculaire entre la dystrophine et les canaux SOCs? La régulation des SOCs ne pourrait t'elle pas passer par une protéine intermédiaire spécialisée dans l'ancrage des canaux ioniques?

B. Résultats et discussion de l'article 1

Le premier candidat retenu fut l'α1-syntrophine, isoforme prédominante dans le muscle squelettique et cardiaque. Les syntrophines, appartenant au complexe DAP, fonctionnent comme protéines adaptatrices (ou protéines d'échafaudage) en recrutant des protéines de signalisation au niveau de la membrane et du DAP. Elles peuvent interagir simultanément avec de multiples protéines via ces trois domaines (PH, PDZ et SU). Le domaine PDZ des syntrophines est particulièrement connu pour lier de nombreux canaux et des protéines de signalisation (voir chapitre ***E*. 4. Fonction des syntrophines: protéines d'échafaudage**).

Le but du travail de la première publication fut alors de déterminer un lien moléculaire avec le DAP et une éventuelle implication de l'α1-syntrophine dans la régulation des canaux cationiques activés par la déplétion en calcium du RS. Tout d'abord, une étude des interactions protéiques, entre les canaux TRPC1 et l'α1-syntrophine, a été entreprise puis approfondie par une étude de l'effet fonctionnel de l'α1-syntrophine sur les entrées cationiques. Le canal TRPC1 fut choisi car plusieurs publications scientifiques montrent que cette protéine forme un canal SOC et/ou SAC (Liu et al., 2000; Rosado et al., 2002; Vandebrouck et al., 2002; Maroto et al., 2005). Depuis, d'autres études ont confirmé la

participation de TRPC1 aux canaux SACs dans le muscle squelettique (Gervasio et al., 2008; Louis et al., 2008; Formigli et al., 2009). Ces deux types de canaux, SOCs et SACs, possèdent les mêmes propriétés biophysiques et pharmacologiques (Vandebrouck et al., 2002; Ducret et al., 2006) et de ce fait seraient constitués par la même entité moléculaire, TRPC1. De plus, TRPC1 pourrait être impliqué dans la surcharge calcique chez les patients DMD et souris *mdx* puisque l'activité des canaux SOCs et SACs semble être plus importante dans les cellules déficientes en dystrophine. Dans cette étude, nous démontrons pour la première fois que TRPC1 forme *in vivo* un complexe macromoléculaire avec la dystrophine et l'α1-syntrophine aussi bien dans le tissu musculaire C57BL/10 que dans la lignée cellulaire SolD6 exprimant la mini-dystrophine. De plus, par des expériences de GST Pull-down, TRPC1 semble interagir *in vitro* avec le domaine PDZ de l'α1-syntrophine. Mais de manière prévisible, le complexe TRPC1/α1-syntrophine est moins important dans le tissu *mdx* du fait probablement de l'absence ou de la diminution au sarcolemme de l'α1-syntrophine dans les cellules déficientes en dystrophine (Peters et al., 1997; Compton et al., 2005). La diminution de l'association entre TRPC1 et l'α1-syntrophine est plus prononcée chez les souris *mdx* âgées de 3 à 5 semaines (Fig. S2a) (vague nécrotique musculaire massive) que chez les souris *mdx* ayant 1 an (Fig. S2b). Ceci s'expliquerait par un mécanisme de compensation efficace et inconnu chez les souris âgées, qui limiterait la nécrose des fibres musculaires et donc la perte du complexe DAP à la membrane. Une hypothèse serait que l'utrophine se substituerait à la dystrophine en permettant la stabilisation de l'α1-syntrophine au sarcolemme.

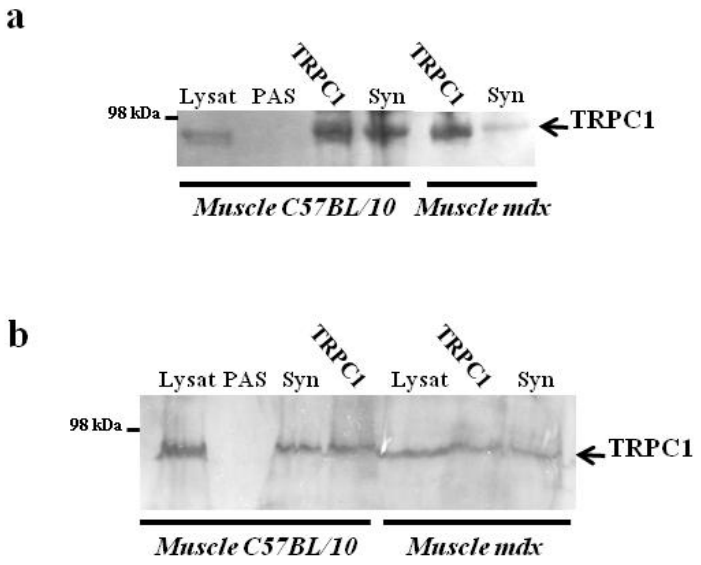


Figure S2: TRPC1 interagit *in vivo* avec l'α1-syntrophine dans les tissus musculaires de souris saines C57BL/10 et de souris *mdx*.
a) Les protéines TRPC1 et l'α1-syntrophine ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats cellulaires provenant de tissus musculaires de souris saines et *mdx* âgées de 3 à 5 semaines dont la concentration en protéines totales était de 3 mg/ml. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-α1-syntrophine, anti-TRPC1, l'immunoblot révélé par l'anticorps anti-TRPC1. Des billes A sont utilisées en absence de lysat comme contrôle négatif (PAS pour Protein A Sepharose).
b) Les protéines TRPC1 et l'α1-syntrophine ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats cellulaires provenant de tissus musculaires de souris saines et *mdx* âgées d'un an dont la concentration en protéines totales était de 3 mg/ml. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-α1-syntrophine, anti-TRPC1, l'immunoblot révélé par l'anticorps anti-TRPC1.

D'autre part, il est important de noter que, dans les cellules déficientes en dystrophine, TRPC1 interagit avec l'α1-syntrophine indépendamment de la présence ou non de la dystrophine. Cette remarque est valable dans l'autre sens car, dans les cellules déficientes en α1-syntrophine, TRPC1 semble, malgré tout, s'associer avec la dystrophine (Fig. S3) probablement au niveau des deux motifs Coiled-Coil de la partie C-terminale. La figure S3 montre l'efficacité d'extinction de la protéine α1-syntrophine par l'absence totale de bande α1-syntrophine dans les lysats SolD6 transfectés avec le siRNA dirigé spécifiquement contre l'α1-syntrophine (blot du haut). La diminution drastique de l'expression de cette protéine est accompagnée par la perte du complexe TRPC1/α1-syntrophine. En revanche, l'absence de l'α1-syntrophine n'empêche pas l'association entre TRPC1 et la dystrophine puisqu'une bande aux alentours de 90 kDa correspondant à TRPC1 coimmunoprécipite avec la dystrophine (blot du bas). Il existe probablement plusieurs points d'ancrage de TRPC1 au DAP comme homer1 ou la cavéoline-3.

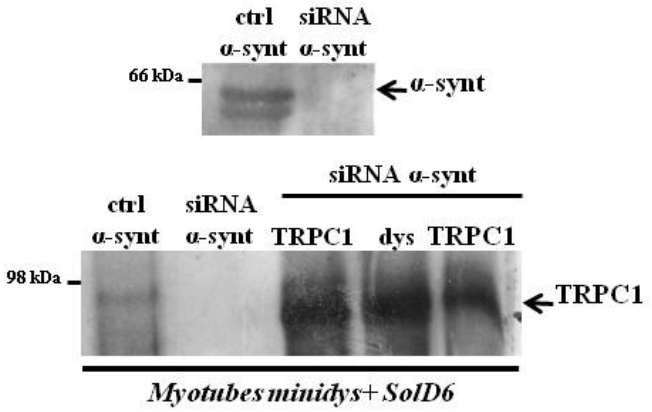


Figure S3: TRPC1 s'associe *in vivo* avec la dystrophine en l'absence de l'α1-syntrophine.
Les protéines TRPC1, α1-syntrophine et dystrophine ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats (protéines totales) provenant de myotubes contrôles (ctrl) SolD6 et de myotubes SolD6 traités avec un siRNA dirigé contre l'α1-syntrophine. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-α1-syntrophine, anti-dystrophine et anti-TRPC1, l'immunoblot révélé par l'anticorps anti-TRPC1.

Ces résultats démontrent que l'α1-syntrophine constitue un des liens moléculaires entre la dystrophine et les canaux TRPC1 et que celle-ci permettrait l'ancrage de ces canaux au sarcolemme et au DAP par l'intermédiaire de son domaine PDZ. Nous nous sommes donc posés la question de savoir si la diminution de l'α1-syntrophine au sarcolemme n'avait pas un impact fonctionnel sur les canaux calciques dépendants des réserves intracellulaires du RS.

Pour y répondre, nous avons adopté une première stratégie de surexpression de l'α1-syntrophine dans nos deux lignées cellulaires. La surexpression de l'α1-syntrophine dite 'recombinante', largement adressée au sarcolemme, ne semble pas agir sur les entrées cationiques dans les myotubes SolD6 exprimant la mini-dystrophine. Au contraire, la surexpression de l'α1-syntrophine 'recombinante' réduit de manière significative les influx cationiques anormaux mesurés dans les myotubes SolC1 déficients en dystrophine. En condition normale, la mini-dystrophine régule efficacement et suffisamment les SOCs de manière directe ou par l'intermédiaire de l'α1-syntrophine endogène, c'est pourquoi la surexpression ne présenterait aucun effet supplémentaire. En revanche, en l'absence de la dystrophine, la surexpression de l'α1-syntrophine recombinante compenserait l'absence de la régulation négative par la mini-dystrophine et l'α1-syntrophine endogène.

Par ailleurs, des mesures d'influx cationiques dépendants de l'état de remplissage en calcium du RS ont été effectuées sur des myotubes à F+6 provenant de cultures primaires de souris normales C57BL/10 et souris *mdx* (stade où la dystrophine est correctement adressée à la membrane). Les cultures primaires de souris ont des systèmes de régulation plus développés

que les lignées cellulaires et les myotubes *mdx* sont largement étudiés pour leurs dérégulations calciques. Les altérations calciques dépendantes des SOCs observées dans les myotubes SolC1 semblent être confirmées dans les myotubes provenant de cultures primaires de souris *mdx*. En effet, les influx cationiques sont deux fois plus importants dans les myotubes *mdx* et sont diminués lors de la surexpression de l'α1-syntrophine. Ces résultats valident ceux des lignées cellulaires SolD6 et SolC1 et montrent la pertinence de l'utilisation de la lignée SolC1 qui présente les mêmes perturbations calciques. Du modèle simplifié (lignées SolD6 et SolC1) au plus complexe (le tissu entier) passant par les cultures primaires *mdx* et C57BL/10, nous observons la présence du même complexe macromoléculaire au sarcolemme comprenant au moins TRPC1, la dystrophine et l'α1-syntrophine. Ces travaux placent les canaux TRPC1 au sein d'un complexe costamérique ancré à l'échafaudage de la dystrophine. Depuis cette publication, deux autres études indépendantes ont montré l'existence de TRPC1 aux costamères du fait de sa liaison avec la cavéoline-3 (Gervasio et al., 2008) et avec homer1 (Stiber et al., 2008).

La structure des canaux TRPCs/SOCs reste mal connue et la pharmacologie spécifique manque terriblement. Cependant, plusieurs agents non spécifiques comme 10 µM Gd^{3+} (Fig. S4) et 40 µM SKF-96365 (Article 1) sont abondamment utilisés pour inhiber les canaux non voltage-dépendants portés par les protéines TRPCs et Orai. Ces deux agents inhibent fortement les influx cationiques mesurés sur les lignées, ce qui confirme bien la présence de ces canaux dans nos lignées myogéniques.

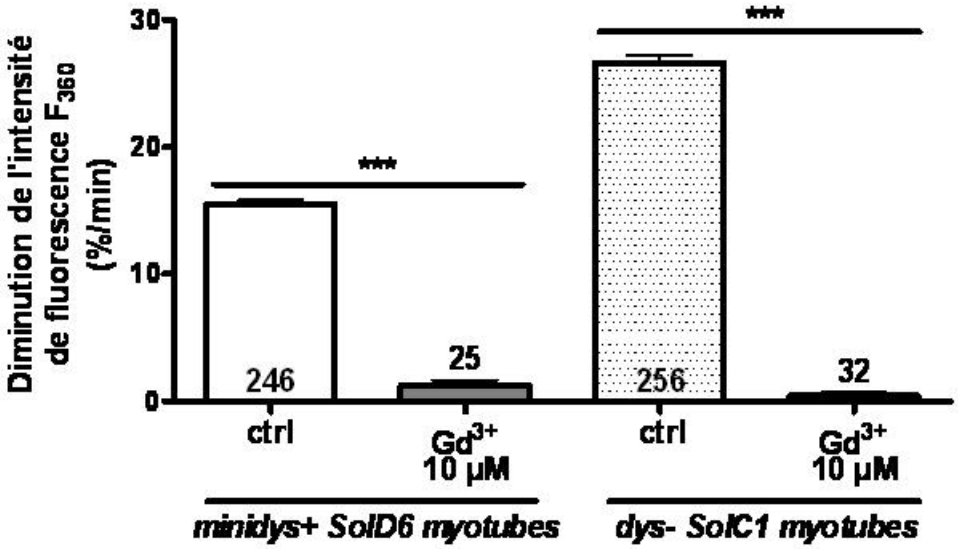


Figure S4: Effet du Gd^{3+} (10 µM) sur les entrées cationiques dépendantes des stocks intracellulaires dans les myotubes SolD6 et SolC1.
Le RS a été vidé en calcium par trois stimulations d'une minute de caféine (10 mM) en présence de 5 µM CPA alternées de trois fois une minute de CPA (15 µM) en absence de calcium.
Histogrammes présentant les pentes moyennes (± S.E.M) d'extinction de la fluorescence du fura-2 par le manganèse (50 µM) dans les myotubes contrôles SolD6 et SolC1 et après application du Gd^{3+}. La différence entre les valeurs moyennes est mesurée puis considérée significative à l'aide du t test de Student à partir de $P<0.05$ (***$P<0.001$).

Pour conclure, ces résultats mettent en évidence un rôle régulateur potentiel de l'α1-syntrophine sur les canaux cationiques TRPC1. L'absence de la dystrophine entrainerait un mauvais adressage de l'α1-syntrophine qui ne pourrait plus réguler négativement les entrées de cations grâce à son interaction directe ou indirecte avec les canaux TRPC1 costamériques.

The FASEB Journal • Research Communication

Regulation of capacitative calcium entries by α1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of α1-syntrophin

Aurélie Vandebrouck,* Jessica Sabourin,* Jérôme Rivet,† Haouria Balghi,* Stéphane Sebille,* Alain Kitzis,*,† Guy Raymond,* Christian Cognard,* Nicolas Bourmeyster,*,† and Bruno Constantin*,[1]

*Institut de Physiologie et Biologie Cellulaire, CNRS, UMR-6187, University of Poitiers, and †LGCM CHU de Poitiers, Poitiers, France

ABSTRACT **Calcium mishandling in Duchenne dystrophic muscle suggested that dystrophin, a membrane-associated cytoskeleton protein, might regulate calcium signaling cascade such as calcium influx pathway. It was previously shown that abnormal calcium entries involve uncontrolled stretch-activated currents and store-operated Ca^{2+} currents supported by TRPC1 channels. Moreover, our recent work demonstrated that reintroduction of minidystrophin in dystrophic myotubes restores normal capacitative calcium entries (CCEs). However, until now, no molecular link between the dystrophin complex and calcium entry channels has been described. This study is the first to show by coimmunoprecipitation assays the molecular association of TRPC1 with dystrophin and α1-syntrophin in muscle cells. TRPC1 was also associated with α1-syntrophin in dystrophic muscle cells independently of dystrophin. Furthermore, glutathione *S*-transferase (GST) pull-down assays showed that TRPC1 binds to the α1-syntrophin PDZ domain. Transfected recombinant α1-syntrophin formed a complex with TRPC1 channels and restored normal CCEs in dystrophic muscle cells. We suggest that normal regulation of CCEs in skeletal muscle depends on the association between TRPC1 channels and α1-syntrophin that may anchor the store-operated channels to the dystrophin-associated protein complex (DAPC). The loss of this molecular association could participate in the calcium alterations observed in dystrophic muscle cells. This study provides a new model for the regulation of calcium influx by interaction with the scaffold of the DAPC in muscle cells. —Vandebrouck, A., Sabourin, J., Rivet, J., Balghi, H., Sebille, S., Kitzis, A., Raymond, G., Cognard, C., Bourmeyster, N., Constantin, B. Regulation of capacitative calcium entries by α1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of α1-syntrophin. *FASEB J.* 21, 608–617 (2007)**

Key Words: dystrophic muscle · store-operated calcium entries · TRP channels · scaffolding proteins

A SUSTAINED INCREASE IN THE resting free calcium concentration could lead to muscle injury, *e.g.*, in Duchenne muscular dystrophy (DMD). Indeed, a persistent intake of Ca^{2+} exceeding the buffering capacity of the cell activates Ca-sensitive proteolytic and phospholipolytic activities (1) resulting in the degradation of dystrophic muscle fibers. In muscle cells from *mdx* mice, the lack of dystrophin is associated with an increase in the calcium concentration underneath the plasma membrane (2). This is in accordance with the increase of calcium influx across the plasma membrane of dystrophic muscle cells (3, 4). Calcium mishandling in DMD myotubes depends on muscle contractile activity (5), suggesting that specific channels activated during these processes may lead to altered calcium entries. Indeed, abnormal calcium influx involves uncontrolled stretch-activated currents (6, 7), and calcium elevations and muscle damage in *mdx* fibers were prevented by stretch-activated channel blockers (8).

Different studies have revealed that capacitative calcium entries (CCEs) support cumulative calcium entries in skeletal muscle fibers and are necessary for long-term activity of muscles (9, 10). These properties suggest that CCEs could be a good candidate for mediating sustained and cumulative calcium entries during activity of dystrophic muscles. Indeed, the early work of Hopf and collaborators (11), suggested first that "leak channels" that are over activated in *mdx* and DMD muscle cells could be store-operated cationic channels and generate elevated CCEs. Moreover, fibers from dystrophic *mdx* mice show increased store-operated calcium currents (12). The use of antisens also clearly demonstrated that store-operated calcium currents recorded in fibers were dependent on the expression level of TRPC1 and TRPC4 channels (12). Our recent work performed on transgenic cultured myotubes also suggested that minidystrophin restored normal properties of CCEs (13), supporting the idea that dystrophin influences store-operated channels via a direct or indirect linkage.

[1] Correspondence: Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS, UMR-6187, University of Poitiers, 86022 Poitiers, France. E-mail: bruno.constantin@univ-poitiers.fr

doi: 10.1096/fj.06-6683com

0892-6638/07/0021-0608 © FASEB

These features prompted us to determine if restoration of CCEs and calcium handling by minidystrophin was associated with molecular interaction between store-operated channels and the dystrophin-associated protein complex (DAPC). The DAPC provides a linkage between the actin cytoskeleton and the extracellular matrix (ECM) and also build a scaffold for accumulating various signaling molecules. We hypothesized that TRPC1 forming store-operated channels and stretch-activated channels (14) could be linked to the DAPC through the syntrophins, which are a family of scaffolding proteins that contain multiple protein interaction domains (15, 16). Syntrophins bind transmembrane channels like sodium channels SkM1 and SkM2 (17) or the potassium channel Kir4.1 (18) through a PSD95-disc large-Zonula occludens protein (PDZ) domain and are associated with dystrophin and other proteins of the dystrophin family, including utrophin and dystrobrevin (19, 20, 21). Since the α1-syntrophin is the predominant syntrophin isoform in skeletal and cardiac muscle, we explored the molecular interaction between α1-syntrophin and TRPC1 and determined if expression of α1-syntrophin could regulate CCE in dystrophic myotubes.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The full-length cDNA encoding α1-syntrophin was cloned with two tandem N-terminal myc epitope tags in pCMS-enhanced GFP. This was done by isolating a 1878 pb restriction fragment by digestion of the α1-syntrophin FL in myc-pQBI25-fC1, (a gift from Dr. Stephen Gee, Ottawa, Canada) with *Nhe*I and *Not*I restriction enzymes. This fragment was ligated into pCMS-enhanced GFP (a gift from Dr. Philippe Gailly, Brussels, Belgium) with *Nhe*I and *Not*I. This plasmid was named α1-syntrophin-GFP.

Cell culture and transfection

Experiments were performed on three cell lines: Two subclones of the Sol8 myogenic cell line, one dystrophin deficient SolC1dys− and the other expressing minidystrophin SolD6minidys+; the SolC57 cell line expressing native full-length dystrophin. These cell lines were cultured as described previously elsewhere (Marchand *et al.*, 2004). Cells were seeded on glass coverslips in 35 or 100 mm plastic dishes (Nunc Delta, Nunc, Roskild, Denmark). For primary cultures, mouse satellite cells were isolated from hind-limbs muscles of 3- to 5-wk-old female mice. Muscles were rinsed and washed in a calcium- and magnesium-free medium (PBS medium containing: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH_2PO4, and 10 mM Na_2HPO_4, 37°C) and then transferred in a solution containing Ham's F-12 medium (Cambrex, East Rutherford, NJ, USA) with 1.5 mg/ml collagenase I (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2 mg/ml protease IX (Sigma), and 2 mM HEPES for dissociation (45 min, 37°C) with continuous stirring. The supernatants were centrifuged (20 min at room temperature, 350 *g*), and the pellets were resuspended in a growth medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum and 10% heat-inactivated horse serum. The cell suspension was then filtered on a nylon netting (pore size 21 μm) in culture flasks and preplated in 100 mm plastic Petri dishes for 1 h (37°C, 5% CO_2, water-saturated air) to remove most of the adhering nonmuscle cells. Then, cells were seeded in 25 cm^2 culture flasks and again incubated in same conditions. After 3 days, the cells were detached from the flasks by trypsin solution (trypsin and EDTA in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free HBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and plated on gelatin-coated glass coverslips in 35 mm plastic dishes. The next day the growth medium was exchanged for a fusion medium: DMEM supplemented with 5% heat-inactivated horse serum. All culture media contained penicillin-G (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml), and L-glutamine (2 mM). Cells were transfected 2 days after the initiation of fusion in 100 mm plastic dishes by using JetPEI cationic polymer transfection reagents (Qbiogene, MP Biomedical, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Three micrograms of purified DNA in 100 μl NaCl were added to 6 μl of JetPEI in 100 μl NaCl. The mixture was incubated for 30 min at room temperature and added to 10 ml of growth medium in each dish during 48 h, and then the growth medium was replaced by differentiation medium.

Antibodies

Antibodies against TRPC1: rabbit polyclonal antibody (pAb; Chemicon International, AbCys s.a., Paris, France and Sigma). Antibodies against α1-syntrophin were rabbit pAb to syntrophin alpha 1 (abcam, Cambridge, UK). Other antibodies used were antic-myc (9E10, mouse monoclonal, Sigma); anti-dystrophin (NCL-DYS2, mouse monoclonal (Novocastra, Newcastle, UK). Secondary antibodies for immunofluorescence: RRX-conjugated Affinity Pure Goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), Fluoprobes 488- anti-mouse IgG antibodies (FluoProbes, Interchim, France). Secondary antibodies for Western blotting were obtained from Amersham Biosciences Corp. (Les Ulis, France): HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG, or from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): HRP-conjugated donkey anti-goat IgG.

Recombinant proteins

Vector containing the cDNA of α1-syntrophin was obtained from Stephen Gee (University of Ottawa, Ottawa, Canada). Recombinant proteins were prepared as GST fusion proteins in *Escherichia coli* (BL21 strain), purified using glutathione-Sepharose beads (Amersham), eluted with glutathione, and used as GST-fusion proteins. The GST-PDZ domain (aa 75–170 of α1-syntrophin) was obtained and produced by means of the plasmid pGEX-5X-3.

Pull-Down Assays

A total of 10^7 SolD6minidys+ or SolC1dys− myotubes was washed twice in cold PBS and then lyzed in 1 ml of lysis buffer [50 mM Tris HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1% NP-40 (w/v), 10% glycerol, 5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 20 mM leupeptine, 0.8 mM aprotinine, and 10 mM pepstatine]. Glutathione *S*-transferase (GST; 30 μg) or fusion protein consisting of GST and α1-syntrophin PDZ domain (30 μg) was incubated with 200 μl of each lysates in 600 μl of lysis buffer at 4°C overnight with constant mixing, followed by washing in PBS, pH 7.2. A fraction of the starting material (input) was boiled in SDS-PAGE loading buffer. Beads were washed twice with ice-cold PBS, pH 7.2, and then once with PBS/1% TX-100. The bound proteins were eluted in an equal volume of loading buffer and boiled for 5 min. The input and the bound proteins were fractionated by a 10% SDS–PAGE,

followed by Western blotting. The blot was revealed using anti-TRPC1 antibody (Ab).

Immunoprecipitation

All steps were carried out at 4°C or on ice. A total of 10^7 SolD6minidys+, SolC1dys− or SolC57dys+ myotubes was washed twice in cold PBS and lyzed in 1 ml of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05% v/v Nonidet P-40, 1% v/v DOC, 1% v/v TritonX-100, and 0.1% v/v SDS) supplemented with 1 mM PMSF, 20 mM leupeptine, 0.8 mM aprotinine, and 10 mM pepstatine. Muscle were taken and frozen in liquid nitrogen then liquidizer in RIPA lysis buffer. An aliquot of this starting material (input) was boiled in reducing SDS-PAGE sample buffer. 2 μg of Ab was added to 100 μl of lysates diluted with 300 μl of NET (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.05% v/v Nonidet P-40) and incubated at 4°C with mixing overnight. Then, 30 μg of protein A/G Sepharose beads (Amersham) were added and incubated an additional 1 h at 4°C with mixing. The immune complexes were collected by centrifugation and washed 3 × 10 min with lysis buffer. Proteins were eluted from the beads by boiling in SDS-PAGE sample buffer. Samples were then centrifuged at 14,000 *g* for 1–2 min and subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis. The blot was treated for 1 h with 1:5000 horseradish peroxydase conjugated anti-mouse antibodies or 1:5000 horseradish peroxydase conjugated anti-rabbit antibodies (Amersham, Les Ulis, France), and developed with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham). The apparent molecular of proteins was estimated according to the position on the blot of prestained protein markers (Bio-Rad, Hemel, Hempstead, UK). Digital images of blots are acquired by scanning (Epson stylus Photo RX45) and processed by Adobe Photoshop software for adjustments of brightness and contrast.

Immunological staining

The cultured cells were fixed in TBS/4% paraformaldehyde and permeabilized with TBS/0.5% TritonX-100. Samples were then incubated for 1 h with primary antibodies in TBS (20 mM Tris base, 154 mM NaCl, 2 mM EGTA, and 2 mM $MgCl_2$, pH 7.5) /1% BSA (Sigma). After being washed in TBS, cells were incubated for 30 min in TBS/1% BSA with secondary antibodies. Samples were mounted using Vectashield mounting medium (Vector, Burlingame, CA, USA).

Cytofluorescence analysis by confocal laser scanning microscopy

The immunolabeled samples were examined by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a Bio-Rad MRC 1024 ES (Bio-Rad) equipped with an argon-krypton gas laser. The Cy3 fluorochrome was excited with the 568 nm yellow line, and the emission was collected via a photomultiplier through a 585 nm long pass filter. Data were acquired using an inverted microscope (Olympus IX70) with a ×60 water immersion objective [image processing was performed with the LaserSharp software (version 3.0, Bio-Rad) for adjustments of brightness and contrast].

Measurement of Ca^{2+} influx using Mn^{2+} quenching of fura 2 fluorescence

Myotubes, plated on glass coverslips, were briefly rinsed with a standard external solution (1.8 Ca^{2+}solution; 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, pH 7.4, with NaOH) and incubated for 30 min at room temperature and then 15 min at 37°C in the same solution supplemented with 3 μM (final concentration) of fura 2-AM (FluoProbes). After being loaded, cells were washed with Ca^{2+}-free solution (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.8 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, and 5.6 mM D-glucose, pH 7.4 with NaOH) before measurement of calcium influx. Cells were perfused by means of a homemade gravity microperfusion device. Fura 2 loaded cells were excited at 360 nm with a CAIRN monochromator (Cairn Research Limited, Faversham, UK), and emission fluorescence was monitored at 510 nm using a CCD camera (Photonic Science Limited, Robertsbridge, UK) coupled to an Olympus IX70 inverted microscope (×40 water immersion fluorescence objective). The influx of Mn^{2+} through cationic channels could be evaluated by the quenching of the fura 2 fluorescence excited at 360 nm, *i.e.*, at the isosbestic point. The variation of fluorescence was recorded with the Imaging Workbench 4.0 (IW 4.0) software (Indec BioSystems, Mountain View, CA, USA). The normalization was performed as described elsewhere (4, 11). The rate of loss of fluorescence intensity at 360 nm was divided by the initial fluorescence intensity in the cell measured before manganese ions were added, to correct for differences in the cell size. The quench rate, of the fluorescence intensity, expressed as percent per minute, was estimated using linear regression analysis. The rate of the influx was estimated from the slope during the first 40 s after Mn^{2+} (50 μM final) addition. Controls were performed by adding 50 μM Mn^{2+} without previous stimulation to ensure that no quenching of fura 2 fluorescence was observed. In these conditions, the average rate of quenching was <1%/min. Statistical analysis was performed with Origin 5.0 software (OriginLab, Northampton, MA, USA). The difference between the mean values of measured parameters was determined by the Student's *t* test.

RESULTS

TRPC1 is associated with the dystrophin-based cytoskeleton

To determine if TRPC1 channels could be part of sarcolemmal complex associated to dystrophin, coimmunoprecipitation assays were performed with protein lysates from normal adult mouse (C57BL/10) fibers (**Fig. 1*A***) or from normal cultured mouse myotubes (Fig. 1*B*, *C*) both expressing full-length native dystrophin. In normal muscles, when TRPC1 was immunoprecipitated (ip: TRPC1 lane) from lysates, immunoblots probed with anti-dystrophin antibodies revealed a band of the same size that the one obtained after immunoprecipitation of dystrophin (ip: dys lane) or of α-syntrophin (ip: α-syn lane). Thus, the full-length dystrophin was coimmunoprecipitated with both α-syntrophin and TRPC1 (Fig. 1*A*). This demonstrated that TRPC1 is linked to the dystrophin-based cytoskeleton in adult fibers. It was also possible to coimmunoprecipitate TRPC1 together with full-length dystrophin from protein lysates extracted from normal mouse myotubes (Fig. 1*B*, *C*). Immunoprecipitation with anti-dystrophin Ab probed with anti-TRPC1 antibodies (Fig. 1*B*) and reciprocally immunoprecipitation of TRPC1 probed with anti-dystrophin antibodies (Fig. 1*C*) showed that

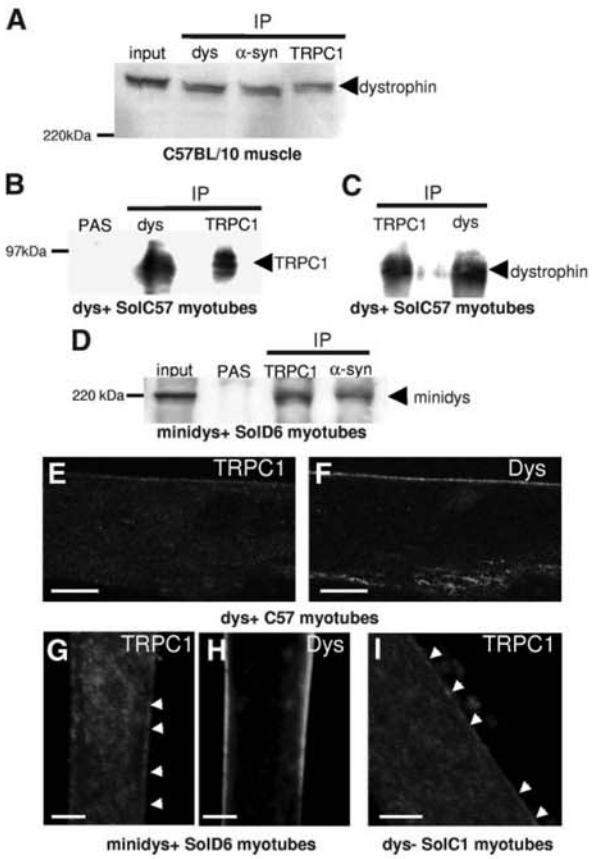


Figure 1. TRPC1 and dystrophin coassociate in muscle and cultured myotubes. *A)* Dystrophin coassociates with TRPC1 and α1-syntrophin in C57Bl/10 mouse muscle. Muscle lysates (input lane) were immunoprecipitated with antibodies against dystrophin (ip: dys lane), α1-syntrophin (ip: α-syn lane), or TRPC1 (ip: TRPC1 lane), and resulting Western blot was probed with antibodies against dystrophin. *B)* Protein lysates from normal SolC57 dystrophin expressing myotubes were immunoprecipitated with antibodies against dystrophin (ip: dys lane) or against TRPC1 (ip: TRPC1 lane) and probed with antibodies against TRPC1. PAS lane: protein A sepharose control. *C)* Protein lysates from normal SolC57 dystrophin expressing myotubes were immunoprecipitated with antibodies against dystrophin (ip: dys lane) or against TRPC1 (ip: TRPC1 lane) and probed with antibodies against dystrophin. D) Protein lysates (input lane) from minidys+ myotubes were immunoprecipitated with antibodies against α1-syntrophin or TRPC1 and probed with antibodies raised against C-terminal domain of dystrophin. Input lane and immunoprecipitation lane show a band around 230 kDa demonstrating the presence of minidystrophin in complex. *E–I)* Immunostaining of TRPC1 (in red) and dystrophin (in green) in control SolC57 dys+ myotubes (*E, F*), in minidys+ SolD6 myotubes (*G, H*), and in Dys− SolC1 myotubes (*I*). Bars = 10 μm.

both proteins were part of the same molecular complex isolated from normal cultured myotubes. Since we previously developed Sol8 myotubes (SolD6) expressing recombinant minidystrophin (22), the association of TRPC1 with minidystrophin was explored in this SolD6 myotubes. TRPC1 or α1-syntrophin was immunoprecipitated from cell lysates and probed with anti-dystrophin antibodies. Figure 1*D* shows that minidystrophin was coimmunoprecipitated together with TRPC1 (ip: TRPC1 lane) or with α1-syntrophin (ip: α-syn lane). These data demonstrated that TRPC1 form a stable complex with minidystrophin, which is also linking α1-syntrophin.

The distribution of TRPC1 in myotubes was determined by immunostaining and confocal microscopy. TRPC1 was localized in the cytoplasm and concentrated at the sarcolemma (Fig. 1*E, G*) in which it colocalized with dystrophin in control SolC57 myotubes (Fig. 1*E, F*). TRPC1 was also observed at the sarcolemma of minidys+ myotubes (Fig. 1*G*) together with minidystrophin (Fig. 1*H*) and at the sarcolemma of dystrophin-deficient myotubes (Fig. 1*I*). The TRPC1 staining was also observed in the cytoplasm in addition to the sarcolemmal distribution. This could represent some TRPC1 channels present in intracellular compartment of developing myotubes. TRPC1 was shown to be exclusively concentrated at the sarcolemma of mouse adult fibers, and it was not detected in the Triton-insoluble fraction (12).

TRPC1 is associated with the α1-syntrophin and the PDZ domain

The link of TRPC1 channels with dystrophin prompted us to explore if like voltage-gated sodium channels (17), TRPC1 channels could bind to α1-syntrophin through its PDZ domain. The presence of TRPC1 associated with α1-syntrophin was thus investigated in adult mouse skeletal muscle, and normal muscles were compared with the dystrophic ones. Control C57BL/10 mouse muscle lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-α1-syntrophin and anti-TRPC1 (**Fig. 2*A***). Western-blots probed with anti-TRPC1 antibodies revealed that TRPC1 was coimmunoprecipitated with α1-syntrophin (ip α-syn lane). To explore the presence of the complex in dystrophic muscles, the experiment was reproduced with lysates from *mdx* dystrophic mice (Fig. 2*A*). TRPC1 could be also coimmunoprecipitated with α1-syntrophin (ip: α-syn lane) from *mdx* muscles. This demonstrates that despite the absence of dystrophin, TRPC1 and α1-syntrophin still form a stable complex, although the amount of α1-syntrophin associated with the sarcolemma is reduced in dystrophic muscle (21, 23). Although the amount of immunoprecipitated TRPC1 (ip: TRPC1 lane) was similar in the two muscle types, the amount of coimmunoprecipitated TRPC1 with anti-α1-syntrophin Ab (ip: α-syn lane) was much higher in C57BL/10 muscle lysates compared with muscle lysates from dystrophic *mdx* mice. The decreased amount of TRPC1 associated to α1-syntrophin is likely due to the reduction of α1-syntrophin at the sarcolemma in dystrophic muscle cells (21, 23). This reduction in the association of α1-syntrophin with TRPC1 in *mdx* muscle could be a key parameter for explaining the up-regulation of store-dependent currents supported by TRPC1-TRPC4 in *mdx* fibers (12).

Coimmunoprecipitation assays were also performed to determine if TRPC1 can form a stable complex with

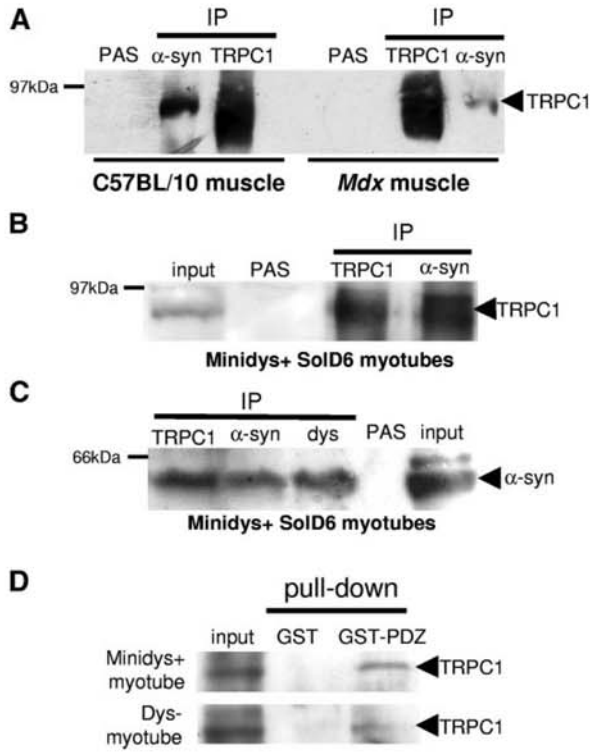


Figure 2. *a)* TRPC1 and α1-syntrophin coassociate in *mdx* and C57BL/10 mouse muscle and in cultured myotubes. *A)* Muscle lysates were immunoprecipitated with antibodies against α1-syntrophin (ip: α-syn lane) or TRPC1 (ip: TRPC1 lane) and probed with antibodies against TRPC1. PAS lane: protein A-Sepharose control. Protein concentrations in muscle lysates were 4 μg/μl for C57 and 5 μg/μl for *mdx*, so the difference observed between the 2 ip α-syn lanes was due to a difference in amount of complex. Similar results were obtained in protein lysates obtained from 3 pairs of wild-type (WT) and *mdx* muscles. *B)* Protein lysates from minidys+ myotubes were immunoprecipitated with antibodies against α1-syntrophin (ip: α-syn lane) or TRPC1 (ip: TRPC1 lane) and probed with antibodies against TRPC1 after blotting. Input lane shows a band around 88 kDa in total lysates. PAS lane: protein A-Sepharose control. *C)* Protein lysates from minidys+ myotubes were immunoprecipitated with rabbit polyclonal antibodies against α1-syntrophin (ip: α-syn lane) or TRPC1 (ip: TRPC1 lane), or dystrophin (ip: dys lane) and probed with goat antibodies against α1-syntrophin after blotting. Same band around 58 kDa is also revealed in total lysates (input lane). PAS lane: protein A-Sepharose control. *D)* TRPC1 interacts with the PDZ domain of α1-syntrophin. GST-PDZ protein or GST alone was incubated with cell lysates from cultured myotubes. A positive band around 88 kDa shows immunodetection of TRPC1 from cell lysates (input lane) and from samples incubated with GST-PDZ (third lane). Second lane: Incubation with GST alone. Results represent 3 independent experiments.

α1-syntrophin in cultured myotubes expressing minidystrophin (Fig. 2*B*). Immunoprecipitation of α1-syntrophin probed with anti-TRPC1 antibodies (ip: α-syn lane) showed that TRPC1 was coimmunoprecipitated with α1-syntrophin from protein lysates of myotubes expressing minidystrophin (Fig. 2*B*). Reciprocally, immunoblots probed with anti-α1-syntrophin antibodies (Fig. 2*C*) also showed that α1-syntrophin was coimmunoprecipitated when TRPC1 (ip: TRPC1 lane) or minidystrophin (ip: dys lane) were immunoprecipitated. The restoration of normal calcium handling and CCE previously demonstrated in myotubes expressing recombinant minidystrophin (13, 22) is thus correlated with the association of TRPC1 channels to a complex containing both α1-syntrophin and minidystrophin.

The interactions of syntrophins with ionic channels usually involve the PDZ domain of syntrophins. We have thus produced the PDZ domain of α1-syntrophin fused to gluthatione *S*-transferase (GST-PDZ) as bait. Lysates from dys− and minidys+ myotubes were incubated with the fusion proteins GST-PDZ (pull-down assay), and bound proteins were analyzed by immunoblotting and probing with anti-TRPC1 antibodies (Fig. 2*D*). A band around 88 kDa corresponding to TRPC1 was detected by immunoblots in the lysates from SolC1, dys−, and SolD6 minidys+ myotubes (input lane) and also in bound proteins to the GST-PDZ (GST-PDZ lane), which demonstrated that the PDZ domain of α1-syntrophin is involved in the binding of TRPC1.

Recombinant α1-syntrophin formed a complex with TRPC1 and localized to the sarcolemma

To explore the functional regulation of store-dependent calcium entries by α1-syntrophin, further experiments were designed to overexpress α1-syntrophin in cultured myotubes. A plasmid vector was constructed to express both α1-syntrophin-c-Myc and enhanced GFP (EGFP) in the same cells. The EGFP expression was used to recognize transfected cells and the c-Myc tag for distinguishing recombinant α1-syntrophin from the native protein. To determine if recombinant α1-syntrophin-c-*myc* could interact with TRPC1, dys− and minidys+ Sol8 muscle cells were transiently transfected and lyzed for protein extraction. Immunoprecipitation with the antic-Myc Ab (**Fig. 3*A***) showed that TRPC1 was coimmunoprecipitated with the recombinant α1-syntrophin (ip: c-*myc* lane) in the two cells types. Reciprocally, when TRPC1 was immunoprecipitated and Western blots were probed with antic-Myc, recombinant α1-syntrophin was coimmunoprecipitated (Fig. 3*B*). These experiments showed that TRPC1 forms a complex with the recombinant syntrophin and that the c-Myc tag did not prevent this interaction. The distribution of the native and recombinant α1-syntrophin in myotubes was explored by immunostaining and confocal microscopy. The double staining for α1-syntrophin (in red) and the dystrophin (green) in minidys+ SolD6 myotubes showed colocalization (Fig. 3*C*) of these two proteins along the sarcolemma. Dys− SolC1myotubes also displayed peripheric staining of α1-syntrophin (Fig. 3*D*) but more sparsely distributed than in myotubes expressing minidystrophin. When transfected with a plasmid also encoding for EGFP, the α1-syntrophin-c-Myc was clearly concentrated at the sarcolemma, while EGFP expression was observed in the cytoplasm

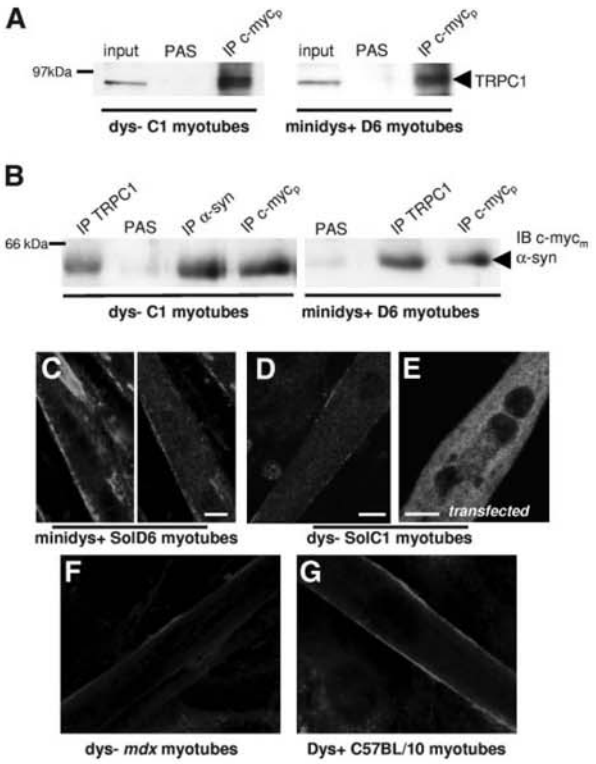


Figure 3. TRPC1 and recombinant α1-syntrophin coassociate *in vivo* in cultured myotubes. *A)* Lysates from differentiated myotubes transfected with α1-syntrophin-c-Myc were immunoprecipitated with polyclonal antibodies against c-Myc tag (ip:-c-Myc$_p$ lane) and the resulting Western blot was probed with antibodies against TRPC1. B) The lysates from differentiated myotubes transfected with α1-syntrophin-c-Myc were immunoprecipitated with polyclonal antibodies against TRPC1 (ip: TRPC1 lane), α1-syntrophin (ip: α-syn lane) and c-Myc tag (ip: c-Myc$_p$ lane). The resulting immunoblot was probed with monoclonal antibodies against c-Myc tag (IB: c-Myc$_m$). *C)* SolD6 minidys+ myotubes were immunostained for α1-syntrophin (in red) and dystrophin (in green). Both proteins colocalize at the sarcolemma. *D)* Dys− myotubes were stained with antibodies against α1-syntrophin (red channel). *E)* Dys− myoblasts were transfected with a plasmid encoding α1-syntrophin-c-Myc and EGFP. Differentiated myotubes were immunostained with Ab specific for c-Myc tag (in red). EGFP expression in cytoplasm is shown in green. *F, G)* dystrophic *mdx* myotubes (*F*) and normal C57BL/10 myotubes were immunostained for α1-syntrophin (red channel). Bars = 10 μm

(Fig. 3*E*). The sparse and lower expression of α1-syntrophin at the sarcolemma of dystrophin-deficient myotubes was confirmed in *mdx* myotubes (Fig. 3*F*) when compared with primary cultures from normal C57bl/10 mice (Fig. 3*G*). Minidystrophin expression improved the sarcolemmal distribution of α1-syntrophin when compared with dys− myotubes. However, the sarcolemmal distribution of α1-syntrophin was always more pronounced in C57bl/10 myotubes in primary culture, which reached more differentiated stages than cell lines.

Forced expression of α1-syntrophin restored normal capacitative calcium entries in dystrophic myotubes

To activate CCEs, the SR was gradually depleted by repetitive activation of calcium release in the presence of a SERCA inhibitor as described previously (13). After the stores were depleted by this procedure, 1.8 mM calcium and 50 μM manganese ions were readmitted in the extracellular space, which induced a capacitative influx of divalent cations and a progressive quench by Mn^{2+} of fura 2 fluorescence emitted from myotubes. (**Fig. 4*A***). Store-operated cationic influxes measured as the average rate of fluorescence decrease of fura 2 was ~2 times higher in the dystrophic *mdx* myotubes in primary culture than in normal C57BL/10 myotubes (Fig. 4*A*, *B*).

CCEs were also measured after the recombinant α1-syntrophin was transiently transfected in normal and *mdx* myotubes (Fig. 4*B*, *white columns*). The green fluorescence of myotubes (Fig. 3*E*) was used to identify transfected cells with pCMS-enhanced GFP plasmid and thus expressing both EGFP and recombinant α1-syntrophin. No significant changes in the rate of quenching were observed in normal C57Bl/10 myotubes expressing recombinant α1-syntrophin compared with nontransfected ones (untransfected cells: −7.40%/min±0.55, n=31 *vs.* transfected myotubes: −6.36%/min±0.72, n=12). On the opposite, the rate of capacitative influx in *mdx* was significantly reduced (43% reduction) when recombinant α1-syntrophin was expressed compared with untransfected myotubes (untransfected cells: −16.88%/min±1.19, n=36 *vs.* transfected myotubes: −9.61%/min±1.35, n=7).

We previously described (13) that the quench rate were ~2 times reduced in Sol8 myotubes expressing minidystrophin compared with dystrophin-deficient SolC1 myotubes. We thus explored the effect of forced expression of recombinant α1-syntrophin on Mn2+ influx measured in this cellular model. As for control C57Bl/10 myotubes, forced expression of α1-syntrophin did not change the rate of quenching in minidys+ SolD6 myotubes (untransfected cells: −15.12%/min±0.88, n=49 *vs.* transfected myotubes: −13.63%/min±1.81, n=15). The level of calcium influx observed in myotubes expressing recombinant minidystrophin was comparable with the one measured in SolC57 myotubes expressing native dystrophin (13). On the contrary, α1-syntrophin expression in SolC1 dystrophin-deficient myotubes lowered CCE, similarly to what was observed with dystrophic *mdx* myotubes. Transfected dys− myotubes displayed slope of fura 2 quenching that was significantly reduced compared with nontransfected cells (untransfected cells: −30.62%/min±1.51, n=72 *vs.* transfected myotubes: −9.91%/min±1.80, n=15).

Although no specific blockers for SOCs and TRPC channels are available, the pharmacological inhibitor SKF-96365 has been already used with success as a blocker of CCEs in cultured myotubes from mice (10). We thus addressed the sensitivity of store-operated

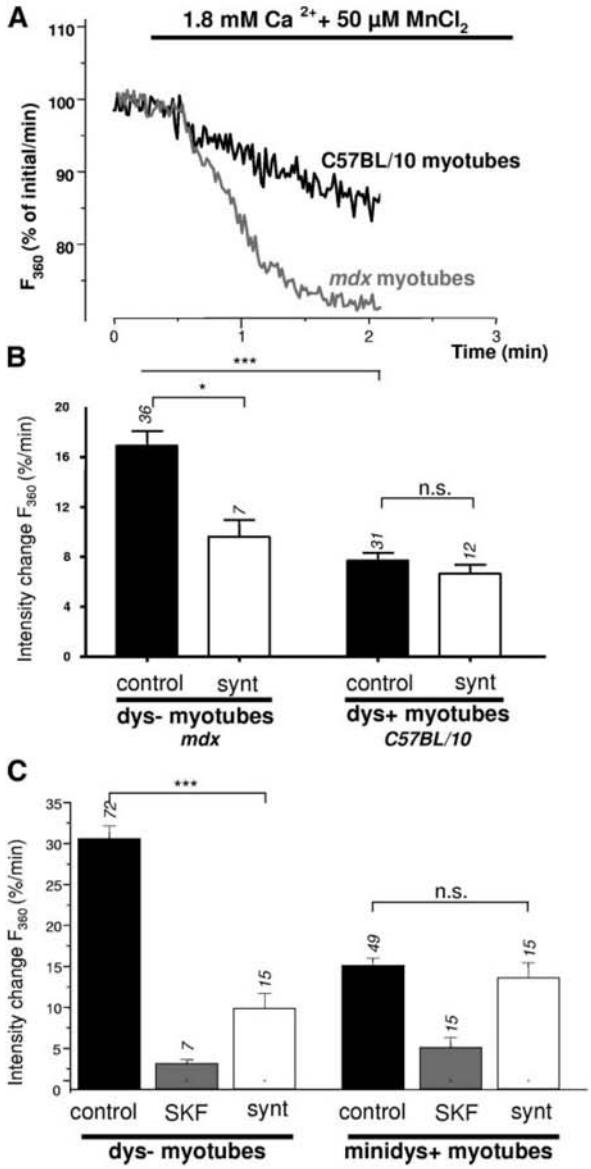


Figure 4. . Effect of α1-syntrophin forced expression on CEEs. Intracellular stores of the sarcoplasmic reticulum were emptied with three stimulations by 10mM caffeine in presence of 5 µM CPA (cyclopiazonic acid) and in absence of Ca^{2+}, space out by 15µM CPA in Ca^{2+}-free solution. Reintroduction of 1.8 mM Ca^{2+} with 50 µM Mn^{2+} in extracellular medium leads to a decrease of the fluorescence intensity (*A*) corresponding to CCEs. *A)* 2 representative recordings of fura 2 fluorescence during perfusion of 50 µM Mn^{2+} obtained from a normal C57BL/10 myotube (black line) and a dystrophic *mdx* myotubes (gray line). Slopes of the Mn^{2+}- induced decreasing phase of fura 2 fluorescence were measured and expressed in % of decrease per min. *B, C)* Bars = mean fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE. Difference between mean values of measured parameters was determined by the Student's *t* test and considered significant at $P < 0.05$ (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001). *B)* Mean rates of fluorescence decrease in *mdx* dystrophin deficient myotubes and in normal C57BL/10 dys+ myotubes transfected (white columns) or untransfected (black columns) with α1-syntrophin. C)Mean rates of fluorescence decrease in SolC1 Dys− myotubes and in SolD6 minidys+ myotubes transfected (white columns) or untransfected (black columns) with α1-syntrophin. A large component of store-dependent influx was sensitive to blockade with 40 µM SKF-96365 in both cell types (gray column).

calcium influx in cultured myotubes. The preincubation of SKF-96365 (40 µM) caused a significant inhibition of manganese influx through SOCs in both dys− and minidys+ myotubes (Fig. 4*C*, gray columns). This channel blocker was also efficient on capacitative cations influx recorded on myotubes in primary cultures from *mdx* and C57Bl10 mice (not shown) as previously shown (10).

DISCUSSION

TRPC1 channels have been proposed as a component of the store-operated calcium entry channels in heterologous systems (24, 25) as well as in skeletal muscle fibers (12). The possibility of functional interaction between TRPC1 and dystrophin has been raised since TRPC1-dependent store-operated currents were found abnormally active in *mdx* dystrophin-deficient fibers (12) and because minidystrophin was able to restore normal CCEs in dystrophin-deficient myotubes (13). Indeed, TRPC1 has been shown to associate with caveolin-scaffolding lipid raft domains (26) and the C-terminus tail contains ankyrin-like sequence and coiled-coil domain (dystrophin homology domain), which could allow TRPC1-cytoskeletal interactions. Here we present evidence for the association of TRPC1 channels with the DAPC, since these channels can be coimmunoprecipitated with dystrophin and with α1-syntrophin. It is possible that TRPC1 interacts directly with dystrophin through their homologous coiled-coil motifs, as for the dystrophin-dystrobrevin complex (27). However, we show here that TRPC1 can also be immunoprecipitated from dystrophic *mdx* muscle and dys− cultured myotubes, which means that at least part of the TRPC1 channels are associated with α1-syntrophin independently of dystrophin. Moreover, TRPC1 could be captured by α1-syntrophin-PDZ domain alone in GST pull-down assays. Since this GST-construct is devoid of the dystrophin-binding domains PH2 and SU, the binding of TRPC1 to α1-syntrophin would not be mediated by dystrophin, but rather involved a direct or indirect binding to the PDZ domain. TRPC1 can homodimerize through a N-terminal coiled-coil motif (28), but expression studies have indicated that TRPC1 can form heterotetramers with TRPC3, TRPC4, and/or TRPC5 (29, 30, 31). The binding of TRPC1 to the α1-syntrophin PDZ domain could thus be mediated by associated TRPC4 and/or TRPC5 proteins sharing a C-terminal PDZ-binding motif (32, 33).

All these data suggest that TRPC1 channels are anchored to the scaffold of DAPC and that this molecular interaction is mediated by α1-syntrophin. The GST

pull-down assays indicate that the PDZ domain of α1-syntrophin is involved in this interaction. Further studies will be conducted in the future to determine if a direct interaction occurs between the C-terminal domain of TRPC1 and α1-syntrophin and to find the specific sequences involved in this interaction.

We previously demonstrated that expression of minidystrophin in SolC1 dystrophin-deficient myotubes allows the restoration of normal CCEs (13). Since store-operated currents have been shown to be dependent on TRPC1 expression in mouse muscle (12), it was thus possible that the effect of minidystrophin on CCEs is related to interactions between minidystrophin and TRPC1. Indeed, the present study shows that expression of recombinant minidystrophin in these cells also leads to the building of a complex containing TRPC1 channels, minidystrophin, and α1-syntrophin. This suggests that the anchoring of TRPC1 channels to the scaffold of α1-syntrophin/minidystrophin complex is involved in the better regulation of CCEs. Furthermore, we show here that when dystrophin is absent CCEs are abnormally elevated and forced expression of recombinant α1-syntrophin at the sarcolemma restores normal levels of CCEs in SolC1 myotubes and in *mdx* myotubes. The coimmunoprecipitation assays also show that in myotubes transfected with recombinant α1-syntrophin, TRPC1 channels are associated in complex with the recombinant α1-syntrophin beside the absence of dystrophin. This result is compatible with the previous observation that syntrophin and dystrobrevin can localize to the membrane in the absence of the dystrophin C-terminal domain (34). This can be explained by the fact that α1-syntrophin can interact with other subsarcolemmal proteins like utrophin and cortical actin (19; 35). Alternatively, the binding to TRPC1 itself could be sufficient to localize syntrophin to the sarcolemma. The ability to restore normal CCEs by expression of α1-syntrophin without restoring dystrophin expression shows that the function of α1-syntrophin on SOCs does not depend on a tight connection to dystrophin. It is thus suggesting that in normal muscle cells, dystrophin could exert its regulating effect on CCE indirectly by maintaining the integrity of the DAPC, which allows normal interaction of subsarcolemmal α1-syntrophin with TRPC1. In *mdx* dystrophic muscle, the alteration of TRPC1-dependent store-operated currents (12) is thus likely related to the reduction of subsarcolemmal α1-syntrophin due to destabilization of the DAPC. Indeed, we show here that less TRPC1 could be coimmunoprecipitated from *mdx* muscle suggesting a reduction of the amount of sarcolemmal TRPC1 associated with α1-syntrophin.

These data provide additional clues that underscore the potential signaling role for syntrophin. The knockout of α1-syntrophin has been shown to display no histological alterations as for *mdx* fibers (36). Although

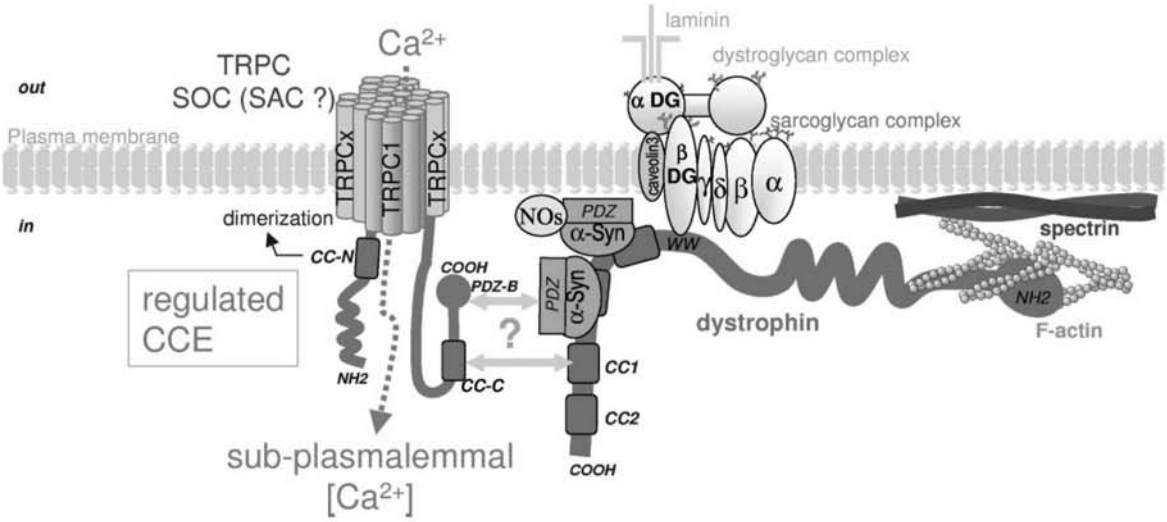


Figure 5. A working model for regulation of TRPC1-dependent CEE by α1-syntrophin/dystrophin complex in skeletal muscle cells. When TRPC channels can be associated to the PDZ domain of α1-syntrophin or to the coiled-coil domain of dystrophin. Linkage of cationic channels to the scaffold of DAPC moderate store-operated entries. Syntrophin/dystrophin complex may provide a scaffold for signaling molecules, which regulates activity of channels. TPRC1-containing channels are activated by depletion of calcium stores (SOC), and participate in cumulative calcium entry, which have consequences on subplasmalemmal [Ca^{2+}] and long term calcium homeostasis. The possibility that TPRC1-containing channels may be activated by membrane stretch (SAC) is mentioned. Differences in modes of activation could result from heteromultimerization of TRPC1 and specific subunit combinations with other TRPCs may form different populations of channels with different properties. Syntrophin can link a signaling complex in the vicinity of channels. The whole complex builds a signalosom, which is necessary for maintaining normal calcium influx. When dystrophin and scaffolding proteins are reduced at the sarcolemma, the signalosom is disrupted and calcium influxes are abnormally increased. SOC = store-operated channel; SAC = stretch-activated channel; TRPCx: undetermined TRPC that might be part of the heterotetrameric channel; α-SYN: α1-syntrophin; PDZ-B: PDZ-binding domain; CC: coiled-coil motif; NOs: NO synthase.

faseb_Page_09.jpg

10. Pan, Z., Yang, D., Nagaraj, R. Y., Nosek, T. A., Nishi, M., Takeshima, H., Cheng, H., and Ma, J. (2002) Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking mg29. *Nat. Cell Biol.* **4,** 379–383
11. Hopf, F. W., Reddy, P., Hong, J., and Steinhardt, R. A. (1996) A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. *J. Biol. Chem.* **271,** 22358–22367
12. Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H., and Gailly, P. (2002) Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* **158,** 1089–1096
13. Vandebrouck, A., Ducret, T., Basset, O., Sebille, S., Raymond, G., Ruegg, U., Gailly, P., Cognard, C., and Constantin, B. (2005) Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J.* **20,** 136–8. Epub, Oct 27
14. Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O. P. (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.* **7,** 179–185
15. Froehner, S. C., Adams, M. E., Peters, M. F., and Gee, S. H. (1997) Syntrophins: modular adapter proteins at the neuromuscular junction and the sarcolemma. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **52,** 197–207
16. Albrecht, D. E., and Froehner, S. C. (2002) Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals* **11,** 123–129
17. Gee, S. H., Madhavan, R., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Sealock, R., and Froehner, S. C. (1998) Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J. Neurosci.* **18,** 128–137
18. Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C., and Kofuji, P. (2004) The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J. Biol. Chem.* **279,** 28387–28392
19. Yang, B., Jung, D., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S., and Campbell, K. P. (1995) Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J. Biol. Chem.* **270,** 4975–4978
20. Ahn, A. H., Freener, C. A., Gussoni, E., Yoshida, M., Ozawa, E., and Kunkel, L. M. (1996) The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J. Biol. Chem.* **271,** 2724–2730
21. Peters, M. F., Adams, M. E., and Froehner, S. C. (1997) Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J. Cell Biol.* **138,** 81–93
22. Marchand, E., Constantin, B., Balghi, H., Claudepierre, M. C., Cantereau, A., Magaud, C., Mouzou, A., Raymond, G., Braun, S., and 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,** 363–379
23. Compton, A. G., Cooper, S. T., Hill, P. M., Yang, N., Froehner, S. C., and North, K. N. (2005) The syntrophin-dystrobrevin subcomplex in human neuromuscular disorders. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64,** 350–361
24. Vazquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M., and Putney, J. W., Jr. (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1742,** 21–36
25. Pedersen, S. F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38,** 233–252
26. Lockwich, T. P., Liu, X., Singh, B. B., Jadlowiec, J., Weiland, S., and Ambudkar, I. S. (2000) Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J. Biol. Chem.* **275,** 11934–11942
27. Sadoulet-Puccio, H. M., Rajala, M., and Kunkel, L. M. (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 12413–12418
28. Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schafer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jungling, E., Rocks, O., Luckhoff, A., and Frey, J. (2002) Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett.* **523,** 193–199
29. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2001) TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29,** 645–655
30. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 7461–7466
31. Goel, M., Sinkins, W. G., and Schilling, W. P. (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **277,** 48303–48310
32. Tang, Y., Tang, J., Chen, Z., Trost, C., Flockerzi, V., Li, M., Ramesh, V., and Zhu, M. X. (2000) Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J. Biol. Chem.* **275,** 37559–37564
33. Obukhov, A. G., and Nowycky, M. C. (2004) TRPC5 activation kinetics are modulated by the scaffolding protein ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50). *J. Cell. Physiol.* **201,** 227–235
34. Crawford, G. E., Faulkner, J. A., Crosbie, R. H., Campbell, K. P., Froehner, S. C., and Chamberlain, J. S. (2000) Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J. Cell Biol.* **150,** 1399–1410
35. Iwata, Y., Sampaolesi, M., Shigekawa, M., and Wakabayashi, S. (2004) Syntrophin is an actin-binding protein the cellular localization of which is regulated through cytoskeletal reorganization in skeletal muscle cells. *Eur.J. Cell Biol.* **83,** 555–565
36. Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., Ikemoto, T., Endo, M., Hanaoka, K., Nabeshima, Y., and Takeda, S. (1999) alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* **274,** 2193–2200
37. Ou, Y., Strege, P., Miller, S. M., Makielski, J., Ackerman, M., Gibbons, S. J., and Farrugia, G. (2003) Syntrophin gamma 2 regulates SCN5A gating by a PDZ domain-mediated interaction. *J. Biol. Chem.* **278,** 1915–1923
38. Ducret, T., Vandebrouck, C., Cao, M. L., Lebacq, J., and Gailly, P. (2006) Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **575,** 913–924
39. Balghi, H., Sebille, S., Constantin, B., Patri, S., Thoreau, V., Mondin, L., Mok, E., Kitzis, A., Raymond, G., and Cognard, C. (2006) Mini-dystrophin expression down-regulates overactivation of G protein-mediated IP3 signaling pathway in dystrophin-deficient muscle cells. *J. Gen. Physiol.* **127,** 171–182
40. Zhou, Y. W., Oak, S. A., Senogles, S. E., and Jarrett, H. W. (2005) Laminin-alpha1 globular domains 3 and 4 induce heterotrimeric G protein binding to alpha-syntrophin's PDZ domain and alter intracellular Ca2+ in muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **288,** C377–C388

Received for publication July 21, 2006.
Accepted for publication September 22, 2006.

II. ARTICLE 2: REGULATION OF TRPC1 AND TRPC4 CATION CHANNELS REQUIRES AN α1-SYNTROPHIN-DEPENDENT COMPLEX IN SKELETAL MOUSE MYOTUBES

A. Contexte

L'étude suivante a été conduite afin d'approfondir la régulation des entrées cationiques dépendantes des stocks intracellulaires par l'α1-syntrophine grâce à des expérimentations plus spécifiques. En effet, la surexpression n'est pas un outil suffisant pour conclure sur la fonction exacte et le rôle physiologique d'une protéine. De plus, la surexpression d'une protéine recombinante peut créer de nouvelles interactions protéiques (normalement absentes en condition physiologique) qui joueraient sur l'activité des canaux TRPCs. C'est pourquoi, la suite de l'étude a été consacrée à l'investigation de la diminution spécifique de l'expression de l'α1-syntrophine endogène grâce au siRNA et au shRNA. Cette technique permet la répression spécifique et transitoire de la protéine cible, l'α1-syntrophine et d'en évaluer les effets sur les entrées de cations à travers les canaux TRPCs. Il est à souligner que cette stratégie mime les conditions physiologiques des myotubes SolC1 où l'expression de l'α1-syntrophine à la membrane est réduite, mais sans diminution de dystrophine.

Dans un second temps, nous avons voulu explorer plus précisément l'influence du domaine PDZ de l'α1-syntrophine sur le canal TRPC1: rôle fonctionnel exercé sur les entrées cationiques ou rôle d'ancrage des canaux TRPCs. Pour cela, un plasmide codant pour une protéine α1-syntrophine tronquée, ayant perdue son domaine PDZ, a été construit (ΔN-syntrophine). Cette syntrophine tronquée a été exprimée dans les myotubes déficients en dystrophine et l'effet sur les influx a été comparé avec celui obtenu avec l'α1-syntrophine entière.

TRPC1 interagit *in vitro* avec le domaine PDZ alors qu'il ne possède pas la séquence consensus connue pour lier ce domaine, ce qui suggère qu'il existe peut être un domaine de liaison au PDZ encore inconnu sur cette isoforme ou un intermédiaire entre le domaine PDZ et le canal TRPC1.

D'autre part, TRPC1 est un sérieux candidat pour former un SOC dans de nombreux types cellulaires. Nous avons alors voulu savoir s'il formait un SOC dans nos modèles cellulaires. De plus, TRPC1 est largement connu pour former un canal hétérotétramérique avec TRPC3, TRPC5 ou TRPC4 dans de nombreux types cellulaires (Lintschinger et al., 2000; Strubing et

al., 2001; Hofmann et al., 2002; Yoshida et al., 2005). TRPC4 et TRPC5 sont des candidats très intéressants car ce sont les seuls à posséder une séquence connue de liaison au domaine PDZ dans leur partie C-terminale cytoplasmique (Tang et al., 2000; Vazquez et al., 2004). TRPC5 a été écarté de notre recherche puisqu'il ne semble pas être exprimé dans le muscle squelettique (Vandebrouck et al., 2002; Kunert-Keil et al., 2006). La présence de TRPC4, dans le complexe macromoléculaire costamérique contenant le tandem dystrophine/α1-syntrophine, a donc été recherchée. De plus, le choix de TRPC4 semble plus judicieux puisque Vandebrouck C. et collaborateurs ont montré par l'utilisation d'antisens une implication probable de TRPC1 et TRPC4 dans les entrées calciques anormales mesurées dans les fibres *mdx* (Vandebrouck et al., 2002).

Dans la mesure où la pharmacologie est peu sélective, nous avons alors inhibé sélectivement l'expression de la protéine TRPC1 ou TRPC4 dans les myotubes grâce à des siRNA afin d'observer l'impact sur les entrées cationiques dans les myotubes déficients ou non en α1-syntrophine. Ceci est un outil essentiel afin de déterminer si les influx cationiques mesurés sont bien dépendants de TRPC1 et de TRPC4.

B. Résultats et discussion de l'article 2

Dans cette deuxième étude, nous démontrons pour la première fois que les canaux endogènes TRPC1 et TRPC4 forment un complexe stable et semblent être localisés dans le même compartiment membranaire, le sarcolemme, dans le tissu C57BL/10 (Fig. 4, Article 2) mais également dans le tissu *mdx* (Fig. S5).

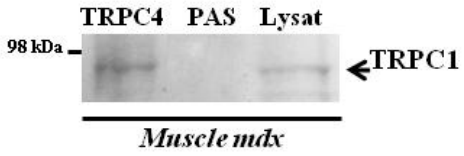


Figure S5: TRPC1 interagit *in vivo* avec TRPC4 dans le tissu musculaire de souris *mdx*. Les protéines TRPC1 et TRPC4 ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats provenant de tissus musculaires de souris *mdx*. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-TRPC4, anti-TRPC1, l'immunoblot révélé par l'anticorps anti-TRPC1. Des billes A sont utilisées en absence de lysat comme contrôle négatif (PAS pour Protein A Sepharose).

Ils forment tous les deux également un complexe macromoléculaire avec la dystrophine et l'α1-syntrophine dans le tissu C57BL/10 et dans les cellules SolD6 exprimant la mini-dystrophine. TRPC1 et TRPC4 interagissent aussi avec l'α1-syntrophine dans le tissu *mdx* (Fig. S6).

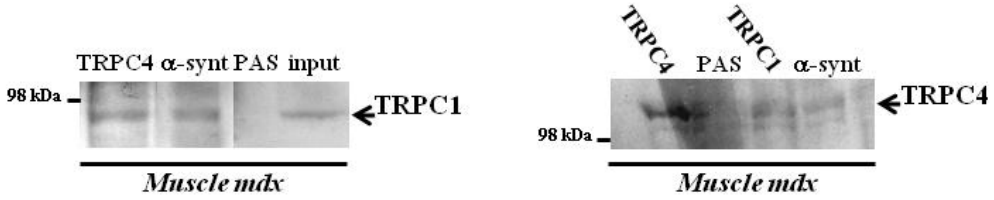


Figure S6: TRPC1 interagit *in vivo* avec l'α1-syntrophine et TRPC4 dans le tissu musculaire de souris *mdx*.
Les protéines TRPC1, TRPC4 et l'α1-syntrophine ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats provenant de tissus musculaires de souris *mdx*. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-α1-syntrophine, anti-TRPC1 et anti-TRPC4, l'immunoblot révélé par les anticorps anti-TRPC1 et anti-TRPC4. Des billes A sont utilisées en absence de lysat comme contrôle négatif (PAS pour Protein A Sepharose).

Comme pour la protéine TRPC1, TRPC4 interagit *in vitro* avec le domaine PDZ de l'α1-syntrophine. De ce fait, la protéine TRPC4 permettrait la liaison entre TRPC1 et le domaine PDZ de l'α1-syntrophine car celle-ci possède la séquence de liaison au domaine PDZ dans sa partie C-terminale.

Nous avons précédemment observé que la surexpression de l'α1-syntrophine entière réduisait de manière significative les entrées cationiques dans les myotubes déficients en dystrophine SolC1 et *mdx*, suggérant que l'α1-syntrophine restaure la régulation des canaux de manière indépendante de la dystrophine. Cette régulation obtenue avec l'α1-syntrophine entière est perdue lorsque nous surexprimons l'α1-syntrophine dépourvue de son domaine de liaison aux canaux, le domaine PDZ. Ici, nous montrons l'importance de ce domaine PDZ pour une régulation normale des entrées cationiques dépendantes des TRPCs. Ces observations sont en faveur d'un rôle central et crucial de l'α1-syntrophine dans la régulation des canaux sarcolemmiens par l'intermédiaire de son domaine PDZ. Cette idée est renforcée par l'utilisation de siRNA et shRNA qui répriment spécifiquement l'expression de l'α1-syntrophine. En effet, les myotubes n'exprimant plus l'α1-syntrophine présentent un influx cationique anormal et similaire à celui mesuré dans les myotubes SolC1. Nos résultats suggèrent que la diminution drastique de l'α1-syntrophine à la membrane dans les cellules déficientes en dystrophine pourrait participer à la dérégulation calcique dans la physiopathologie de la DMD.

Nous avons voulu ensuite confirmer l'effet de l'absence de cette protéine sur les entrées cationiques dans un modèle comportant la dystrophine entière et endogène. Pour cela, nous disposons de la lignée myogénique Sol8P exprimant la dystrophine entière dans laquelle nous avons éteint de manière transitoire la protéine α1-syntrophine et observé les conséquences sur les influx cationiques (Fig. S7). La figure S7 montre que les entrées cationiques résultant de la déplétion en calcium du RS sont augmentées de 29 % dans les myotubes Sol8P transfectées avec le siRNA α1-syntrophine (10,8 %/min ± 0,6, n=49) par rapport aux valeurs contrôles (7,7 %/min ± 0,7, n=25).

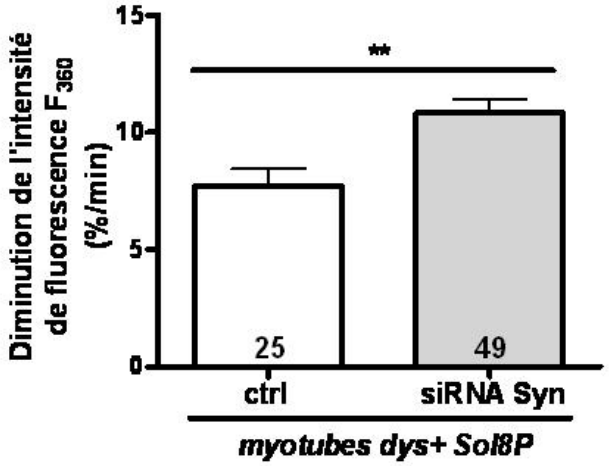


Figure S7: Effet du siRNA α1-syntrophine sur les entrées cationiques dépendantes des stocks intracellulaires dans les myotubes Sol8P.
Le RS a été vidé en calcium par trois stimulations d'une minute de caféine (10 mM) en présence de 5 µM CPA alternées de trois fois une minute de CPA (15 µM) en absence de calcium.
Histogrammes présentant les pentes moyennes (± S.E.M) d'extinction de la fluorescence du fura-2 par le manganèse (50 µM) dans les myotubes contrôles Sol8P et les myotubes Sol8P transfectés avec le siRNA α1-syntrophine. La différence entre les valeurs moyennes est mesurée puis considérée significative à l'aide du t test de Student à partir de $P<0.05$ (**$P<0.01$).

L'effet de l'absence de l'α1-syntrophine sur les entrées cationiques est beaucoup moins important que celui sur les myotubes SolD6 exprimant la mini-dystrophine. Ceci peut s'expliquer par une efficacité moindre du siRNA dans les Sol8P ou encore par un effet masqué dû à une action compensatrice des autres isoformes β1 et β2-syntrophines également fortement exprimées dans le muscle squelettique. Une dernière hypothèse, moins vraisemblable, serait que le domaine central de la dystrophine, absent de la mini-dystrophine, aurait un rôle régulateur sur les entrées cationiques.

D'autre part, les influx cationiques régulés par l'α1-syntrophine sont constitués au moins des protéines TRPC1 et TRPC4. Les SOCEs sont dépendantes du niveau d'expression de ces deux isoformes car leurs surexpressions augmentent les influx cationiques et leurs répressions les diminuent. Ces travaux confirment ceux de Vandebrouck et collaborateurs en 2002. De plus, la répression de TRPC1 et TRPC4 empêche le développement d'influx anormaux lorsque l'α1-syntrophine est absente dans les myotubes SolD6 transfectés avec les siRNA dirigés contre l'α1-syntrophine. Ceci suggère que la régulation des influx cationiques par l'α1-syntrophine est dépendante du niveau d'expression des TRPCs.

Ces observations sont en faveur d'une régulation des entrées cationiques dépendantes de TRPC1 et TRPC4 via le domaine PDZ de l'α1-syntrophine.

JBC Papers in Press. Published on October 7, 2009 as Manuscript M109.012872
The latest version is at http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M109.012872

Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an α1-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes

J. Sabourin, C. Lamiche, A. Vandebrouck, C. Magaud, J. Rivet, C. Cognard, N. Bourmeyster, B. Constantin

Address correspondence to: Dr Bruno Constantin, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, UMR Université de Poitiers/CNRS n°6187, 86022 POITIERS CEDEX, France. E-mail: bruno.constantin@univ-poitiers.fr

Running title: syntrophin regulates TRPC-dependent cation entry

The Dystrophin-Associated Protein Complex (DAPC) is essential for skeletal muscle and the lack of dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy results in a reduction of DAPC components such as syntrophins and in fiber necrosis. By anchoring various molecules, the syntrophins may confer a role in cell signaling to the DAPC. Calcium disorders and abnormally elevated cation influx in dystrophic muscle cells have suggested that the DAPC regulates some sarcolemmal cationic channels. We previously demonstrated that mini-dystrophin and α1-syntrophin restored normal cation entry in dystrophin-deficient myotubes and that sarcolemmal TRPC1 channels associated with dystrophin and bound PDZ domain of α1-syntrophin. This study shows that siRNA silencing of α1-syntrophin dysregulated cation influx in myotubes. Moreover, deletion of PDZ-containing domain prevented restoration of normal cation entry by α1-syntrophin transfection in dystrophin-deficient myotubes.

TRPC1 and TRPC4 channels are expressed at the sarcolemma of muscle cells and forced expression or siRNA silencing showed that cation influx regulated by α1-syntrophin is supported by TRPC1 and TRPC4. A molecular association was found between TRPC1 and TRPC4 channels and the α1-syntrophin/dystrophin complex. TRPC1 and TRPC4 channels may form sarcolemmal channels anchored to the DAPC and α1-syntrophin is necessary for maintaining normal regulation of TRPC-supported cation entry in skeletal muscle. This association of cation channels with DAPC forms a signaling complex which modulates cation entry and may be crucial for normal calcium homeostasis in skeletal muscles.

Dystrophin is a large cytoplasmic protein located at the inner face of the sarcolemma in muscle cells. The amino-terminal portion of the protein binds actin and the carboxy-terminal portion binds β-dystroglycan, which is part of the Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC). The DGC is believed to provide a framework that connects the extracellular matrix to the intracellular cytoskeleton (1). Because of this structural organization, dystrophin has been postulated to protect fibers against mechanical damage. Knowledge of the role of dystrophin in skeletal muscle has been gained by intensive studies of muscles from patients suffering from Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), as well as from *mdx* mice, the animal model of the genetic disease. In the very severe DMD phenotypes, the total absence of dystrophin leads to necrosis of skeletal muscle and results in a reduction or complete absence of Dystrophin-Associated Protein Complex (DAPC) components such as sarcoglycans and syntrophins (2;3).

The syntrophins are a family of intracellular peripheral membrane proteins. The binding of syntrophins to a variety of channels or enzymes has contributed to the idea that these proteins are molecular adaptors conferring a signaling role to the DAPC. The α1-syntrophin is the predominant syntrophin isoform in skeletal and cardiac muscles (4). This adaptor protein binds transmembrane channels through a PDZ (PSD95-Disc large-Zona occludens protein) domain such as sodium channels SkM1 and SkM2 (5) or the potassium channel Kir4.1 (6).

In skeletal muscle, we have demonstrated for the first time that endogenous TRPC1 channels form a macromolecular complex with the

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

The Journal of Biological Chemistry ASBMB ibc

costameric proteins α1-syntrophin and dystrophin and binds to the PDZ domain of the α1-syntrophin (7). TRPC1 was already shown to interact with others scaffolding proteins such as Homer (8), or caveolin-1 (9).

The TRPC1 protein has been shown to be one element of some non-voltage-gated heteromeric cation channels involved in Ca^{2+} and Na^{+} pathway, which can be activated in response to agonist-stimulated PIP_2 hydrolysis and is thought to be a component of Store-Operated Channels (SOCs) in various tissues (10). Recently, the study of salivary gland cells from TRPC1 (-/-) mice showed that TRPC1 is necessary for store-operated currents in this tissue (11), while the analysis of platelets from TRPC1 (-/-) mice showed that SOCE occurred independently of TRPC1 (12). Two other proteins, STIM1, a single transmembrane protein (STromal Interaction Protein 1) and Orai1, a four transmembrane domain proteins, have emerged as other components of the Store-Operated Channels (13;14), and can interact with TRPC proteins in heteromeric complex for conferring responsiveness to store depletion in various cells (15;16;17). In muscle fibers, the study of Kurebayashi and Ogawa in 2001 (18) showed that complete or partial depletion of Sarcoplasmic Reticulum (SR) stores, during repetitive activation of calcium release, stimulated Store-Operated Calcium Entry (SOCE). Recent studies revealed high levels of Orai1 (19) and of STIM1 at the membrane of the SR (20) in skeletal muscle and a requirement for STIM1 in SOCE and contractile function of skeletal muscle (20). The localisation of STIM1 at the SR suggests its involvement in activation of SOCs and calcium influx through the membrane of T-tubule, which occurs after calcium release (21). At the sarcolemma, TRPC1 and TRPC4 were shown to be involved in a cationic channel with activity enhanced by depletion of calcium stores by thapsigargin (22) and with many similar biophysical properties as the MechanoSensitive channels (MS channels) recorded in the same preparation (23). Moreover, stretch-activated channel as well as a SOC was shown to be encoded by the TRPC1 gene (24). Taken together, these data suggest that MS channels and SOCs may represent the same channel constituted of at least TRPC1. The activity of MS channels (25;26;27) and of SOCs (22) is higher in dystrophin-deficient muscle cells. The sarcolemma of dystrophin-deficient muscle was also shown to display cation channels active at rest with greater open probability (28) and an antisense strategy suggested that the spontaneously active channels were constituted of TRPC protein (22). These studies and other led to the hypothesis that the DAPC may control TRPC-MS/SOC channels at the sarcolemma and are involved in regulating sub-sarcolemmal calcium concentration. These channels could be directly regulated in normal cells by the presence of the DAPC, which could explain enhanced SOCE observed in dystrophin-deficient muscles (29;30). In accordance with this idea, we recently reported that when transfected in dystrophin-deficient myotubes, recombinant mini-dystrophin or α1-syntrophin formed a complex with TRPC1 channels and restored normal divalent cation entry after store-depletion (7). Since the TRPC channels have the ability to form heteromeric channels, the association with other TRPC was explored. Several contributions have shown that TRPC1 and TRPC4 can associate for building a cation channel permeable to calcium (31) and showed that reducing TRPC1 and TRPC4 expression decreased the occurrence of store-operated currents recorded at the sarcolemma of muscle fibers (22).

These data and the association of TRPC1 with endogenous complex α1-syntrophin/dystrophin, prompted us to investigate if α1-syntrophin, the predominant syntrophin isoform in striated muscle, could play a crucial role in regulating the sarcolemmal cation channels supported by TRPC1 and TRPC4. We thus performed siRNA experiments in order to establish if the reduction of α1-syntrophin could result in cation influx deregulation. Deletion of the N-terminal corresponding to PH1a and PDZ domains, and forced expression of the deleted α1-syntrophin in dystrophin-deficient myotubes was also performed in order to determine if the N-terminal domain is necessary to this regulation.

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

EXPERIMENTAL PROCEDURES

cDNA constructs and recombinant proteins

Full-Length (FL) *Mus musculus* α1-syntrophin cDNA was obtained from Stephen Gee (University of Ottawa, Ottawa, Canada) and subcloned in pCMS-enhanced GFP with *Nhe*I and *Not*I restriction enzymes and with two tandem N-terminal myc epitope tags. The ΔN-α1-syntrophin was obtained by deleting a fragment of 162 pb, which corresponds to the PH1a and PDZ domains. This cDNA was ligated into bicistronic pCMS-enhanced GFP. The GST-PDZ domain (a.a. 75 to 170 of α1-syntrophin) was obtained and produced by means of the plasmid pGEX-5X-3. Recombinant proteins were prepared as GST fusion proteins in Escherichia coli (Tg1), purified using glutathione-Sepharose beads (Amersham), eluted with glutathione, and used as GST-fusion proteins.
Plasmid containing the cDNA of TRPC1 and TRPC4 were obtained from Dr. Craig Montell from The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA.

Cell culture and transfections

Experiments were performed on two cell lines: one dystrophin-deficient dys- SolC1 and the other expressing mini-dystrophin minidys+ SolD6. These cell lines were cultured as described previously elsewhere (30). Transfection was performed on proliferative myoblasts and experiments were performed on myotubes at day 3 and day 4 after initiation of myoblasts fusion. For primary cultures, the procedure was previously described elsewhere (7). Myoblasts were transfected the day of seeding in plastic dishes or glass coverslips by using the nucleofactor transfection (Amaxa, Amaxa Biosystems, Germany). One million cells were centrifuged at 90 g at room temperature for 10 min and resuspended at room temperature in nucleofector solution (nucleofactor kit V) to a final concentration 1 million cells/100 µL. The 100 µL cell suspension was mixed with plasmid solution prepared with Qiagen plasmid purification maxi kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). For single transfection of syntrophin in bicistronic plasmid, 2 µg of ΔN-α1-syntrophin-EGFP or FL α1-syntrophin-EGFP was diluted in cell suspension. For double transfection of TRPC1 or TRPC4 with EGFP, the 100 µL cell suspension was mixed with 1 µg pmaxGFP and 5 µg TRPC1 or TRPC4 plasmids. The cell suspension was submitted to a pulse protocol (Amaxa B-032, kit V) for nucleotransfection (Amaxa, Amaxa Biosystems, Germany). 500 µL of pre-warmed culture medium was added and supplemented to transfected cells and the mix was added to the myoblasts.

Silencing of α1-syntrophin, TRPC1 or TRPC4 expression

We obtained mouse SolD6 myotubes with reduced α1-syntrophin expression using transient transfection of small interfering RNA (siRNA). The siRNA silencing sequence 5'-AAGGUAUGAAUGUGCCGAUCUGCGC-3' (Eurogentec, Seraing, Belgium) was designed to target mouse α1-syntrophin mRNA (NM_009228). SiRNA and its control (sequence with no homology with any known eukaryotic gene: Eurogentec) were transfected at 3 µg per 1 million of cells into SolD6 myoblasts using nucleofector transfection device. Silencing was also performed using the same transfection protocol with 3 µg of a bicistronic shRNA plasmid (SuperArray, Biosciences Corporation) encoding a short hairpin silencing sequence 5'-TGTGTTGGAGGTTAAGTACAT-3'. The bicistronic shRNA plasmid contains the shRNA under control of the U1 promotor and the EGFP cDNA to enable the identification of transfected myotubes. Silencing of TRPC1 or TRPC4 gene was performed by means of the same transfection protocol using two different siRNA sequences (Eurogentec) against mouse TRPC1 mRNA (5'-GCAUCGUAUUUCACAUUCU-3'; 5'-UGAGCCUCUUGACAAACGA-3') or against the mouse TRPC4 mRNA (5'-CCCUUUCCUUACUGCCUU-3'; 5'-CGAGUUCACUGAGUUUGU-3').

Antibodies

Antibodies against TRPC1, TRPC4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), were rabbit polyclonal antibodies (pAb) and those against α1-syntrophin were goat and rabbit pAb

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry ibc

(Abcam, Cambridge, UK). Antibodies against dystrophin were rabbit pAb (Santa Cruz Biotechnology) and NCLDYS2 mouse monoclonal (Novocastra, Newcastle, UK). Others antibodies used were mouse monoclonal anti-c-myc (Sigma-Aldrich) and mouse monoclonal anti-Flag M2 antibody (Sigma-Aldrich). Secondary antibodies for immunofluorescence were RRX-conjugated Affinity Pure Goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA) and Fluoprobes 488-anti-mouse IgG antibodies (FluoProbes, Interchim, Montluçon, France). Secondary antibodies for Western blotting were obtained from Amersham Biosciences Corp: HRP-conjugated goat anti-mouse IgG and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG.

Pull-Down Assays

Total cell lysates were obtained from minidys+ SolD6. Cells were washed three times in cold TBS 1X (20 mM Tris Base pH: 7.4, 154 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA) and then lysed in 1 mL of lysis buffer RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay: 50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05 % NP-40 (w/v), 1 % DOC (w/v), 1 % Triton X-100 (v/v), 0.1 % SDS (w/v) in the presence of 1 % of a protease inhibitor cocktail (1 mM PMSF, 20 mM leupeptine, 0.8 mM aprotinine and 10 mM pepstatine). Protein lysates were homogenized by a mechanical dissociation. The total protein concentration was measured by means of a Biorad DC protein assay kit. Glutathione S-transferase (60 µg) or fusion protein consisting of GST and α1-syntrophin PDZ domain (60 µg) were incubated with 600 µg of cell lysates in a volume of solubilisation buffer NET (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.05 % Nonidet P-40 (v/v)) at 4°C overnight with constant mixing, followed by a washing (3 times) in NET. The bound proteins were eluted in an equal volume (20 µL) of loading buffer and heated for 5 min at 90°C. The bound proteins were subjected to 10 % SDS–PAGE, blotted and probed with an anti-TRPC1 or anti-TRPC4 antibody.

Immunoprecipitation

After cell lysis, 2 µg of antibody was added to 200 µL of cell lysates diluted with 600 µL of solubilisation buffer (NET) and incubated at 4°C overnight with constant mixing. Then, the complex protein-antibody was incubated for 1 h at 4°C with constant mixing with 40 µL of protein A/G Sepharose (Amersham). The immune complexes were collected by centrifugation and washed 3 times in NET. After denaturing, samples were subjected to SDS-PAGE, blotted with antibodies against dystrophin, TRPC1, TRPC4, c-myc, α1-syntrophin, probed for 1h with 1:3000 horseradish peroxydase conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Amersham) and developed with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham). The molecular weight of proteins was estimated according to pre-stained protein markers (Rainbow, Sigma-Aldrich).

Immunological staining

The cultured cells were fixed in freshly made TBS/4 % ParaFormAldehyde for 20 min and permeabilized with TBS/0.5 % Triton X-100. A saturation step was executed with TBS/ 1 % BSA. Samples were incubated for 1 h with primary antibodies diluted in TBS/1% BSA (20 mM Tris base, 154 mM NaCl, 2 mM EGTA, and 2 mM $MgCl_2$, pH 7.5). After washing out in TBS, cells were incubated for 1 h in TBS/1% BSA with secondary antibodies. The cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector, Burlingame, CA, USA). Muscle tissue were fixed by perfusion of TBS/4 % ParaFormAldehyde in situ for 30 min. Skeletal muscles were removed by dissection from 4 weeks old mice and immediately fixed with 3% paraformaldehyde/0.1M phosphate buffer pH 7.4 for 1h at 4°C. Fixed tissue was infused with 30% sucrose solutions in PBS (20 mM phosphate buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl) overnight at 4°C. Cryosections of muscle fibers were immunolabeled overnight at 4°C for indirect immunofluorescence with primary antibodies diluted at 2-5 µg/ml after 4 hours of blocking solution (TBS/1 % BSA). The immunolabelled samples were examined using an Olympus IX71 epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) 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

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry ibc

with Olympus UplanSapo x 60 water, 1.2 NA, objective lens. Fluorophores were excited with 488 nm line of an argon laser (for FITC), 543 nm line of a HeNe laser (for TRITC). The emitted fluorescence was detected through spectral detection channels between 500-530 nm and 550-625 nm, for green and red fluorescence respectively.

Measurement of cation influx using Mn^{2+} quenching of fura-2 fluorescence

Myotubes of 3 or 4 days were rinsed with external 1.8 Ca^{2+} solution (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, pH 7.4, with NaOH) and incubated for 30 min in darkness and then for 15 min at 37°C in the same solution supplemented with 3 µM (final concentration) of fura-2/AM (FluoProbes). Loaded cells were washed with Ca^{2+}-free solution (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.8 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, and 5.6 mM D-glucose, pH 7.4 with NaOH) before measurements. Fura-2 was excited at 360 nm with a CAIRN monochromator (Cairn Research Limited, Faversham, UK), and emission fluorescence was monitored at 510 nm using intensified cooled CCD camera (Photonic Science Limited, Robertsbridge, UK) coupled to an Olympus IX70 inverted microscope (x40 water immersion fluorescence objective). Transfected cells were located by EGFP fluorescence at 520 nm with excitation at 450 nm. The cation influx was evaluated by the quenching of fura-2 fluorescence at 360 nm when Mn^{2+} ions enter the cell. Fluorescence variations were recorded with the Imaging Workbench 4.0 (IW 4.0) software (Indec BioSystems, Mountain View, CA, USA). The depletion protocol was three times one minute application of 0 Ca^{2+} 15 µM CPA (CycloPiazonic Acid: reversible inhibitor of SERCA) alternate by three times one minute application of 0 Ca^{2+} 5 µM CPA+10 mM caffeine solution. The quench rate of the fluorescence intensity was estimated using linear regression of the decaying phase (slope) during the first 40 s after Mn^{2+} addition (50 µM final). The quench rate was expressed as percent per minute to correct for differences in the cell size or fluorophore loading. Statistical analysis was performed with Origin 5.0 software (OriginLab, Northampton, MA, USA). No bleaching or less than 0.5 %/min was observed during fluorescence decrease measurements. The difference between the mean values of measured parameters was statistically tested using the Student's t test and considered significant for $P < 0.05$.

Membrane potential recordings

Membrane potential was recorded at room temperature from cultured myotubes with the whole-cell patch-clamp technique. Glass micropipettes (2-5 MΩ) were connected to the headstage of the patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, Axon Instruments) driven by an IBM PC-AT compatible microcomputer equipped with an A/D-D/A conversion board (DIGIDATA 1320A, Axon Instruments). Data acquisition and analysis were performed by means of the pCLAMP software package (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Resting membrane potential (Vm) was recorded with the whole-cell patch-clamp technique using the current-clamp mode (current was clamped to zero). In this case, pipettes were filled with an internal medium containing (mM): 1 $MgCl_2$; 0.005 $CaCl_2$; 1 EGTA; 140 KCl; 10 Hepes; pH 7.2 with KOH. The external medium was composed of (mM): 0.8 $MgCl_2$; 1.8 $CaCl_2$; 5.6 glucose; 10 Hepes; 130 NaCl; and 5.4 KCl; pH 7.4 with NaOH.

RT PCR

Reverse Transcription. Total cellular RNA was extracted using RNABle kit (Eurobio). RNAs (10 µL) were reverse transcribed in 25 µL reaction mixture consisting of first strand buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 37.5 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$), 10 mM DTT, 1 mM each dNTP, 2.4 mg of random hexamers, 40 U RNase inhibitor (RNA guard, Amersham Biosciences), and 400 U M-MLV reverse transcriptase (GIBCO-BRL). Reverse transcription was performed at 37°C for 60 min followed by 2 min at 100°C. The solution was then diluted twice in water.

Real-time PCR. The 15 µL reaction mixture contained 7.5 µL 2x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), 5 µL of RT products, and appropriate primers and probes (900 nM and 200 nM, respectively). All probes contained a 3' TAMRA (6-carboxy-

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

tetramethylrhodamine) quencher dye and were labelled at the 5' end with a FAM (6-carboxyfluorescein) reporter fluorescent dye. Amplification was performed at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C (15 s) and 60°C (1 min). Reactions were performed in MicroAmp optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems) using an ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). All measurements were normalized to the mitochondrial ribosomal protein S6 (Mrps6, an endogenous control) to account for the variability in the initial concentration and quality of the total RNA.
for α1-syntrophin : Forward primer: 5'-ACT-GAC-CCA-GAG-CCC-AGG-TA-3'; Reverse primer: 3'-TTG-GCC-CTC-AAG-AAG-ACA-GC-5'; Probe: [5']6-FAM CCT-GGC-CGT-CCG-CTG-CAC-AGA-T [3']TAMRA. for SP6 protein control : Forward primer: 5'-TTT-GAT-TCT-GAA-AGC-CAT-GCG-3'; Reverse primer: 3'-CGG-TCC-ATC-AGG-GAT-TCT-ATT-G-3'; Probe: [5']6-FAM CGG-CCA-GAG-ACC-GCT-GCT-GCT [3']TAMRA.

RESULTS

siRNA inhibition of α1-syntrophin expression leads to abnormal increase of divalent cation influx in myotubes. In order to demonstrate that the expression level of α1-syntrophin at the sarcolemma is crucial for regulating cation influx, α1-syntrophin expression was repressed with small interference RNAs (siRNAs). Myoblasts were transfected with siRNA duplex targeting α1-syntrophin mRNA, and 3 days differentiated minidys+ SolD6 myotubes were tested for expression level of α1-syntrophin mRNA. We observed a drastic extinction by 93 % of the α1-syntrophin transcript value in cells transfected with siRNA against α1-syntrophin compared to cells transfected with a non-targeting siRNA pool (siRNA ghost) (Fig. 1A). α1-syntrophin protein level was determined by Western Blotting (WB) (Fig. 1B). Ratio of α1-syntrophin to mini-dystrophin (minidys) proteins was expressed as a percentage. Immunoblots showed siRNA α1-syntrophin decreased protein expression by 61 % in transfected minidys+ SolD6 myotubes. The low expression of α1-syntrophin at the sarcolemma was confirmed by immunofluorescence labeling. The α1-syntrophin was detected at the sarcolemma of minidys+ SolD6 myotubes but not in samples obtained from transfected cells with siRNA α1-syntrophin (Fig. 1C).
The impact of α1-syntrophin repression was tested on the association of this protein with dystrophin-based cytoskeleton. Minidys+ SolD6 muscle cells were transfected with siRNA against α1-syntrophin and coimmunoprecipitation experiments were performed to isolate macromolecular complexes from three days myotubes. Protein extracts were incubated with anti-α1-syntrophin antibody for immunoprecipitation and probed with anti-dystrophin antibody (Fig. 2A, upper line). The amount of mini-dystrophin coimmunoprecipitated with α1-syntrophin is decreased by 57 % in siRNA transfected myotubes. This result is in accordance with the diminution of α1-syntrophin protein expression shown in Fig. 2A, lower line. The drastic extinction of α1-syntrophin is accompanied with a loss of TRPC1/α1-syntrophin complex, as shown by the absence of TRPC1 immunoprecipitated with α1-syntrophin (Fig. 2B).
Minidys+ SolD6 myotubes were transfected with siRNA against α1-syntrophin in order to determine the impact of the loss of α1-syntrophin on cation influxes after three days of differentiation. Divalent cation entry was stimulated after partial store-depletion by repetitive activation of calcium release by caffeine (10 mM) and in the presence of CPA, a SERCA inhibitor. After the stores were depleted by this procedure, 50 µM manganese ions were readmitted in the extracellular space, that induced a store-operated influx of divalent cations reflected by the progressive quenching of fura-2 fluorescence by Mn^{2+} (Fig. 2C). All values of the quenching rate were expressed in absolute value. This divalent cation entry was previously shown to be blocked by 40 µM of SKF-96365 a cation channels inhibitor (7). It must be noticed that when 50 µM manganese ions were readmitted without depletion of the stores, a Mn^{2+} decreasing phase of fura-2 fluorescence was recorded (6.0 %/min ± 0.2, n=131 in non-stimulated minidys+ SolD6 myotubes), which was not affected by SKF-96365 (data not shown). This influx is represented throughout the paper in all bar graphs under the dotted line. The values of cationic influx are thus the result from a store-

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

operated cation entry sensitive to SKF-96365 and from a background cation entry insensitive to SKF-96365. After depletion, resulting divalent cation entry were greatly increased in transfected cells with α1-syntrophin siRNA (24 %/min ± 0.9, n=81) as compared with untransfected SolD6 myotubes (control cells: 13.5 %/min ± 0.5, n=74) or with transfected cells with non-targeting siRNA pool (15.1 %/min ± 0.6, n=28) (Fig. 2D). Incidentally, α1-syntrophin silencing led to divalent cation influx, which tended to similar levels to the cation influxes recorded in dystrophin-deficient cells (dys- SolC1: 28.1 %/min ± 0.8, n=115). A shRNA plasmid encoding a silencing shRNA targeted to another sequence of α1-syntrophin mRNA was also used in order to rule out off-targets effects. Transfection with the shRNA plasmid resulted also in expression of EGFP, which allows identifying transfected cells. When transfection resulted in 30 % of myotubes expressing EGFP, quantification of α1-syntrophin by immunoblots performed on total protein lysate showed a 35 % decrease in protein level. The cation influx was recorded on shRNA transfected myotubes expressing EGFP (data not shown). The analysis of these recordings showed a 86 % increase in divalent cation influx, which is similar to results obtained after silencing with siRNA (77 % increase). These data demonstrate that the loss of α1-syntrophin severely increases divalent cation entry in muscle cells and alters the regulation by mini-dystrophin. This result suggests a crucial role of α1-syntrophin in regulation of cation influx by the dystrophin-based cytoskeleton.

Requirement of α1-syntrophin PH1a and PDZ domains (N-terminal) for regulation of divalent cation entry in myotubes. The syntrophins are a family of scaffolding proteins that contain four distinct domains (Fig. 3A). The N-terminal part contains a half Pleckstrin Homology domain (PH1a), and a PSD-95, Discs-large, ZO-1 (PDZ) domain. An expression vector was developed encoding for a truncated α1-syntrophin lacking the PH1a and PDZ domains called ΔN-α1-syntrophin-EGFP (ΔN-α-synt) (Fig. 3A) aiming to evaluate the functional role of such two domains.

An immunostaining of α1-syntrophin was performed in order to estimate the overexpression of the truncated protein ΔN-α-synt in transfected minidys+ SolD6 myotubes compared to untransfected cells and to observe its localization despite the absence of the N-terminal of α1-syntrophin. When cells were transfected with the plasmid also encoding for EGFP, the ΔN-α1-syntrophin was clearly concentrated at the sarcolemma (Fig. 3B), as well as the staining of transfected FL (Full-Length) α1-syntrophin (Fig. 3C), while EGFP expression was observed in the cytoplasm. The immunofluorescent staining of ΔN-α1-syntrophin was strongly increased at the sarcolemma compared to the one obtained from endogenous α1-syntrophin (Fig. 3D). Despite the absence of the N-terminal part, it appears that the truncated α1-syntrophin is normally targeted to the sarcolemma of myotubes expressing dystrophin.

The truncated α1-syntrophin was transiently transfected in normal minidys+ SolD6 myotubes (Fig. 3E) and also in dystrophic dys-SolC1 myotubes (Fig. 3F) and the consequences on cation influx were explored by measuring store-operated divalent cation influx in myotubes four days after initiation of differentiation. The green fluorescence of myotubes was used to identify transfected cells with pCMS-enhanced GFP plasmid expressing both EGFP and recombinant ΔN-α1-syntrophin independently. No significant variation in the rate of quenching of fura-2 (reflecting divalent cation entry) were observed in control minidys+ SolD6 myotubes expressing recombinant ΔN-α-synt (15.8 %/min ± 0.9, n=52) compared to untransfected cells (14.7 %/min ± 0.4, n=124). As described previously, dystrophin-deficient myotubes displayed higher levels of cation influx than myotubes expressing mini-dystrophin (7). Forced expression of ΔN-α-synt in dystrophin-deficient myotubes did not reduce divalent cation influx (25.5 %/min ± 1.5, n=30) compared to untransfected dystrophin-deficient SolC1 myotubes (28.1 %/min ± 0.8, n=115). By contrast, the cation influx was significantly reduced into myotubes transfected with FL-α1-syntrophin (13.0 ± 1.0, n=28). Results with FL-α1-syntrophin confirm our previous observation in Vandebrouck et al., 2007 (7). These data suggest that the N-terminal part of α1-syntrophin is mediating the regulation of cation entry in muscle cells.

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

Endogenous TRPC4 interacts with sarcolemmal TRPC1 in muscle and cultured myotubes. Formation in skeletal muscle cells of heterotetrameric channels associating TRPC1 and TRPC4 was explored since the use of antisense previously suggested that store-operated calcium currents recorded in fibers were dependent on the expression level of TRPC1 and TRPC4 channels (22). Moreover, TRPC1 translocation into plasma membrane has been shown to depend upon the expression of TRPC4 at the membrane (32). Fig. 4A shows representative images obtained with confocal fluorescence microscopy, illustrating TRPC4 and TRPC1 localization in differentiated minidys+ SolD6 myotubes, in myotubes from C57BL/10 mice primary cultures and in C57BL/10 fibers. Higher magnifications revealed strong staining along the sarcolemma and punctuate intracellular staining of TRPC4 and TRPC1 in myotubes. Substantial staining of TRPC1 in striated pattern was observed in muscle fibers and TRPC4 and TRPC1 were also distributed along the sarcolemma as shown by the costaining of dystrophin (Fig.4A), which is in agreement with data described previously (22). These immunostainings show that these two types of channels are localized at the same sarcolemmal area in skeletal muscle, and may form plasma membrane channels associated with costameres.

This result illustrates sarcolemmal localization of TRPC4 and TRPC1 which suggests a possible molecular association. In order to demonstrate that TRPC1 and TRPC4 are forming a complex in muscle cells, coimmunoprecipitation assays were performed. Western blots probed with TRPC1 and TRPC4 antibodies (Fig. 4B) revealed that TRPC1 was coimmunoprecipitated with TRPC4 (IP lane: TRPC4) and conversely TRPC4 was coimmunoprecipitated with TRPC1 (IP lane: TRPC1) in normal C57BL/10. These results show that TRPC1 and TRPC4 form a stable complex in muscle cells, and may form a heterotetrameric channel along the sarcolemma.

TRPC1 and TRPC4 are involved in divalent cation influx in cultured myotubes. To address the issue of determining whether TRPC1 and TRPC4 are supporting the store-operated cation entry recorded in skeletal muscle cells, we first used overexpression strategy and secondly RNA interference strategy to decrease endogenous TRPCs mRNA level with further assessments of its impact on cation influx.

Exogenous myc-tagged TRPC4 and flag-tagged TRPC1 were transfected in minidys+ SolD6 myotubes and consequently immunostained with GAM-Alexa488 secondary antibody. The staining of TRPC1 and TRPC4 was enriched along the sarcolemma of myotubes, confirming that TRPC1 and TRPC4 are forming channels at the sarcolemmal compartment (Fig. 5A).

Myoblasts were co-transfected by nucleofactor technology (Amaxa) with flag-tagged TRPC1 or myc-tagged TRPC4 plasmids and a plasmid expressing only EGFP called pmaxGFP with a ratio of 1 µg pmaxGFP for 4 µg flag-tagged TRPC1 or myc-tagged TRPC4. The GFP plasmid was used to identify transfected myotubes with TRPC1 and TRPC4. As shown before in Fig. 5A, the distribution of transfected TRPC1-flag and TRPC4-myc was examined in minidys+ SolD6 myotubes showing a clear concentration of these proteins at the sarcolemma.

Divalent cation influx was explored after the recombinant TRPC1 or TRPC4 were transiently transfected in minidys+ SolD6 myotubes (Fig. 5B). The recordings of store-operated divalent cation influxes showed a large increase of divalent cation entry in myotubes expressing either recombinant TRPC1 (24.3 %/min ± 1.8, n=16) or TRPC4 (22.8 %/min ± 1.9, n=28) compared to control myotubes (14.7 %/min ± 0.4, n=124). Therefore, overexpression of TRPC1 and TRPC4 appeared to enhance divalent cation influx recorded in myotubes stimulated by a store-depletion protocol.

Moreover, cultured myoblasts were transfected by nucleofection with siRNA against TRPC1, and on the other hand with siRNA against TRPC4 (Fig. 5C and D). The consequences on protein level and on store-operated cation entry were explored respectively by western blot (Fig. 5C) and by measuring cation influx in differentiated myotubes three days after initiation of differentiation (Fig. 5D).

Western Blot analysis showed a large decrease of TRPC1 expression by 89 % and TRPC4 expression by 84 % in minidys+ SolD6 myotubes transfected with TRPC1 and TRPC4

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

siRNAs compared to control cells, confirming TRPC1 and TRPC4 knockdown at the protein level.

Alterations of endogenous TRPC1 protein appear to decrease store-operated cation influx (siRNA TRPC1: 9.3 %/min ± 0.5, n=42) as well as TRPC4 siRNA (9.5 %/min ± 0.7, n=27) compared to the control cells value (13.5 %/min ± 0.5, n=74). In other words TRPC1 knock-down resulted in a 31 % inhibition of divalent cation influx in myotubes. Similarly TRPC4 silencing resulted in a 30 % inhibition of divalent cation influx. This shows that at least part of the divalent cation influx recorded in myotubes after store-depletion is supported by TRPC1 and TRPC4. Taking into account the background non store-operated cation entry recorded in non-depleted myotubes (6.0 %/min), the remaining store-operated component of cation entry is 41 % and 44 % after TRPC1 and TRPC4 knock-down respectively (Fig. 5D). This remaining component after siRNA treatment could be supported by residual TRPC1 and TRPC4 expression or other types of store-operated channels. In order to rule out off-targets effects, two different siRNA designed against different targets in TRPC1 and TRPC4 mRNA were used, giving similar results in inhibition of divalent cation entry (not shown).

These results further suggest that TRPC1 and TRPC4 are an important subunit of functional native divalent cation channels in cultured myotubes and this influx is dependent on store-depletion. TRPC1 was shown to form a SOC with STIM1 + Orai1, which is inhibited by 1 µM Gd^{3+} (33). In order to know the involvement of STIM/Orai in the influx recorded in cultured myotubes, 1 µM Gd^{3+} was used to inhibit STIM/Orai pathway. The divalent cation influx measured after store depletion was insensitive to 1 µM Gd^{3+} (Fig. S2). Similarly, this inhibitor had no effect on abnormal cation influx measured in minidys+ SolD6 transfected with α1-syntrophin siRNA. On the contrary, administration of 10 µM Gd^{3+} (a powerful inhibitor of cation channels) lead to a drastic reduction of cation influx (Fig. S2).

In order to determine if the two isoforms of TRPC are involved in the divalent cation entry regulated by the expression of α1-syntrophin, experiments with double siRNAs against α1-syntrophin and TRPC1 were performed in minidys+ SolD6 myotubes, as well as with siRNAs against α1-syntrophin and TRPC4. Reduction of protein level was confirmed by western blot after double silencing (not shown). The quenching results in Fig. 5E demonstrate that abnormal influxes measured when α1-syntrophin was knock-down (24.0 %/min ± 0.9, n=81) were decreased after double extinction of α1-syntrophin and TRPC1 (12.6 %/min ± 0.6, n=59) or of α1-syntrophin and TRPC4 (14.2 %/min ± 0.7, n=64). The repression of TRPC1 or TRPC4 counteracted the increase of cation influx resulting from repression of α1-syntrophin. Therefore, these data clearly show that divalent cation entry regulated by α1-syntrophin expression level is dependent on both TRPC1 and TRPC4 in cultured myotubes.

L-type calcium channels are not involved in divalent cation influx. In order to discriminate non voltage-dependent calcium channels to voltage-dependent calcium channels, nifedipine (5 µM) was used to selectively block calcium L-type components ($ICa_{,L}$). Nifedipine was administrated at the same time as Mn^{2+} solution. The divalent cation influx measured after store depletion was insensitive to nifedipine (Fig. S1), as shown by the absence of effect of this compound on the divalent cation influx recorded in minidys+ SolD6 myotubes (14.5 %/min ± 0.9, n=76 with nifedipine and 14.7 %/min ± 0.4, n=124 in control). On the contrary, a large component of divalent cation influx was sensitive to 40 µM SKF-96365, a store-operated channel inhibitor, in minidys+ SolD6 myotubes (7.6 %/min ± 0.5, n=41). This pharmacological tool demonstrates that $ICa_{,L}$ is not participating in cation entry in this experimental conditions. Moreover, we recorded the resting membrane potential after the depletion protocol in minidys+ SolD6 myotubes, and obtained a mean value of -61 mV. The depletion protocol leads to low depolarisation (around 6 mV depolarization for minidys+ SolD6 and around 4 mV depolarization for dys-SolC1), but the membrane potential remains underneath the activation-threshold of L-type calcium channels which is normally around -30 mV in human (34;35) and rat (36) myotubes, and in wild type fibers (37). Nifedipine was used in minidys+ SolD6 transfected with α1-syntrophin siRNA (Fig. S1). Nifedipine had no effect on abnormal cation influx measured

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

when α1-syntrophin expression was inhibited (25 %/min ± 2.1, n=43). This shows that in absence of α1-syntrophin, the abnormal cation influx is not due to L-type calcium channels activity. Moreover, the knockdown of α1-syntrophin, in minidys+ SolD6 transfected with α1-syntrophin siRNA, did not change significantly the resting membrane potential. Indeed, the resting potential was slightly more negative compared with control minidys+ SolD6 (around 3 mV hyperpolarization). It is interesting to note that in dystrophin-deficient myotubes, the resting potential was also more negative compared with minidys+ SolD6 myotubes (around 8 mV hyperpolarization). The values of membrane potential in cultured myotubes are represented in table I.

TRPC4 is associated with the α1-syntrophin/dystrophin-based cytoskeleton in muscle and cultured myotubes. The plasmid encoding for FL α1-syntrophin-myc was transfected in minidys+ SolD6 muscle cells in order to explore the interaction of the scaffolding protein with endogenous TRPC4. Protein lysates were incubated with anti-TRPC4, anti-dystrophin, anti-myc antibodies for immunoprecipitation and probed with anti-myc antibody. Fig. 6A shows that the recombinant α1-syntrophin coimmunoprecipitated with TRPC4, which suggests that recombinant α1-syntrophin forms a macromolecular complex with endogenous TRPC4 in cultured myotubes. TRPC4 contains a conserved sequence at the C-terminal (three aa: TRL, 38) suggesting that TRPC4 might interact with a common PDZ domain. Therefore, we tested if TRPC4, like TRPC1 (7), interacts with α1-syntrophin PDZ domain. Fig. 6B shows that TRPC4 from lysates of minidys+ SolD6 myotubes can bind to GST fusion protein containing PDZ domain of α1-syntrophin, like TRPC1 from the same lysates (Fig. 6B).

In order to test whether endogenous TRPC4 associates with α1-syntrophin and dystrophin in muscle cells, we looked for this complex by coimmunoprecipitation assays with lysates from C57BL/10 and from cultured myotubes.

Fig. 6C represents immunoblots revealed by polyclonal TRPC4 and TRPC1 antibodies. A band around 117 kDa, corresponding to TRPC4, was detected in the anti-dys, anti-α-synt, and anti-TRPC1 precipitates from C57BL/10 muscle. Conversely, the immunoblot, revealed by polyclonal TRPC1 antibody, demonstrates a band around 90 kDa corresponding to TRPC1 with anti-dys, anti-α-synt and anti-TRPC4 precipitates. These results clearly show that endogenous TRPC4 interacts with TRPC1 channels in C57BL/10 muscle cells, but also with the dystrophin/α1-syntrophin complex. It shows for the first time that mature mice muscles have a macromolecular complex containing TRPC1 and TRPC4 channels linked to the cytoskeletal dystrophin/α1-syntrophin complex. Fig. 6D shows immunoblottings of α1-syntrophin and dystrophin in minidys+ SolD6 myotubes. A band corresponding to α1-syntrophin was present with immunoprecipitate of TRPC4 and a band corresponding to the 230 kDa mini-dystrophin was detected in immunoprecipitate of TRPC4. These results are in agreement with those of Fig. 6C. In cultured cells expressing mini-dystrophin, a macromolecular complex is constituted between mini-dystrophin, α1-syntrophin and endogenous TRPC4 as well as TRPC1 (7). The same macromolecular complex is formed in mini-dystrophin expressing myotubes than in mature muscles.

DISCUSSION

In this study, we present new evidence for a crucial role of α1-syntrophin in regulating TRPC1 and TRPC4-dependent cation influx in skeletal muscle cells. We demonstrate the interaction of TRPC1 and TRPC4 channels with α1-syntrophin and the PDZ domain. Moreover we show the requirement of this domain and of the presence of α1-syntrophin in the DAPC for normal regulation of TRPC-dependent cation entry.

Several studies performed with dystrophin-deficient mice or human muscles, have suggested that the DAPC could regulate the activity of sarcolemmal cation channels responsible of sustained calcium influx (39). Among these voltage-independent channels with higher activity in dystrophin-deficient muscle, TRPC1 or TRPC4 (22) have been shown to support sarcolemmal calcium currents spontaneously active and also activated by treatment with thapsigargin or caffeine. We previously showed that in dystrophin-deficient myotubes displaying higher cation entry, transfected mini-

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

dystrophin formed a complex with TRPC1 and α1-syntrophin and reduced the cation influx (7). Transfection of a recombinant α1-syntrophin was also shown to be able to reduce abnormal cation entry in dystrophin-deficient muscle cells, suggesting that recombinant α1-syntrophin restores the regulation of cation channels independently of dystrophin.

We show here that the regulation obtained with full-length α1-syntrophin is lost when the N-terminal part of the scaffolding protein is deleted, which suggests a specific role of the PDZ domain. Moreover, a recombinant GST-PDZ domain of the scaffolding protein was able to bind TRPC1 and TRPC4. These observations are in favor of a central role of α1-syntrophin in regulating the sarcolemmal cation channels by a PDZ domain-mediated interaction. This was already proposed in the case of γ_2-syntrophin for the regulation of SCN5A channels (40).

In the present study, the requirement of α1-syntrophin for regulating cation entry is supported by the effects of repressing α1-syntrophin expression with siRNA. Indeed, α1-syntrophin-deficient myotubes displayed a dysregulation of cation influx similar to the one measured in dystrophin-deficient myotubes. These new data suggest that α1-syntrophin plays a central and essential role in mediating the regulation of sarcolemmal cation channels by the DAPC. Moreover, we showed that the N-terminal part of α1-syntrophin containing the PDZ domain is necessary for this regulation. In normal muscle, dystrophin may constitute the scaffold for recruiting α1-syntrophin near the sarcolemmal cationic channels, which constitutes a signaling complex supporting a PDZ-mediated regulation of the cation entry during the activity of muscle cells. We previously demonstrated that TRPC1 channels were forming a stable molecular complex with native dystrophin and α1-syntrophin in normal muscle (7). Showing the association of TRPC1 with caveolin-3, another component of the DAPC, a recent work from another group (41) confirmed our previous finding (7) in which TRPC channels in skeletal muscle are part of a costameric macromolecular complex. Our new data provide compelling evidence that TRPC4 channels are also interacting with this macromolecular complex associated with the DAPC. In dystrophic muscles the absence of dystrophin results in a reduction at the sarcolemma of α-syntrophin (3), of nNOS (42;43) and aquaporin-4 (44). Our results suggest that the drastic decrease of α1-syntrophin at the sarcolemma observed in dystrophin-deficient muscles could participate in the deregulation of slow calcium influx involved in the physiopathology of DMD.

The present study provides evidence that the sarcolemmal cation channels regulated by the α1-syntrophin are constituted at least of TRPC1 and TRPC4 proteins. (*i*) Firstly, native TRPC4 channels can be coimmunoprecipitated with TRPC1 channels and both channels are present at the sarcolemma of muscle cells as shown by immunofluorescence. When transfected, recombinant TRPC1 and TRPC4 channels can be expressed at the sarcolemma of differentiated myotubes. (*ii*) As for TRPC1 channels, TRPC4 could be coimmunoprecipitated with dystrophin, and α1-syntrophin, or in recombinant system with mini-dystrophin and myc-α1-syntrophin. Both TRPC1 and TRPC4 are present in a macromolecular complex associated with the DAPC and both channels can be fixed *in vitro* by the PDZ-domain of α1-syntrophin. (*iii*) The level of divalent cation influx in myotubes is dependent on the expression of TRPC1 and TRPC4 channels: overexpressing TRPC1 or TRPC4 channels at the sarcolemma increased the cation entry, and on the opposite, repressing TRPC1 or TRPC4 channels decreased the cation entry which is in accordance with the observations obtained previously in sarcolemmal non-voltage dependent cation currents of muscle fibers (22). This cation entry is sensitive to SKF-96365 but is not affected by nifedipine, a voltage-dependent calcium channel inhibitor. Moreover, the repression of TRPC1 or TRPC4 channels counteracts the increase of cation influx resulting from knock-down of α1-syntrophin. These observations are clearly in favor of a PDZ domain-mediated regulation by α1-syntrophin of TRPC1- and TRPC4-dependent cation entry through the sarcolemma. TRPC1 can homodimerize through N-terminal coiled-coil motif (45), but expression studies have indicated that TRPC1 can form heterotetramers with TRPC3, TRPC4 and/or TRPC5 (46;32;47). According to other studies, TRPC1 may only form functional channels at the plasma membrane when

The Journal of Biological Chemistry ASBMB jbc

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

expressed as heterotetramers as shown e.g. from TRPC1/TRPC4 coexpression studies (32;48). Our coimmunoprecipitation assays are in favor of a heterotetrameric TRPC1/TRPC4 channel interacting with α1-syntrophin and the DAPC. Within the cytosolic region of TRPC channels, several domains could mediate the assembly of macromolecular complexes such as coiled-coil domain and PDZ-binding motifs. This latter motif has already been described for TRPC4 (49;50), which interacts with a PDZ domain in Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor (NHERF). TRPC1 and TRPC4 can be activated in non-excitable cells by the $G_{\alpha q/11}$-linked phospholipase pathway and both were also shown to form store-operated cationic channels (51;52). The study of knock-out mice has shown that some cell types from TRPC4-/- (53) or TRPC1-/- (11) displayed reduced store-operated calcium entry. Our results obtained with siRNA and overexpression experiments and the previous study using antisense oligonucleotide in muscle fibers (22) are in favor of the idea that these sarcolemmal cation channels can be triggered after a store-depletion protocol. However, depletion of intracellular calcium stores may not activate directly TRPC-dependent influx which could be regulated by intracellular calcium and other second messengers that are released after the depletion protocol. Recent papers have shown that SOCE are mainly dependent on STIM1 and Orai1 in myotubes (54) and that these proteins constitute core components of SOC. The activity of STIM1 requires ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) domain, which mediates the selective binding of STIM1 to TRPC1 and TRPC4 (55;15). Interactions among Orai1, TRPCs and STIM1 (56;16) as well as functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels (17) raised the question of STIM1 and Orai1 interactions with the sarcolemmal TRPC1 and TRPC4 channels. However, the results obtained with low concentration of gadolinium (33) suggest that in our experimental conditions TRPC-dependent influx recorded in myotubes are independent on Orai1/STIM1. STIM1 was recently shown to be required for Store-Operated Calcium Entry during sustained activity of skeletal muscles (20). The localization of STIM1 at the membrane of the sarcoplasmic reticulum suggests an interaction at the T-tubule membrane with SOCs. A complex associating Orai1, TRPC and STIM1 may thus form store-operated machinery at the triads controlling the calcium influx through the T-tubule membrane (21). It is likely that our quenching assay and partial depletion protocol do not permit to record this fast entry of cation in the restricted inter-triadic space. The sarcolemmal TRPC1/TRPC4 cation channels associated with the costameric DAPC are however at another membrane compartment and may be triggered by other mechanisms. Heterologous expression of TRPC1 has provided controversial data concerning the activation of TRPC1-supported currents by stretch (24;57). In skeletal muscle, however, other studies suggest that TRPC1 also contributes to MS channels in differentiated muscle cells (58) and in C2C12 myoblasts (59). Moreover, Stretch-Activated Currents share similar electrophysiological properties with store-operated currents when recorded at surface membrane of skeletal fibers (23). Stretch-activated currents (60;27) and osmotic activated calcium entry (61) are increased in *mdx* and DMD muscle cells lacking dystrophin and DAPC. It is thus possible that the loss of the PDZ-mediated regulation by α1-syntrophin in dystrophin-deficient muscles enhances the mechanical sensitivity of TRPC1-containing channels.

A recent study (41) also proposed that higher levels of TRPC1 and caveolin-3 at the sarcolemma of dystrophin-deficient muscle contribute to abnormal calcium influx as well as ROS and Src kinase activation. A loss of α1-syntrophin combined with higher amounts of TRPC1 and caveolin-3 could thus contribute to altered calcium influx. Interestingly, mice lacking Homer 1, another scaffolding protein, exhibited a myopathy associated with increased spontaneous cation influx dependent on TRPC1 (58). Together, these independent observations show that the regulation of TRPC1 by scaffolding proteins in skeletal muscle is critical for slow non-voltage dependent calcium entry. Moreover, diminished Homer 1 expression in dystrophic *mdx* mice may also contribute to abnormal cation channel activity in dystrophic myofibers.

Our study reinforces the idea that TRP channels form cation channels, which operate with macromolecular complexes closely associated with the cytoskeleton. Further

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

studies will be necessary for determining the composition of the costameric complex anchored to the dystrophin cytoskeleton and to determine how α1-syntrophin is controlling the activity of TRPC1 and TRPC4 channels at the sarcolemma.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CNRS, the French Ministry of Research, and by "Association Française contre les Myopathies" (AFM). We thank Dr. Craig Montell from The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore USA, for giving us the plasmid encoding for TRPC1 and TRPC4 channels. We thank Françoise Mazin for technical assistance.

REFERENCES

1. Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. (1991) *Cell* **66,** 1121-1131

2. Peters, M. F., Adams, M. E., and Froehner, S. C. (1997) *J.Cell Biol.* **138,** 81-93

3. Compton, A. G., Cooper, S. T., Hill, P. M., Yang, N., Froehner, S. C., and North, K. N. (2005) *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **64,** 350-361

4. Adams, M. E., Butler, M. H., Dwyer, T. M., Peters, M. F., Murnane, A. A., and Froehner, S. C. (1993) *Neuron* **11,** 531-540

5. Gee, S. H., Madhavan, R., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Sealock, R., and Froehner, S. C. (1998) *J.Neurosci.* **18,** 128-137

6. Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C., and Kofuji, P. (2004) *J.Biol.Chem.* **279,** 28387-28392

7. Vandebrouck, A., Sabourin, J., Rivet, J., Balghi, H., Sebille, S., Kitzis, A., Raymond, G., Cognard, C., Bourmeyster, N., and Constantin, B. (2007) *FASEB J.* **21,** 608-617

8. Yuan, J. P., Kiselyov, K., Shin, D. M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S. H., Dehoff, M. H., Schwarz, M. K., Seeburg, P. H., Muallem, S., and Worley, P. F. (2003) *Cell* **114,** 777-789

9. Lockwich, T. P., Liu, X., Singh, B. B., Jadlowiec, J., Weiland, S., and Ambudkar, I. S. (2000) *J.Biol.Chem.* **275,** 11934-11942

10. Ambudkar, I. S. (2007) *Biochem.Soc.Trans.* **35,** 96-100

11. Liu, X., Cheng, K. T., Bandyopadhyay, B. C., Pani, B., Dietrich, A., Paria, B. C., Swaim, W. D., Beech, D., Yildrim, E., Singh, B. B., Birnbaumer, L., and Ambudkar, I. S. (2007) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104,** 17542-17547

12. Varga-Szabo, D., Authi, K.S., Braun, A., Bender, M., Ambily, A., Hassock, S.R., Gudermann, T., Dietrich, A., Nieswandt, B. (2008) *Pflugers Arch* **457**, 377-387

13. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006) *Nature* **441,** 179-185

14. Wu, M. M., Luik, R. M., and Lewis, R. S. (2007) *Cell Calcium* **42,** 163-172

15. Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., and Muallem, S. (2007) *Nat.Cell Biol.* **9,** 636-645

16. Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M. X., Armstrong, D. L., and Birnbaumer, L. (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105,** 2895-2900

17. Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., and Ambudkar, I. S. (2008) *J.Biol.Chem.* **283,** 12935-12940

18. Kurebayashi, N. and Ogawa, Y. (2001) *J.Physiol* **533,** 185-199

19. Vig, M., DeHaven, W. I., Bird, G. S., Billingsley, J. M., Wang, H., Rao, P. E., Hutchings, A. B., Jouvin, M. H., Putney, J. W., and Kinet, J. P. (2008) *Nat.Immunol.* **9,** 89-96

20. Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z. S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., Ward, C. C., Seth, M., Finch, E., Malouf, N., Williams, R.

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

S., Eu, J. P., and Rosenberg, P. (2008) *Nat.Cell Biol.* **10,** 688-697

21. Launikonis, B. S. and Rios, E. (2007) *J.Physiol* **583,** 81-97

22. Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H., and Gailly, P. (2002) *J.Cell Biol.* **158,** 1089-1096

23. Ducret, T., Vandebrouck, C., Cao, M. L., Lebacq, J., and Gailly, P. (2006) *J.Physiol* **575,** 913-924

24. Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O. P. (2005) *Nat.Cell Biol.* **7,** 179-185

25. Franco-Obregon, A. and Lansman, J. B. (2002) *J.Physiol* **539,** 391-407

26. Franco-Obregon, A., Jr. and Lansman, J. B. (1994) *J.Physiol* **481 (Pt 2),** 299-309

27. Vandebrouck, C., Duport, G., Cognard, C., and Raymond, G. (2001) *Neuromuscul.Disord.* **11,** 72-79

28. Hopf, F. W., Reddy, P., Hong, J., and Steinhardt, R. A. (1996) *J.Biol.Chem.* **271,** 22358-22367

29. Boittin, F. X., Petermann, O., Hirn, C., Mittaud, P., Dorchies, O. M., Roulet, E., and Ruegg, U. T. (2006) *J.Cell Sci.* **119,** 3733-3742

30. Vandebrouck, A., Ducret, T., Basset, O., Sebille, S., Raymond, G., Ruegg, U., Gailly, P., Cognard, C., and Constantin, B. (2006) *FASEB J.* **20,** 136-138

31. Beech, D. J. (2005) *Pflugers Arch.* **451,** 53-60

32. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99,** 7461-7466

33. Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Ambudkar, I.S. (2008) *J Biol Chem* **283,** 12935-12940.

34. Rivet, M., Cognard, C., Rideau, Y., Duport, G., and Raymond, G. (1990) *Cell Calcium* **8,** 507-514

35. Imbert, N., Vandebrouck, C., Duport, G., Raymond, G., Hassoni, A.A., Constantin, B., Cullen, M.J., and Cognard, C. (2001) *J Physiol* **534,** 343-355

36. Cognard, C., Lazdunski, M., and Romey, G. (1986) *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **83,** 517-521

37. Friedrich, O., Both, M., Gillis, J.M., Chamberlain, J.S., and Fink, R.H. (2004) *J Physiol* **15,** 251-265

38. Mery, L., Strauss, B., Dufour, J. F., Krause, K. H., and Hoth, M. (2002) *J.Cell Sci.* **115,** 3497-3508

39. Hopf, F. W., Turner, P. R., and Steinhardt, R. A. (2007) *Subcell.Biochem.* **45,** 429-464

40. Ou, Y., Strege, P., Miller, S. M., Makielski, J., Ackerman, M., Gibbons, S. J., and Farrugia, G. (2003) *J.Biol.Chem.* **278,** 1915-1923

41. Gervasio, O. L., Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Phillips, W. D., and Allen, D. G. (2008) *J.Cell Sci.* **121,** 2246-2255

42. Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D. S. (1995) *Cell* **82,** 743-752

43. Chang, W. J., Iannaccone, S. T., Lau, K. S., Masters, B. S., McCabe, T. J., McMillan, K., Padre, R. C., Spencer, M. J., Tidball, J. G., and Stull, J. T. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93,** 9142-9147

44. Frigeri, A., Nicchia, G. P., Verbavatz, J. M., Valenti, G., and Svelto, M. (1998) *J.Clin.Invest* **102,** 695-703

45. Engelke, M., Friedrich, O., Budde, P., Schafer, C., Niemann, U., Zitt, C., Jungling, E., Rocks, O., Luckhoff, A., and Frey, J. (2002) *FEBS Lett.* **523,** 193-199

46. Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D. E. (2001) *Neuron* **29,** 645-655

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

47. Goel, M., Sinkins, W. G., and Schilling, W. P. (2002) *J.Biol.Chem.* **277,** 48303-48310

48. Alfonso, S., Benito, O., Alicia, S., Angelica, Z., Patricia, G., Diana, K., and Luis, V. (2007) *Cell Calcium*

49. Tang, Y., Tang, J., Chen, Z., Trost, C., Flockerzi, V., Li, M., Ramesh, V., and Zhu, M. X. (2000) *J.Biol.Chem.* **275,** 37559-37564

50. Obukhov, A. G. and Nowycky, M. C. (2004) *J.Cell Physiol* **201,** 227-23545

51. Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A. G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Luckhoff, A., and Schultz, G. (1996) *Neuron* **16,** 1189-1196

52. Philipp, S., Cavalie, A., Freichel, M., Wissenbach, U., Zimmer, S., Trost, C., Marquart, A., Murakami, M., and Flockerzi, V. (1996) *EMBO J.* **15,** 6166-6171

53. Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2001) *Nat.Cell Biol.* **3,** 121-127

54. Lyfenko, A.D., and Dirksen, R.T. (2008) *J Physiol* **15,** 4815-4824

55. Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., and Worley, P. F. (2006) *Nat.Cell Biol.* **8,** 1003-1010

56. Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D. L., and Birnbaumer, L. (2007) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104,** 4682-4687

57. Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., Martinac, B., Hamill, O.P., and Honoré, E. (2008) *Pflugers Arch Mar* **455,** 1097-1103

58. Stiber, J. A., Zhang, Z. S., Burch, J., Eu, J. P., Zhang, S., Truskey, G. A., Seth, M., Yamaguchi, N., Meissner, G., Shah, R., Worley, P. F., Williams, R. S., and Rosenberg, P. B. (2008) *Mol.Cell Biol.* **28,** 2637-2647

59. Formigli, L., Francini, F., Nistri, S., Margheri, M., Luciani, G., Naro, F., Silvertown, J.D., Orlandini, S.Z., Meacci, E., and Bani, D. (2009) *J Mol Cell Cardiol* **47,** 335-345

60. Franco, A., Jr. and Lansman, J. B. (1990) *J.Physiol* **427,** 361-380

61. Imbert, N., Vandebrouck, C., Constantin, B., Duport, G., Guillou, C., Cognard, C., and Raymond, G. (1996) *Neuromuscul.Disord.* **6,** 351-360

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Extinction of α1-syntrophin transcript and reduction of α1-syntrophin protein in minidys+ SolD6 myotubes. A. Three days differentiated minidys+ SolD6 muscle cells were harvested after transfection with siRNA against α1-syntrophin. Bars graph represent the amount of α1-syntrophin mRNA analysed by qRT-PCR (value relative to the siRNA ghost control oligo). **B.** Expression level of α1-syntrophin in minidys+ SolD6 myotubes control cells or in cells transfected with α1-syntrophin siRNA were analysed by Western Blots (WB) using an α1-syntrophin polyclonal antibody. Level of α1-syntrophin was compared to the one of mini-dystrophin (minidys) detected with a polyclonal antibody. **C.** Immunofluorescence microscopy of minidys+ SolD6 myotubes transfected with α1-syntrophin siRNA. The right panel represents a phase contrast picture of the same siRNA α1-syntrophin transfected cells in central panel. Bars = 10 µM

Figure 2: α1-syntrophin is essential for normal regulation of cation entry in cultured myotubes. A. Protein lysates from minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA against α1-syntrophin or from untransfected cells were incubated with polyclonal antibody raised against α1-syntrophin (IP: α-synt lane). Western blots of the immunoprecipitated proteins were probed with a polyclonal antibody against mini-dystrophin and a polyclonal antibody against α1-syntrophin. **B.** Protein lysates from minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA against α1-syntrophin or from untransfected cells were incubated with polyclonal antibody raised against TRPC1 (IP: TRPC1 lane) and α1-syntrophin (IP: α-synt lane). Western blots of the immunoprecipitated proteins were probed with a polyclonal antibody against α1-syntrophin and a polyclonal antibody against TRPC1. **C.** Three representative recordings of fura-2 fluorescence during perfusion of 50 µM Mn^{2+} obtained from non-transfected minidys+ SolD6 myotubes (dotted line), from a minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA against α1-syntrophin (larger grey line) and from a dystrophin-deficient SolC1 myotubes (grey line). **D.** Slopes of the Mn^{2+}-induced decreasing phase of fura-2 fluorescence were measured and expressed as % of decrease per min. Bar-graphs represent mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in control SolD6 myotubes transfected with siRNA ghost (darker grey column) and in SolD6 transfected with siRNA α1-syntrophin (grey column). The white column represents abnormally elevated cation entry in dys-SolC1 myotubes. Difference between mean values of measured parameters was determined by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$). The cationic influx measured under the dotted line represents the background cation entry insensitive to SKF-96365.

Figure 3: The N-terminal corresponding to PH1a and PDZ domains of α1-syntrophin is necessary for regulating abnormally elevated cation entry in dystrophin-deficient cultured myotubes. A. Structural diagram of Full Length (FL) α1-syntrophin and α1-syntrophin missing the PH1a and PDZ domains (ΔN), showing the relative localisation of the PH domains, the PDZ domain and the SU domain. **B, C, and D.** Differentiated minidys+ SolD6 myotubes were transfected with plasmids encoding ΔN-α1-syntrophin-EGFP and FL α1-syntrophin-EGFP. Myotubes were immunostained with Ab specific for α1-syntrophin (in red). EGFP expression in cytoplasm is shown in green. The expression level of α1-syntrophin is evaluated with the intensity of red fluorescence. Bars=10 µM. **E and F.** Minidys+ SolD6 and dys- SolC1 myotubes were transfected with the expression vector encoding ΔN-α1-syntrophin-EGFP. **E.** Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in minidys+ SolD6 myotubes transfected (grey column) with the ΔN-α1-syntrophin-EGFP or nontransfected (NT) (black column). **F.** Same experiment as in E on dys-SolC1 myotubes. The white columns represent results showing the effect of FL α1-syntrophin forced expression on cation entry, which confirms those already reported by Vandebrouck et al. (7).

Figure 4: TRPC4 and TRPC1 are present at the sarcolemma of muscle and cultured myotubes and form a stable complex in skeletal muscle. A. Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) analysis of TRPC1 and TRPC4 distribution. Immunostaining in minidys+ SolD6 cultured myotubes, in

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

dys+ C57BL/10 myotubes from primary cultures and in C57BL/10 skeletal muscle (semi-thin section). Costaining of dystrophin in skeletal muscle was obtained with a mouse monoclonal antibody, in order to show the cortical compartment of muscle fibers. Bars=10 µM. **B.** Muscle lysates were incubated with polyclonal antibodies against TRPC1 (IP: TRPC1 lane) or TRPC4 (IP: TRPC4 lane). Immunoprecipitation was carried out with Protein A Sepharose beads (PAS). Western blot of the immunoprecipitated proteins was probed with polyclonal antibodies against TRPC1 or TRPC4. Positive controls for immunoprecipitation were carried out with antibodies raised against TRPC1 or TRPC4 respectively and negative controls were performed with PAS.

Figure 5: TRPC1 and TRPC4 are involved in cation influx regulated by α1-syntrophin in minidys+ SolD6 myotubes. A. Analysis by LSCM of myc-tagged TRPC4 and flag-tagged TRPC1 immunostainings in transfected minidys+ SolD6 cultured myotubes. Bars=10 µM. **B.** Minidys+ SolD6 were transfected with the expression vector encoding TRPC1 or TRPC4. Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control minidys+ SolD6 myotubes (black column), in minidys+ SolD6 transfected with TRPC1 (white column) and with TRPC4 (grey column). Difference between mean values of measured parameters was processed by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (* = $0.01\leq P<0.05$, ** = $0.001\leq P<0.01$, *** = $P<0.001$). **C.** Histograms show efficiency of TRPC1 and TRPC4 expression after siRNA treatment. TRPC1 and TRPC4 protein levels were normalised to α-tubulin and expressed as % of control. **D.** Effect of siRNA knock-down of individual TRPC homologues on store-operated cation entry. Minidys+ SolD6 were transfected with TRPC1 or TRPC4 siRNA. Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control minidys+ SolD6 myotubes (black column) and in minidys+ SolD6 transfected with siRNA TRPC1 (white column) and with siRNA TRPC4 (grey column). Difference between mean values of measured parameters was determined by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (* = $0.01\leq P<0.05$, ** = $0.001\leq P<0.01$, *** = $P<0.001$). **E.** Effect of double siRNA knock-down of α1-syntrophin and TRPC1 and on the other hand, of α1-syntrophin and TRPC4 on store-operated cation influx in minidys+ SolD6 myotubes. Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA α1-syntrophin (grey column), in minidys+ SolD6 transfected with double siRNAs α1-syntrophin/TRPC1 (black column) and with double siRNAs α1-syntrophin/TRPC4 (white column). Difference between mean values of measured parameters was analysed by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (* = $0.01\leq P<0.05$, ** = $0.001\leq P<0.01$, *** = $P<0.001$).

Figure 6: TRPC4 associates in vitro with the PDZ domain of α1-syntrophin and forms a macromolecular complex with TRPC1, dystrophin and α1-syntrophin in skeletal muscle and cultured myotubes. A. The lysates from differentiated minidys+ SolD6 myotubes transfected with FL α1-syntrophin-c-myc-EGFP plasmid were immunoprecipitated with polyclonal antibodies against c-myc tag (IP: c-myc_p lane), TRPC4 (IP: TRPC4 lane) and dystrophin (IP: dys lane). The resulting immunoblot was probed with a monoclonal antibody against c-myc tag (IB: c-myc_m). **B.** Beads charged with GST alone or with a GST fusion protein of the PDZ domain of α1-syntrophin were incubated with protein lysates from minidys+ SolD6 myotubes. Bound proteins were immunoblotted with a polyclonal TRPC4 antibody or with a polyclonal TRPC1 antibody. The input lane was loaded with 10 % of the extract used for the pull-down. **C.** Muscle lysates from C57BL/10 muscles (input lane) were incubated with polyclonal antibodies against dystrophin (IP: dys lane), α1-syntrophin (IP: α-synt lane), TRPC1 (IP: TRPC1 lane), TRPC4 (IP: TRPC4 lane). Western blots of the immunoprecipitated proteins were probed with polyclonal antibodies against TRPC4 or TRPC1. **D.** Protein lysates (input lane) from minidys+ SolD6 myotubes were incubated with polyclonal antibodies against α1-syntrophin (IP: α-synt lane), TRPC4 (IP: TRPC4 lane) and mini-dystrophin (IP: dys lane). Western blots of the immunoprecipitated proteins were probed with polyclonal antibodies against α1-syntrophin or mini-dystrophin.

ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

The Journal of Biological Chemistry
ASBMB
ibc

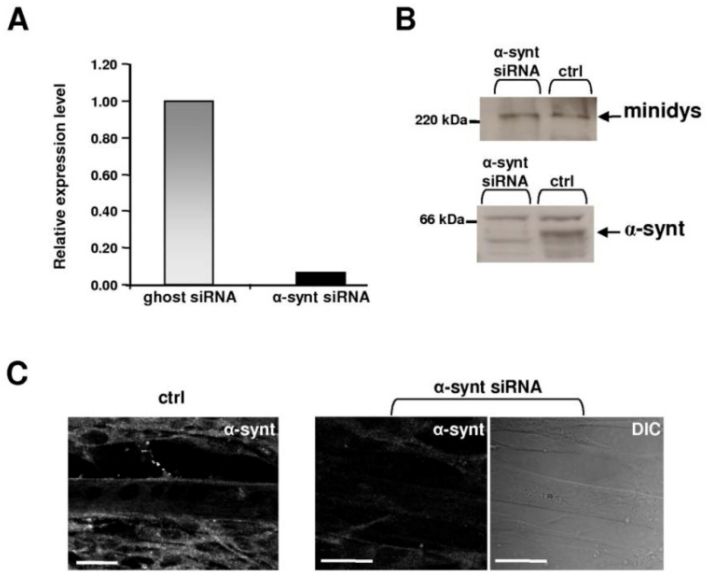


Figure 1

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB
The Journal of Biological Chemistry
jbc

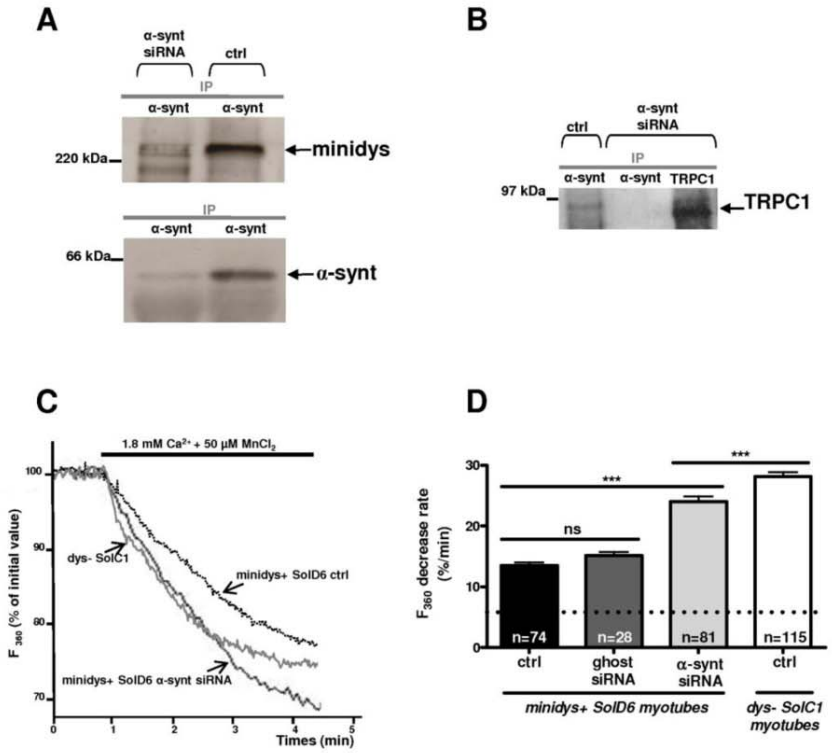


Figure 2

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB
The Journal of Biological Chemistry
jbc

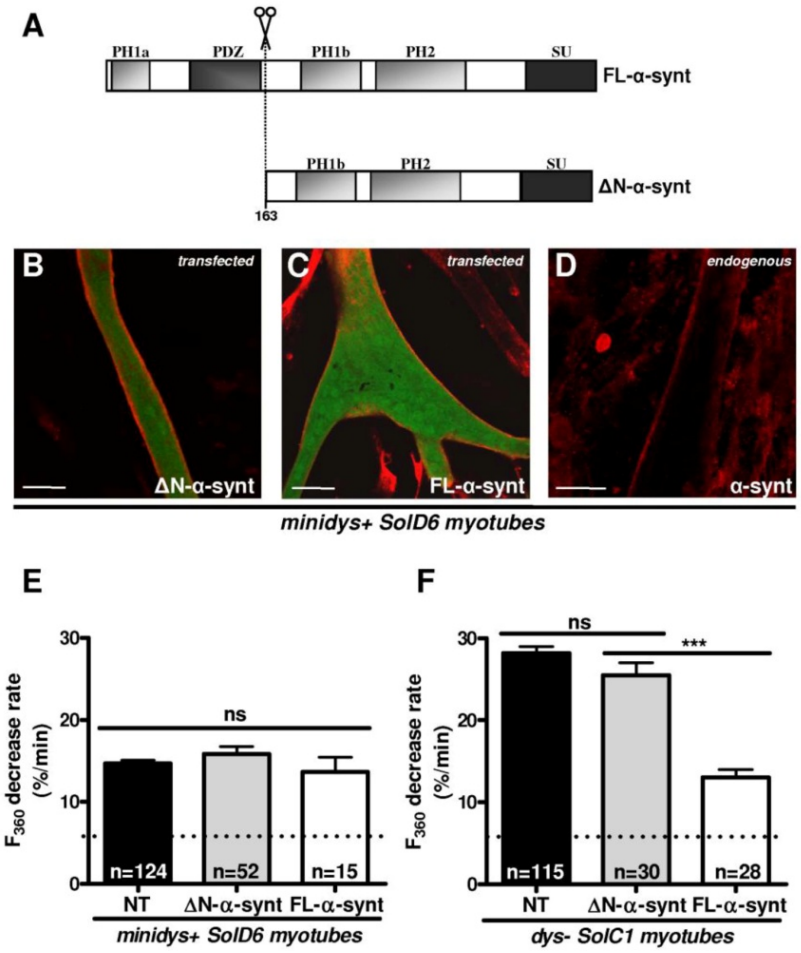


Figure 3

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB
The Journal of Biological Chemistry
jbc

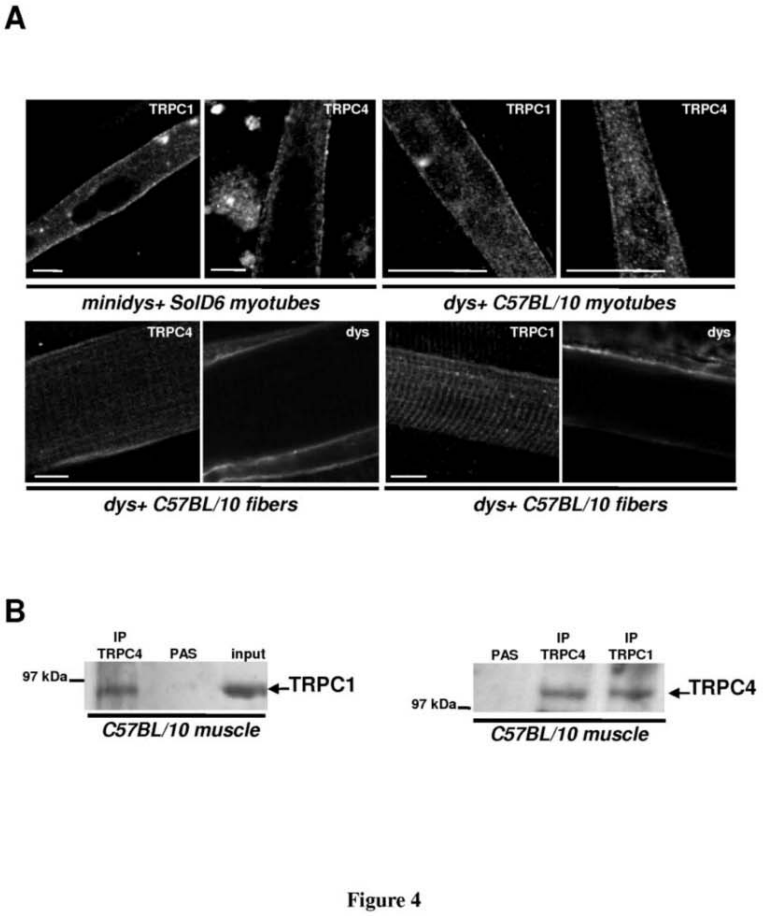


Figure 4

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

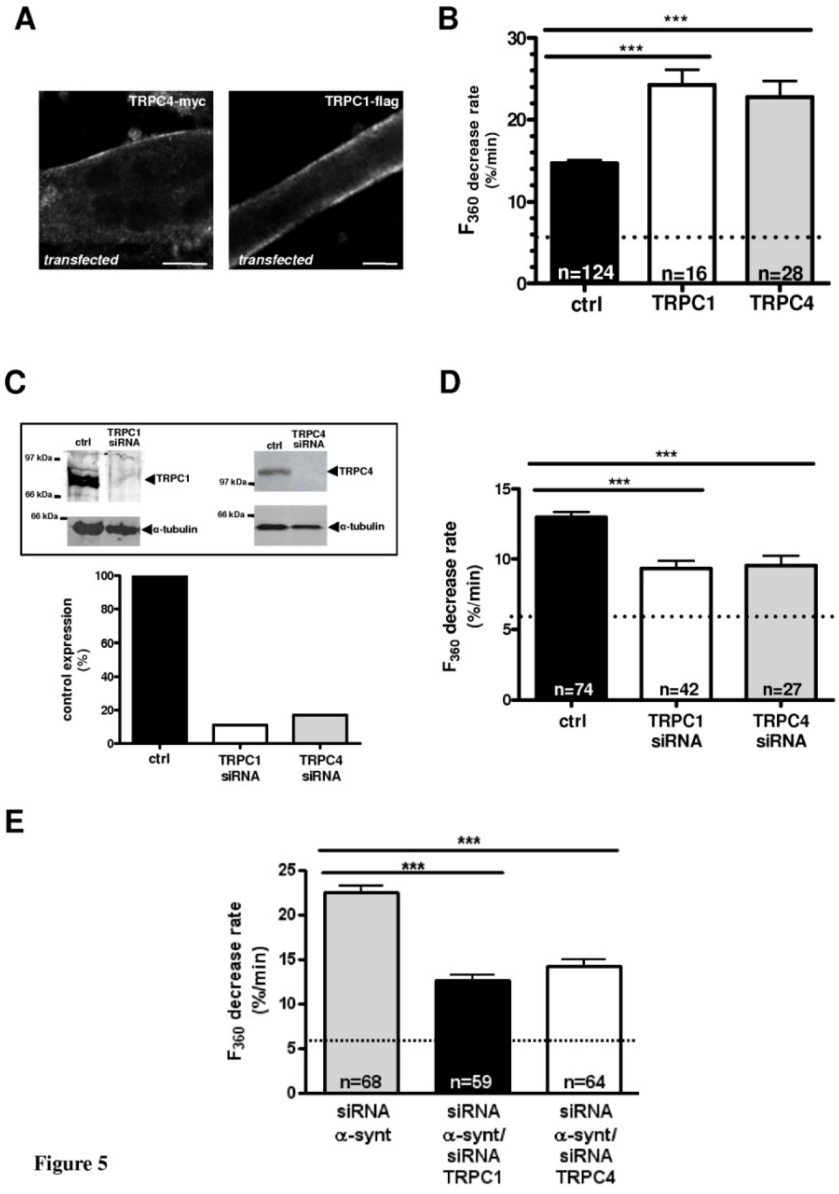


Figure 5

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

ASBMB
The Journal of Biological Chemistry
jbc

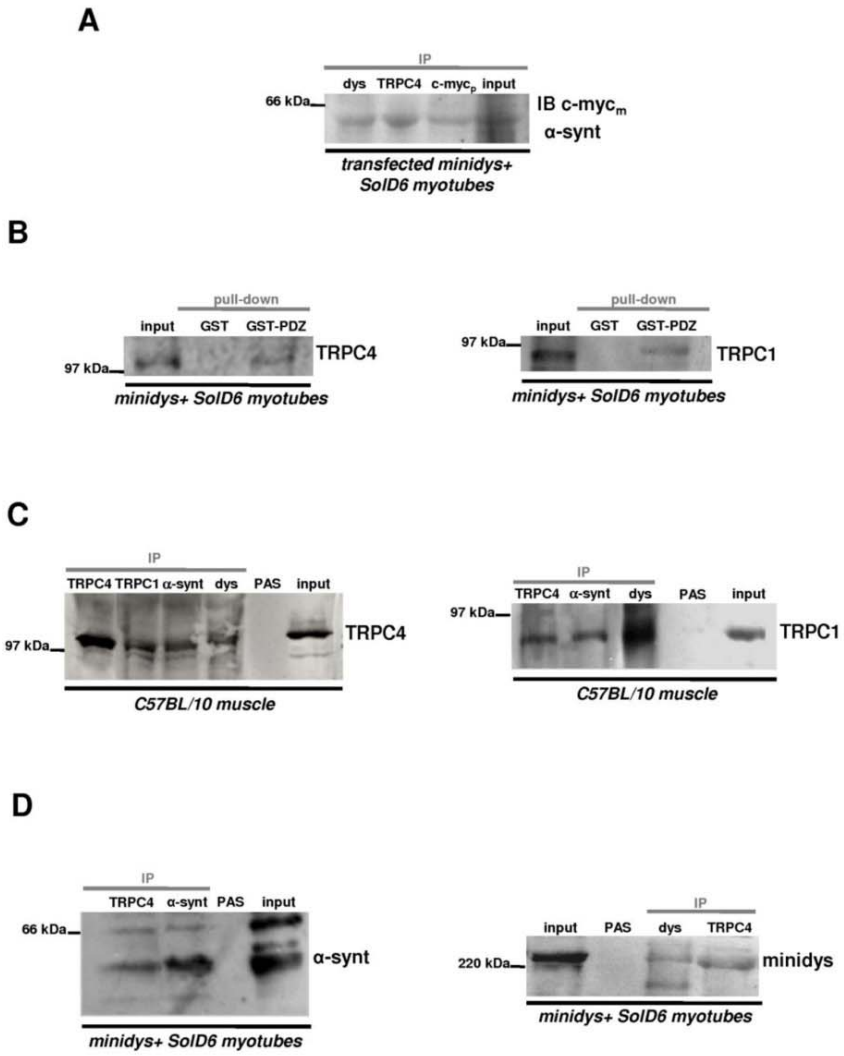
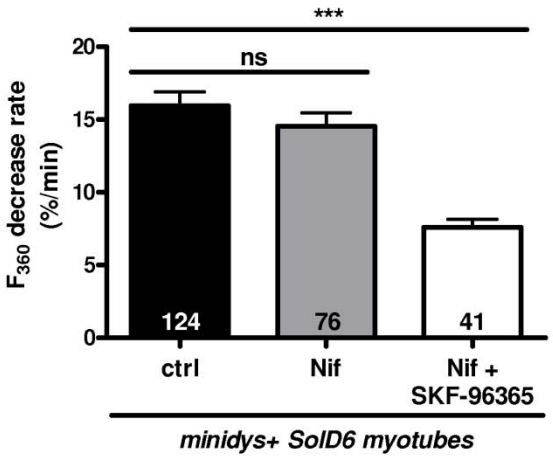


Figure 6

Downloaded from www.jbc.org at UNIVERSITÉ DE POITIERS - Trial Subscription, on October 8, 2009

A



B

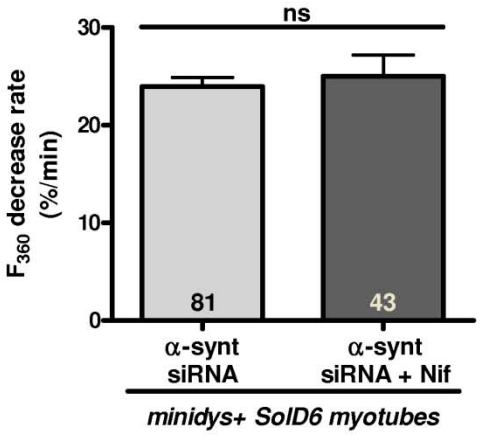


Figure Supplemental 1

Vm* recording / myotubes	Resting Vm*	Vm* after intracellular stores depletion
minidys+ SolD6	67 (n=24)	61 (n=12)
minidys+ SolD6 treated with siRNA against syntrophin	70 (n=17)	-
SolC1dys-	75 (n=21)	71 (n=11)

*Vm : membrane potential

Table 1

Figure Supplemental 1 (S1): Cation influx regulated by α1-syntrophin in minidys+ SolD6 myotubes is insensitive to nifedipine. A. Effect of 5 µM nifedipine and of 40 µM SKF-96365 on store-operated cation influx in minidys+ SolD6 myotubes. Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control minidys+ SolD6 myotubes (black column), in minidys+ SolD6 with administration of 5 µM Nifedipine (grey column) and with double administration of Nifedipine plus 40 µM SKF-96-365 (white column). Difference between mean values of measured parameters was analysed by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (* = $0.01\leq P<0.05$, ** = $0.001\leq P<0.01$, *** = $P<0.001$). **B.** Effect of 5 µM Nifedipine on store-operated cation influx in minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA against α1-syntrophin. Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA α1-syntrophin (grey column) and in minidys+ SolD6 transfected with siRNA α1-syntrophin with administration of 5 µM Nifedipine (dark-grey column)

Table 1: Measurement of membrane potential in cultured myotubes by patch clamp recording. The table represents the resting membrane potential in minidys+ SolD6 myotubes, in minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA against α1-syntrophin and in SolC1dys- myotubes. The membrane potential was also measured after partial store-depletion by repetitive activation of calcium release by caffeine (10 mM) and in the presence of CPA, a SERCA inhibitor and at the beginning of Ca^{2+} perfusion that induced a store-operated calcium influx.

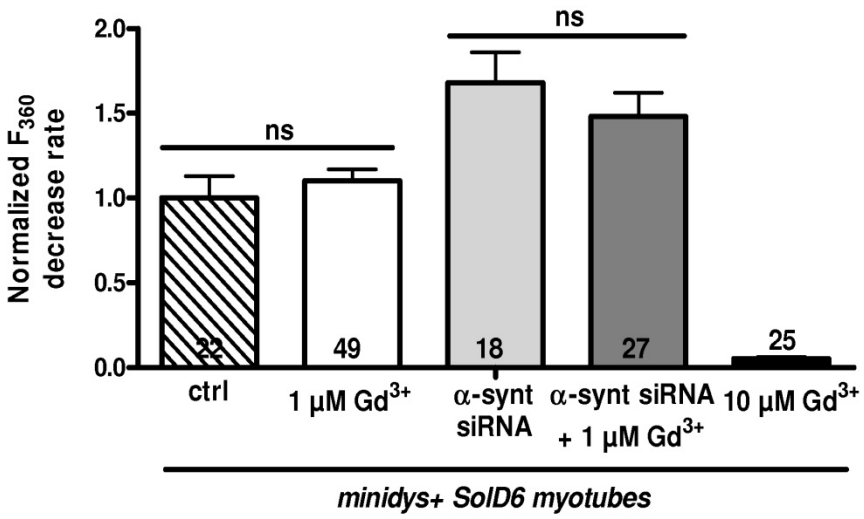


Figure Supplemental 2

Figure Supplemental 2 (S2): Cation influx regulated by α1-syntrophin in minidys+ SolD6 myotubes is insensitive to 1 µM Gd^{3+}. Effect of 1 µM Gd^{3+} on store-operated cation influx in minidys+ SolD6 myotubes. Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} were normalized vs control values in minidys+ SolD6 myotubes (striped column). Normalized rate in minidys+ SolD6 with administration of 1 µM Gd^{3+} (white column), in minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNA α1-syntrophin (grey column), in minidys+ SolD6 transfected with siRNA α1-syntrophin with administration of 1 µM Gd^{3+} (dark-grey column) and in minidys+ SolD6 with administration of 10 µM Gd^{3+} (black column). Difference between mean values of measured parameters was analyzed by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (* = $0.01\leq P<0.05$, ** = $0.001\leq P<0.01$, *** = $P<0.001$).

III. INCREASED CATION ENTRY THROUGH TRPC1 IS MEDIATED BY PLC/PKC PATHWAY IN DYSTROPHIN-DEFICIENT MYOTUBES

A. Contexte

Précédemment, nous avons mis en évidence une entrée cationique activée par la déplétion en calcium du RS, transitant par les canaux TRPC1 et TRPC4 et régulée par le complexe α1-syntrophine/mini-dystrophine dans les myotubes SolD6 exprimant la mini-dystrophine. De manière similaire, plusieurs équipes scientifiques évoquent une implication des protéines d'échafaudage, incluant la protéine homer et la cavéoline-3, dans la régulation des influx calciques dans le muscle squelettique (Stiber et al., 2008; Gervasio et al., 2008).

Au sein de l'équipe, Balghi et Mondin indiquent une augmentation de la libération calcique dépendante des RIP_3 dans les lignées SolC1 déficientes en dystrophine (Balghi et al., 2006; Mondin et al., 2009). Cette voie serait exacerbée à cause d'une surexpression des RIP_3 de type 1 qui libéreraient alors plus de calcium dans le cytoplasme. Sachant que ces derniers sont activés par l'IP_3, second messager produit de l'hydrolyse du PIP_2 par la PLC, il a été suggéré une suractivation de la voie PLC dans les cellules déficientes en dystrophine. La voie de signalisation PLC, indépendamment de son activation par son récepteur couplé aux protéines G ou son récepteur à activité tyrosine, est nettement connue dans la littérature pour activer les canaux SOCs (Rosado et Sage, 2000c; Broad et al., 2001; Tu et al., 2005; Patterson et al., 2002; Litjens et al., 2007).

B. Résultats et discussion de l'article 3

Nous avons voulu savoir si cette voie PLC faisait partie intégrante du processus impliqué dans la dérégulation des entrées cationiques dans les myotubes déficients en dystrophine. Pour cela, des tests pharmacologiques couplés à des mesures d'influx cationiques ont été réalisés sur les myotubes SolD6 et SolC1. Les premiers résultats mettent en évidence une activation de la PLC et de la PKC qui semblent moduler l'activité des canaux cationiques suite à un protocole de déplétion. Cette voie PLC/PKC participerait à l'augmentation des influx cationiques dans les myotubes SolC1 déficients en dystrophine puisque l'inhibition de cette voie réduit les influx cationiques à un niveau similaire mesuré dans les myotubes SolD6. Cette voie ne semble pas active ou du moins ne potentialise pas les influx cationiques mesurés dans les cellules exprimant la mini-dystrophine.

D'autre part, l'inhibition de l'expression de TRPC1 par la méthode de siRNA diminue fortement les influx cationiques dans les myotubes SolC1. Le canal TRPC1 supporte une grande partie des influx anormalement élevés dans les cellules déficientes en dystrophine. Au contraire, l'inhibition de l'expression de la protéine TRPC4 n'a pas d'effet significatif sur les influx cationiques dans les myotubes SolC1 (Fig. S8).

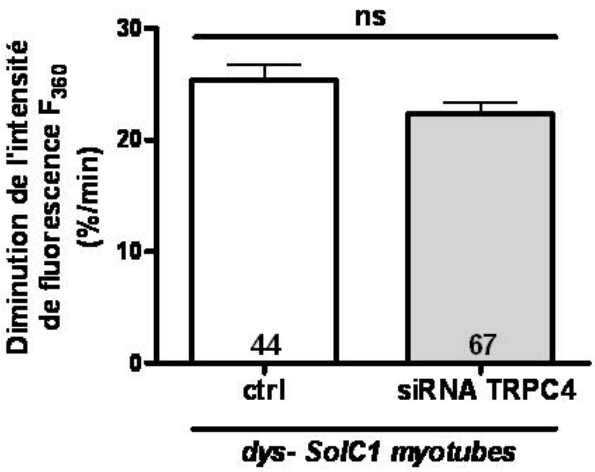


Figure S8: Effet du siRNA dirigé contre TRPC4 sur les entrées cationiques dépendantes des stocks intracellulaires dans les myotubes SolC1.
Le RS a été vidé en calcium par trois stimulations d'une minute de caféine (10 mM) en présence de 5 µM CPA alternées d'une minute de CPA (15 µM) en absence de calcium.
Histogrammes présentant les pentes moyennes (± S.E.M) d'extinction de la fluorescence du fura-2 par le manganèse (50 µM) dans les myotubes contrôles SolC1 et dans les myotubes SolC1 transfectés avec le siRNA TRPC4. La différence entre les valeurs moyennes est mesurée puis considérée significative à l'aide du t test de Student à partir de $P<0.05$ (ns, non significative).

Le canal TRPC4, dans les cellules SolC1, ne semble pas être activé par la déplétion des réserves intracellulaires et/ou par la voie PLC. De manière intrigante, il semble que TRPC4 ne participe pas aux influx cationiques dans les cellules déficientes en dystrophine au contraire des cellules déficientes en α1-syntrophine (Article 2). TRPC4 pourrait constituer un autre canal (par exemple SAC) qui, dans nos conditions expérimentales, ne serait pas activé. Ou encore, TRPC4 ne serait pas correctement adressé à la membrane et de ce fait ne serait pas fonctionnel. Ces résultats vont dans le sens d'un rôle de la dystrophine dans l'assemblage de TRPC4 avec TRPC1 pour former un canal hétérotétramérique. En son absence, ils n'interagissent plus ensemble et TRPC1 devient alors un canal homotétramérique avec une nouvelle sensibilité. En bref, la dystrophine constituerait, entre autres, une protéine d'échafaudage et l'α1-syntrophine jouerait le rôle de protéine régulatrice.

Comment la voie de la PLC/PKC peut-elle être activée dans les cellules déficientes en dystrophine sans activation en amont de son récepteur? Nous nous sommes focalisés sur le second messager, le calcium qui est connu pour activer la PLC et la PKC. Pour connaître son rôle dans l'activation des canaux cationiques, nous avons séquestré le calcium libre intracellulaire à l'aide d'un chélateur classique, le BAPTA afin de diminuer le niveau de calcium libre dans le cytoplasme. La réduction du calcium cytoplasmique libre entraine une diminution des influx anormalement élevés dans les cellules déficientes en dystrophine. Cette partie de l'influx dépendante du calcium intracellulaire semble être la même composante qui est dépendante de la voie PLC/PKC. Nous parlons alors de la voie calcium/PLC/PKC responsable de l'augmentation des influx cationiques transitant par TRPC1 dans les cellules déficientes en dystrophine. De manière similaire, dans les myotubes SolD6 traités avec les siRNAs α1-syntrophine, les influx cationiques exacerbés mesurés lorsque l'α1-syntrophine est absente, sont fortement réduits lorsque la voie PLC/PKC est inhibée. Ces résultats montrent qu'en absence de la dystrophine ou de l'α1-syntrophine, une entrée cationique est modulée par la voie PLC/PKC entrainant alors une suractivation des canaux TRPC1 et par conséquent une augmentation des influx cationiques.

En conclusion, nous avons mis en évidence une voie calcium/PLC/PKC qui se trouve activée dans les cellules déficientes en dystrophine agissant alors sur les canaux TRPC1 qui voient leur activité augmentée. Cette voie n'est alors plus active lorsque l'homéostasie calcique est rétablie en la présence de mini-dystrophine et d'α1-syntrophine.

Increased cation entry through TRPC1 is mediated by PLC/PKC pathway in dystrophin-deficient myotubes

Jessica Sabourin, Christophe Magaud, Christian Cognard and Bruno Constantin

Address correspondence to: Dr Bruno Constantin, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, UMR Université de Poitiers/CNRS n°6187, 86022 POITIERS CEDEX, France. E-mail: bruno.constantin@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

The Dystrophin-Associated Protein Complex (DAPC) is essential for skeletal muscle function and the lack of dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy results in fiber necrosis partially due to abnormally elevated calcium influx. Store-dependent cation entry is an important mechanism for calcium influx in skeletal muscle cells; however the activation and regulation of this pathway are incompletely understood. Previously, we have demonstrated the requirement of α1-syntrophin in the DAPC for normal regulation of TRPC1-dependent cation entry in cultured myotubes. Here, we used fura-2 imaging and pharmacological tools to test if PLC pathway may be a target for TRPC1-dependent cation entry deregulation in dystrophin-deficient cells. We found that the inhibition of PLC or PKC resulted in significant inhibition of store-dependent cation influx in dystrophin-deficient cells. Further investigation established that initiation of calcium entry by calcium itself was blocked by chelation of intracellular free calcium by BAPTA-AM. Moreover, we showed, by double treatment with BAPTA-AM and PLC or PKC inhibitors, a calcium dependence of the PLC pathway in dystrophin-deficient myotubes. All these results demonstrate for the first time an involvement of calcium/PKC/PLC pathway in impaired calcium influx through TRPC1 in dystrophin-deficient cells. Similarly to dystrophin-deficient myotubes, increased cation influx in α1-syntrophin-deficient myotubes was dependent on PLC/PKC activity.

1. Introduction

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive degenerative muscle disease affecting 1/3500 male births. This pathology is due to a defect in the p21 band of X chromosome [1] affecting dystrophin, a 427 kD protein located beneath the plasma membrane [2]. In normal skeletal muscle cells, dystrophin is associated with the cytoskeleton via actin and with the extracellular matrix via a complex of proteins and glycoproteins, called Dystrophin-Associated Proteins (DAPs) [3]. Because of its key localization, dystrophin provides a mechanical link from the intracellular cytoskeleton to the extracellular matrix [2]. It is now clear that the alteration of dystrophin affects DAPs' targeting to the membrane and causes a disruption of the link between cytoskeleton and the extracellular matrix. Moreover, lack of dystrophin has been shown to cause impaired cytosolic calcium homeostasis by alterations of calcium channels that may affect intracellular calcium concentration [4-7], which results in activation of calcium-sensitive proteases and fiber necrosis [4,8]. Among channels which could be affected by the absence of dystrophin, divalent cationic channels with properties close to SOCs (Store-Operated Channels) have been recorded in dystrophin-deficient muscles [9,10].

SOCs have been observed in a wide range of cell types [11,12]. The defining property is that depletion of intracellular calcium stores results in increased calcium influx called Store-Operated Calcium Entry (SOCE) at the plasma membrane. The actual SOC that carries this calcium influx may vary between cells, and cloning studies have identified TRPCs [13,14] and more recently STIM1 and Orai1 as candidate genes [15-18]. Recent studies revealed, in skeletal muscle, high expression of Orai1 as well as STIM1 [19,20], and a requirement for STIM1 in SOCE [21] and contractile function of skeletal muscle [20]. STIM1 appeared to be often associated to Orai1 and was proposed to play a role as calcium stores filling state sensor connecting Ca^{2+} store depletion to Ca^{2+} influx [22,23].

Nevertheless, different other mechanisms have been proposed to explain how information about calcium stores content could be communicated to the plasma membrane, and the question remains very controversial. Some models suppose that structural links exist between IP_3R and calcium channels in the plasma membrane [24,25]. Alternatively, it has been proposed that a diffusible intracellular messenger called CIF (Calcium Influx Factor) could be released by the empty organelles, and subsequently transmitted to the membrane [26,27]. These mechanisms could additionally involve an exocytosis-like process [28,29].

Store-dependent entry of calcium has now been well identified in excitable cells. Several studies have revealed the presence of such calcium influx in adult skeletal muscles [10,30-33] and in myotubes [34-36]. Nevertheless, identification of membrane channels involved in this store-dependent calcium entry remains controversial. A first study has demonstrated that abnormal influx observed in adult *mdx* fibers occurs through store-dependent calcium channels constituted, at least partially, of TRPC proteins [10]. TRPC1 has also been reported to be SACs in normal skeletal muscle cells [32,37,38] and could be modulated by the cytoskeleton. Moreover, we have shown that TRPC1 is associated with the dystrophin-based cytoskeleton [36] and that the normal divalent cation influx is dependent on TRPC1 and TRPC4 channels, which are part of a same costameric complex associated with dystrophin. On the other hand, scaffolding proteins of the costameric complex appear to regulate the calcium influx through sarcolemma [36,39,40]. In Homer-1 knock-out [39] and in dystrophin-deficient myotubes [36] as well as in α1-syntrophin knock-down [41], the alteration of cytoskeleton complex results in higher divalent cation entry thought to be related to TRPC1 channels. The mechanism activating an elevated cation influx through TRPCs channels in dystrophin-deficient muscle, although clearly dependent on scaffolding proteins is, however, still unknown. Recently, the study of Gervasio and collaborators proposed that higher levels of TRPC1 and caveolin-3 at the sarcolemma of dystrophin-deficient muscle contribute to abnormal calcium influx as well as ROS and Src kinase activation [40].

It is also known that dystrophin-deficient myotubes display higher production of IP_3 [42] and calcium release activity dependent on IP_3R [43,44], which suggest a higher activity of PLC when dystrophin-associated complex is disrupted. In several cell types, store-depletion induced calcium entry is dependent on basal PLC activity [45-49] and can be activated by a number of mediators involved in the PLC signaling cascade, including calcium [50,51] or PKC [52-54].

In the present study the role of PLC pathway was investigated in order to explore the processes involved in the activation of increased divalent cation entry through TRPC1 channels in dystrophin-deficient muscle cells.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies and drugs

Antibodies against TRPC1 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and against PLC (Calbiochem, San Diego, USA), were rabbit polyclonal antibodies (pAb) and the one against α1-syntrophin was goat pAb (Abcam, Cambridge, UK). Antibody against PLCβ was mouse monoclonal and antibody against PLCγ was rabbit polyclonal antibody (Santa-Cruz). Antibody against alpha tubulin was mouse monoclonal (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). U73122 ((1-(6-((17 beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-di one), U73343, OAG (1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol), BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis-(acetoxymethyl ester)) and CPA (Cyclopiazonic acid) from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). RHC-80267 (O,O'-[1,6-Hexanediylbis (iminocarbonyl)]dioxime cyclohexanone) and chelerythrine were from Calbiochem (San Diego, USA).

2.2. Cell culture and transfections

Experiments were performed on two cell lines: one dystrophin-deficient dys- SolC1 and the other expressing mini-dystrophin minidys+ SolD6. These cell lines were cultured as described previously elsewhere [55]. Transfection was performed on proliferative myoblasts and experiments were performed on myotubes at day 3 and day 4 after initiation of myoblasts fusion. Myoblasts were transfected the day of seeding by using the nucleofactor transfection technology (Amaxa, Amaxa Biosystems, Germany) and cultured on plastic dishes or on glass coverslips coated with gelatin (1 % in sterile water, Sigma-Aldrish). One million cells were centrifuged at 90 *g* at room temperature for 10 min and resuspended in nucleofector solution (nucleofactor kit V) to a final concentration of 1 million cells/100 µl. The 100 µl cell suspension was mixed with siRNAs. The cell suspension was submitted to a pulse protocol (Amaxa B-032, kit V) for nucleotransfection. 500 µl of pre-warmed culture medium were added and supplemented to transfected cells and the mix was applied to the glass coverslips.

2.3. Silencing of α1-syntrophin and TRPC1 expression

Mouse SolD6 myotubes with reduced α1-syntrophin expression were obtained using transient transfection of small interfering RNA (siRNA). The siRNA silencing sequence 5'-AAGGUAUGAAUGUGCCGAUCUGCGC-3' (Eurogentec, Seraing, Belgium) was designed to target mouse α1-syntrophin mRNA (NM_009228). SiRNA and its control (sequence with no homology with any known eukaryotic gene: Eurogentec) were transfected at 3 µg per 1 million of cells into SolD6 myoblasts using nucleofector transfection device. Silencing was also performed using the same transfection protocol with 3 µg of a bicistronic shRNA plasmid (SuperArray, Bioscences Corporation) encoding a short hairpin silencing sequence 5'-TGTGTTGGAGGTTAAGTACAT-3'. The bicistronic shRNA plasmid contains the shRNA under control of the U1 promotor and the EGFP cDNA to enable the identification of transfected myotubes. Silencing of TRPC1 gene was performed by means of the same transfection protocol using two different siRNA sequences (Eurogentec) against mouse TRPC1 mRNA (5'-GCAUCGUAUUUCACAUUCU-3'; 5'-UGAGCCUCUUGACAAACGA-3').

2.4. Immunoprecipitation

Total cell lysates were obtained from C57BL/10. Skeletal muscles were removed by dissection from C57BL/10 mice and immediately were washed three times in cold TBS 1X (20 mM Tris Base pH: 7.4, 154 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA) and then lysed in 1 mL of lysis buffer RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay: 50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.05 % NP-40 (w/v), 1 % DOC (w/v), 1 % Triton X-100 (v/v), 0.1 % SDS (w/v) in the presence of 1 % of a protease inhibitor cocktail (1 mM PMSF, 20 mM leupeptine, 0.8 mM aprotinine and 10 mM pepstatine). Protein lysates were homogenized by a mechanical dissociation. The total protein concentration was measured by means of a Biorad DC protein assay kit. After cell lysis, 2 µg of antibody were added to 200 µL of cell lysates diluted with 600 µL of solubilisation buffer (NET) and incubated at 4°C overnight with constant mixing. Then, the complex protein-antibody was incubated for 1 h at 4°C with constant mixing with 40 µL of protein A/G Sepharose (Amersham). The immune complexes were collected by centrifugation and washed 3 times in NET. After denaturing, samples were subjected to SDS-PAGE, blotted with antibody against TRPC1 probed for 1h with 1:3000

horseradish peroxydase conjugated anti-rabbit antibody (Amersham) and developed with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham). The molecular weight of proteins was estimated according to pre-stained protein markers (Rainbow, Sigma-Aldrich).

2.5. Measurement of cation influx using Mn^{2+} quenching of fura-2 fluorescence

Myotubes of 3 or 4 days were rinsed with external 1.8 Ca^{2+} solution (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, pH 7.4, with NaOH) and incubated for 30 min in darkness and then for 15 min at 37°C in the same solution supplemented with 3 µM (final concentration) of fura-2/AM (FluoProbes). Loaded cells were washed with Ca^{2+}-free solution (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.8 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, and 5.6 mM D-glucose, pH 7.4 with NaOH) before measurements. Fura-2 was excited at 360 nm with a CAIRN monochromator (Cairn Research Limited, Faversham, UK), and emission fluorescence was monitored at 510 nm using intensified cooled CCD camera (Photonic Science Limited, Robertsbridge, UK) coupled to an Olympus IX70 inverted microscope (x40 water immersion fluorescence objective). The cation influx was evaluated by the quenching of fura-2 fluorescence when Mn^{2+} ions enter the cell. Fluorescence variations were recorded with the Imaging Workbench 4.0 (IW 4.0) software (Indec BioSystems, Mountain View, CA, USA). The depletion protocol was three times one minute application of 0 Ca^{2+} 15 µM CPA (reversible inhibitor of SERCA) alternated by three times one minute application of 0 Ca^{2+} 5 µM CPA+10 mM caffeine solution (activator of ryanodine receptor). The quench rate of the fluorescence intensity was estimated using linear regression of the decaying phase (slope) during the first 40 s after Mn^{2+} addition (50 µM final). The quench rate was expressed as percent per minute to correct for differences in the cell size or fluorophore loading. Statistical analysis was performed with Origin 5.0 software (OriginLab, Northampton, MA, USA). No bleaching or less than 0.5 %/min was observed during fluorescence decrease measurements. The difference between the mean values of measured parameters was statistically tested using the Student's t test and considered significant for $P < 0.05$. All values of the quenching rate were expressed in absolute value.

2.6. qRT PCR

Reverse Transcription. Total cellular RNAs were extracted using RNABle kit (Eurobio). RNAs (10 µl) were reverse transcribed in 25 µl reaction mixture consisting of first strand buffer (25 mM Tris, pH 8.3, 37.5 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$), 10 mM DTT, 1 mM each dNTP, 2.4 mg of random hexamers, 40 U RNase inhibitor (RNA guard, Amersham Biosciences), and 400 U M-MLV reverse transcriptase (GIBCO-BRL). Reverse transcription was performed at 37°C for 60 min followed by 2 min at 100°C. The solution was then diluted twice in water.

Real-time PCR. The 15 µl reaction mixture contained 7.5 µl 2x Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems), 5 µl of RT products, and appropriate primers and probes (900 nM and 200 nM, respectively). All probes contained a 3' TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) quencher dye and were labelled at the 5' end with a FAM (6-carboxyfluorescein) reporter fluorescent dye. Amplification was performed at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C (15 s) and 60°C (1 min). Reactions were performed in MicroAmp optical 96-well reaction plates (Applied Biosystems) using an ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). All measurements were normalized to the mitochondrial ribosomal protein S6 (Mrps6, an endogenous control) to account for the variability in the initial concentration and quality of the total RNA.

-*Forward primer for TRPC1*: 5'-CTT-CTG-CGA-ACA-GCA-AAG-CA-3'; *Reverse primer*: 3'-GAT-GTA-CCA-GAA-CAG-AGC-AAA-GCA-5'; Probe: [5']6-FAM TGA-CAC-CTT-CCA-CTC-GTT-CAT-TGG-CA [3']TAMRA.

-*Forward primer for SP6 protein control*: 5'-TTT-GAT-TCT-GAA-AGC-CAT-GCG-3'; *Reverse primer*: 3'-CGG-TCC-ATC-AGG-GAT-TCT-ATT-G-3'; Probe: [5']6-FAM CGG-CCA-GAG-ACC-GCT-GCT-GCT [3']TAMRA.

Sybr Green system (Applied Biosystems) was also used for PLCβ1 and PLCγ1. All measurements were normalized to α-tubulin as reference (endogenous control) to account for the variability in the initial concentration and quality of the total RNA. Expression was quantified with the ratio CT PLCβ or γ/CT α-tubulin.

-*Forward primer for PLCβ1*: 5'-CGG-AGC-TGG-AGC-AAG-AAT-AC-3'; *Reverse primer*: 5'-TCA-CCT-TTG-CAG-CAT-CTG-AG-3'.

-*Forward primer for PLCγ1*: 5'-GAC-TCA-CTG-GAG-AAC-TGG-TC-3'; *Reverse primer*: 5'-CCC-TTT-CTG-AGT-TCC-AGC-AG-3'.

-Forward primer for α-tubulin: 5'-ACC-TGG-AAC-CCA-CGG-TCA-T-3'; *Reverse primer*: 5'-AGC-TGC-TCA-GGG-TGG-AAG-AG-3'.

3. Results

3.1. Store-dependent cation entry in dystrophin-deficient SolC1 myotubes is sensitive to inhibition of PLC by U13122

To activate store-dependent cation entry in cultured myotubes, partial store-depletion by repetitive activation of calcium release by caffeine (10 mM) in presence of CPA (15 µM), a reversible SERCA inhibitor, was applied. After the stores were depleted by this procedure, 50 µM manganese ions were readmitted in the extracellular space that induced an influx of divalent cations, reflected by the progressive quenching of fura-2 fluorescence by Mn^{2+} attributed to a store-operated influx (Fig. 1A). We have previously shown that depletion of intracellular calcium stores in minidys+ SolD6 and dys- SolC1 myotubes activates store-dependent cation entry, which is more important in dystrophin-deficient myotubes [36]. In order to study the pathway of activation, we investigated a possible role of PLC in this mechanism in cultured myotubes. Activation of PLC was blocked with a widely membrane-permeant PLC inhibitor, U73122 and impact of this blockade was examined on manganese influx. Pre-treatment of cells with 5 µM or 10 µM U73122 has previously been documented to fully and irreversibly prevent PLC activation [56,46]. A 15 min pre-incubation of SolD6 myotubes with 10 µM U73122 had no effect on store-dependent cation entry (16± 0.7 %/min, n= 39) compared to control myotubes (15.5 ± 0.3 %/min, n= 246) whereas pre-incubation of SolC1 myotubes with 5 µM or 10 µM U73122 inhibited cation entry by 47 % and 42 % respectively (control SolC1 myotubes: 26.6 ± 0.6 %/min, n= 256, 5 µM U73122 treated SolC1 myotubes: 14.2 ± 1 %/min, n= 30, 10 µM U73122 treated SolC1 myotubes: 15.3 ± 0.7 %/min, n= 46) (Fig. 1B). Incidentally, the value of cation entry after PLC inhibition in SolC1 myotubes was similar to the one measured in normal SolD6 myotubes. On the contrary, pre-treatment of cultured myotubes with 10 µM U73343, an inactive analog of U73122, had no effect on cation influx (16.7 ± 0.7 %/min, n= 25 for SolD6 myotubes and 28.3 ± 1.8 %/min, n= 29 for SolC1 myotubes) (Fig. 1B). Therefore, the specific blocking effect of U73122 on PLC action prevents store-dependent cation entry in SolC1 myotubes, indicating an activation of PLC, which seems to activate cation channels after store-depletion protocol, only in dystrophin-deficient cells. On the other hand, PLCβ1 and PLCγ1 (predominant isoforms in

skeletal muscle) mRNA levels were analyzed by quantitative RT-PCR technique in SolD6 and SolC1 myotubes. In control conditions, PLCβ1 and PLCγ1 mRNAs levels were found identical between SolD6 and SolC1 myotubes (Fig. 1C). Moreover, PLCβ1 and PLCγ1 proteins levels were determined by Western Blotting (Fig. 1D). Ratio of PLC isoforms to α-tubulin (α-tub) protein was performed to compare expression level of PLC between the two cell lines. Immunoblots showed no variation in PLC isoforms protein expression between SolD6 and SolC1 myotubes (Fig. 1D). So, PLC isoforms were not overexpressed in dystrophin-deficient SolC1 myotubes.

Fig. 1. Effect of U73122 on store-dependent cation entry in cultured myotubes. (A) Three representative recordings of fura-2 fluorescence during perfusion of 50 µM Mn^{2+} obtained from minidys+ SolD6 myotubes (dotted brown line), from dys- SolC1 myotubes (black line) and from dys- SolC1 myotubes treated with 10 µM U73122 (grey line). (B) Slopes of the Mn^{2+}-induced decreasing phase of fura-2 fluorescence were measured and expressed as % of decrease per min. Bar-graphs represent mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in SolD6 myotubes treated with 10 µM U73122 (grey column), in SolD6 myotubes treated with 10 µM U73343 (dark-grey column), in control SolC1 myotubes (black column), in SolC1 myotubes treated with 5 µM U73122 (dotted grey column), in SolC1 myotubes treated with 10 µM U73122 (dotted dark-grey column) and in SolC1 myotubes treated with 10 µM U73343 (dotted black column). Difference between mean values of measured parameters was determined by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$). (C) PLCβ and PLCγ mRNA expression was addressed by quantitative RT-PCR-based analysis. α-tubulin mRNA was used as an internal standard and mRNA expression level of PLCβ and PLCγ was normalized with α-tubulin mRNA expression in SolD6 and SolC1 myotubes. (D) Expression level of PLCβ and PLCγ in SolD6 and in SolC1 myotubes was analyzed by Western Blots using PLCβ monoclonal antibody and PLCγ polyclonal antibody. Levels of PLC isoforms were compared to the one of α-tubulin (α-tub) detected with a monoclonal antibody in both myotubes.

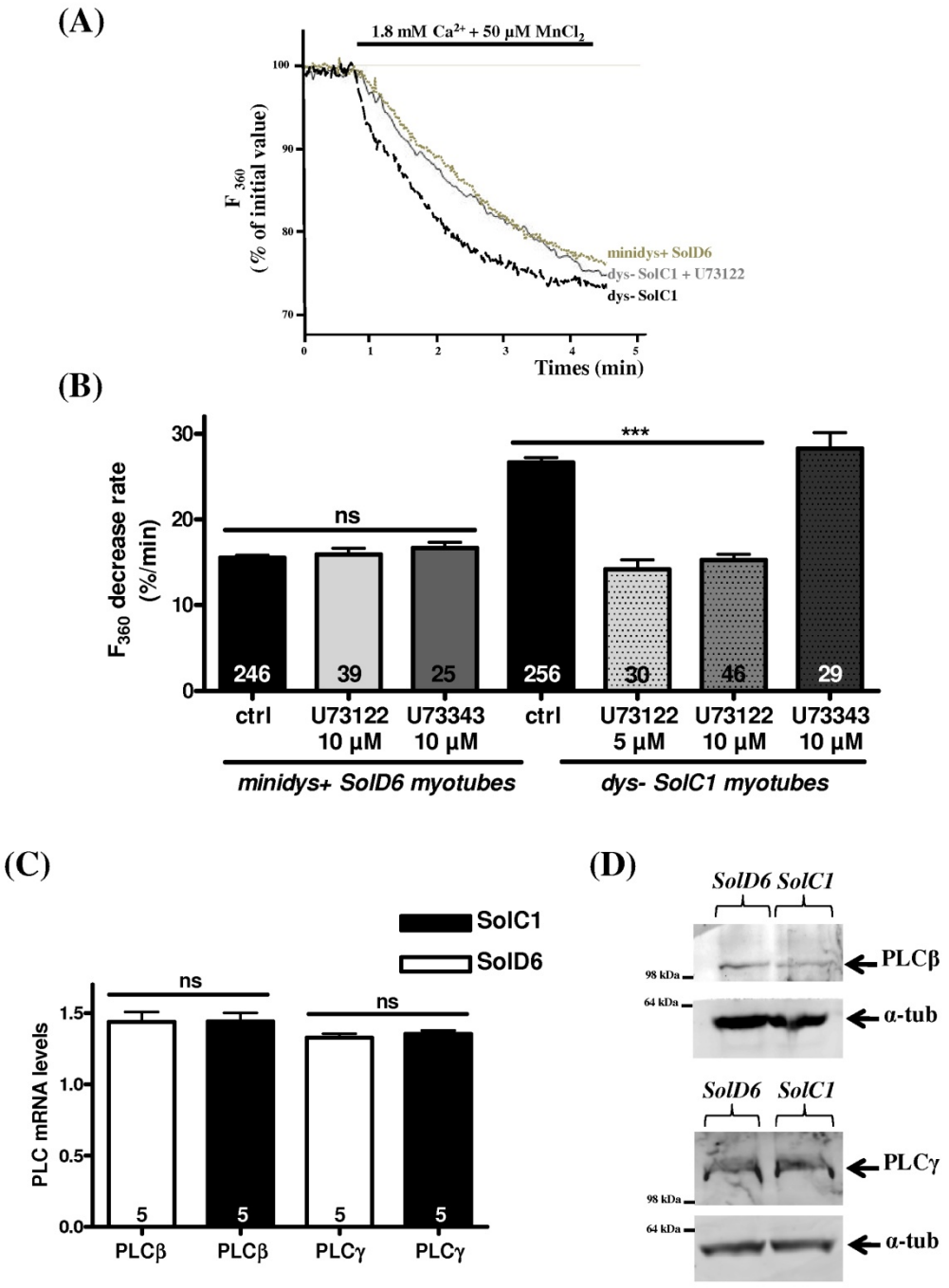

(A)
1.8 mM Ca2+ + 50 µM MnCl2
F 360 (% of initial value)
Times (min)
minidys+ SolD6
dys- SolC1 + U73122
dys- SolC1
(B)
F360 decrease rate (%/min)
ns
***
246
39
25
256
30
46
29
ctrl
U73122 10 µM
U73343 10 µM
ctrl
U73122 5 µM
U73122 10 µM
U73343 10 µM
minidys+ SolD6 myotubes
dys- SolC1 myotubes
(C)
SolC1
SolD6
PLC mRNA levels
ns
ns
5
PLCβ
PLCβ
PLCγ
PLCγ
(D)
SolD6 SolC1
98 kDa
64 kDa
PLCβ
α-tub
SolD6 SolC1
PLCγ
α-tub

Figure 1

3.2. Store-dependent cation entry in cultured myotubes is insensitive to DAG and its metabolites

A greater activation of PLC in SolC1 myotubes could also result in an increase in the concentration of DAG, a product of PLC activity in the plasma membrane. Moreover, calcium entry activated by DAG has been shown to contribute to ROCE (Receptor-Operated Calcium Entry) in some cell types [57,58]. To investigate the roles of DAG and ROC channels in the observed decrease in cation influx caused by U13122, the effect of a cell permeant analog of DAG, 1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol (OAG) on cation entry was observed. In fact, basal manganese influx in the presence of 200 µM OAG was increased to 10.4 ± 0.3 %/min, n=73 for SolD6 myotubes and to 9.4 ± 0.4 %/min, n=59 for SolC1 myotubes (Fig. 2A). This result shows an OAG-induced cation influx which is sensitively similar between both models but insensitive to 40 µM SKF-96365, an inhibitor of non voltage-dependent calcium channels (like ROCs and SOCs). Therefore, OAG-induced cation influx is different from store-dependent cation entry which is inhibited by SKF-96365 [36,41]. Furthermore, other receptor-regulated calcium entry pathways exist including some of them regulated by arachidonic acid, which is released from DAG by DAG lipase [59,60]. We tried to modulate the production of DAG by an inhibitor of DAG lipase, RHC-80267 [61]. Use of such a compound it is known to result in a rapid elevation in the steady-state level of endogenous DAG and in a decrease in the level of the product of DAG lipase, arachidonic acid. Pre-incubation during 45 min of SolD6 and SolC1 myotubes with 50 µM RHC-80267 did not stimulate or suppress cation entry (Fig. 2B). This result suggests that DAG lipase and consequently arachidonic acid are not involved in activation of store-dependent cation influx. Similar results in both models were observed by treatment with 30 or 60 µM R59949, an inhibitor of diacylglycerol kinase that catalyzes the conversion of DAG to phosphatidic acid (Fig. 2C). These data suggest that neither DAG nor one of its metabolites were able to activate store-dependent cation entry in our models and could not further potentiate the elevated divalent cation influx in dystrophin-deficient myotubes.

Fig. 2. Effect of OAG and its metabolites on store-dependent cation entry in cultured myotubes. Slopes of the Mn^{2+}-induced decreasing phase of fura-2 fluorescence were measured and expressed as % of decrease per min. (A) Bar-graphs represent mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in SolD6 myotubes treated with 100 µM OAG (grey column), in SolD6 myotubes treated with 100 µM OAG and 40 µM SKF-96365 (dark-grey column), in control SolC1 myotubes (black column), in SolC1 myotubes treated with 100 µM OAG (dotted grey column) and in SolC1 myotubes treated with 100 µM OAG and SKF-96365 (dotted dark-grey column). (B) Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in SolD6 myotubes treated with 50 µM RHC-80267 (grey column), in control SolC1 myotubes (black column) and in SolC1 myotubes treated with 50 µM RHC-80267 (dotted grey column). (C) Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in SolD6 myotubes treated with 30 µM R59949 (grey column), in SolD6 myotubes treated with 60 µM R59949 (dark-grey column), in control SolC1 myotubes (black column), in SolC1 myotubes treated with 30 µM R59949 (dotted grey column), in SolC1 myotubes treated with 60 µM R59949 (dotted dark-grey column). Difference between mean values of measured parameters was determined by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$).

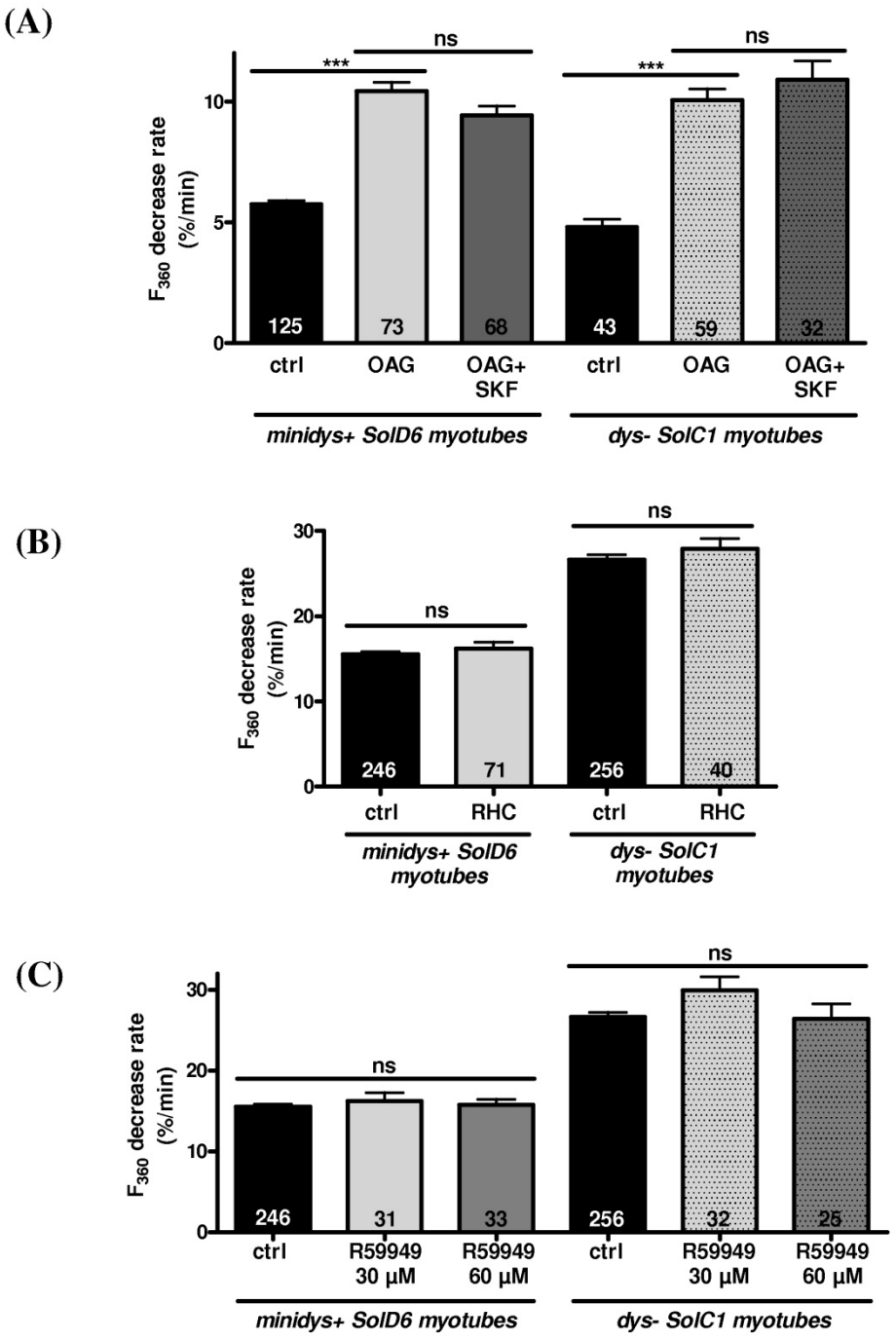

(A)
ns
***
ns
***
10
5
0
F360 decrease rate (%/min)
125
73
68
43
59
32
ctrl
OAG
OAG+ SKF
ctrl
OAG
OAG+ SKF
minidys+ SolD6 myotubes
dys- SolC1 myotubes
(B)
ns
ns
30
20
10
0
F360 decrease rate (%/min)
246
71
256
40
ctrl
RHC
ctrl
RHC
minidys+ SolD6 myotubes
dys- SolC1 myotubes
(C)
ns
ns
30
20
10
0
F360 decrease rate (%/min)
246
31
33
256
32
25
ctrl
R59949 30 µM
R59949 60 µM
ctrl
R59949 30 µM
R59949 60 µM
minidys+ SolD6 myotubes
dys- SolC1 myotubes

Figure 2

3.3. Store-dependent cation entry in dystrophin-deficient SolC1 myotubes is sensitive to inhibition of PKC by chelerythrine

Calcium entry is known to be modulated by phosphorylation of calcium channels like TRPCs [58,52,62]. To test the possibility of a direct PKC effect on store-operated cation channels, we tested if PKC inhibition, by the widely selective inhibitor 10 µM chelerythrine [63], could affect store-dependent cation entry. We found that cation influx in SolC1 myotubes can be significantly impaired by 10 µM chelerythrine (16.1 ± 1.1 %/min, n=88) compared to control cells (26.6 ± 0.6 %/min, n=256) (40 % inhibition) (Fig. 3). On the contrary, administration of 10 µM or 50 µM chelerythrine had no effect on store-dependent cation entry in SolD6 myotubes (14 ± 0.8 %/min, n=44 and 15 ± 0.8 %/min, n=27 respectively) compared to control cells (15.5 ± 0.3 %/min, n=246) (Fig. 3). Therefore, the specific blocking effect of chelerythrine on PKC action prevents the elevated part of store-dependent cation entry in SolC1 myotubes, indicating an involvement of PKC activation in the elevated cation influx in dystrophin-deficient myotubes.

Fig. 3. Effect of chelerythrine on store-dependent cation entry in cultured myotubes. Slopes of the Mn^{2+}-induced decreasing phase of fura-2 fluorescence were measured and expressed as % of decrease per min. Bar-graphs represent mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in SolD6 myotubes treated with 10 µM chelerythrine (grey column), in SolD6 myotubes treated with 50 µM chelerythrine (dark-grey column), in control SolC1 myotubes (black column) and in SolC1 myotubes treated with 10 µM chelerythrine (dotted grey column). Difference between mean values of measured parameters was determined by Student's t test and considered significant at P<0.05 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

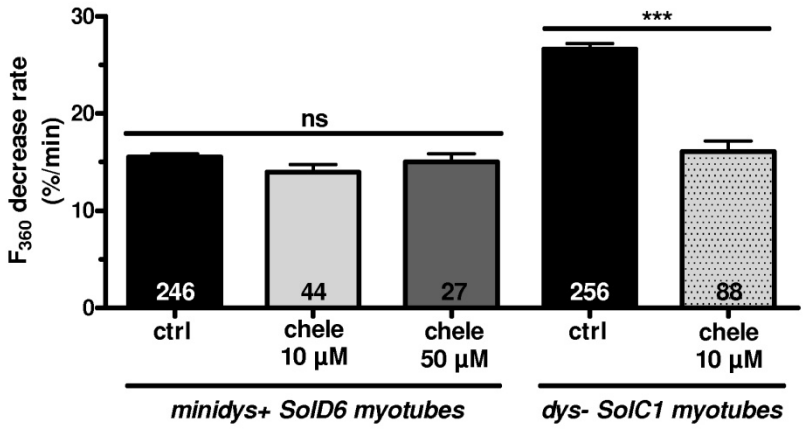


Figure 3

3.4. Role of TRPC1 in store-dependent channel activity in dystrophin-deficient SolC1 myotubes

Independent studies [10,40] have shown that elevated calcium influx in dystrophin-deficient muscle was dependent on TRPC1 activity. We thus address the issue of determining whether TRPC1 is supporting the store-operated cation entry recorded in dystrophin-deficient SolC1 myotubes. RNA interference was used to decrease endogenous TRPC1 mRNA level with further assessment of its impact on cation influx in SolC1 myotubes. Myoblasts were transfected by nucleofection with two siRNA duplex targeting TRPC1 mRNA, and 2 days differentiated SolC1 myotubes were tested for expression level of TRPC1 mRNA. We observed a drastic extinction by 99 % (siRNA1) and by 97 % (siRNA2) of the TRPC1 transcript value in SolC1 cells transfected with siRNA against TRPC1 compared to cells transfected with a non-targeting siRNA pool (siRNA ghost) (Fig. 4A). TRPC1 protein level was determined by Western Blotting. Western Blot analysis showed a large decrease of TRPC1 expression by 70 % in SolC1 myotubes transfected with TRPC1 siRNAs compared to control cells, confirming TRPC1 knockdown at the protein level (Fig. 4B).

SolC1 myotubes were transfected with siRNA against TRPC1 in order to determine the impact of the loss of this isoform on cation influx after three days of differentiation**.** Alteration of endogenous TRPC1 protein appears to decrease store-operated cation influx (siRNA TRPC1: 13.1 %/min ± 0.7, n=51) compared to control cells value (26.1 %/min ± 0.9, n=81) (Fig. 4C). It must be noticed that when 50 µM manganese ions were readmitted without depletion of the stores, a decreasing phase of fura-2 fluorescence was recorded (4.8 %/min ± 0.3, n=43 in non-stimulated SolC1 myotubes), which was not affected by SKF-96365 (data not shown). The values of cationic influx are thus the result from two components of cation entry: one sensitive (store-operated) and the other (background) insensitive to SKF-96365. Taking into account the presence of a background non store-operated cation entry recorded in non-depleted myotubes, TRPC1 knock-down resulted in a 61 % inhibition of the divalent cation influx in SolC1 myotubes. This shows that a large part (close to two-third) of cation influx recorded after store-depletion in dystrophin-deficient myotubes is supported by TRPC1. Moreover, TRPC1 appears to be associated with PLC in muscle. Fig. 4D represents immunoblot revealed by polyclonal TRPC1 antibody. A band around 90 kDa, corresponding to TRPC1, was detected in the anti-TRPC1, in the anti-α-synt and in the anti-PLC precipitates from C57BL/10 muscle and from *mdx* (dystrophin-deficient) muscle.

These results demonstrate that elevated cation entry is supported by TRPC1 channels in dystrophin-deficient myotubes, which also support normal cation entry in presence of the regulating dystrophin complex as previously suggested [41].

Fig. 4. TRPC1 is involved in store-dependent cation influx in dystrophin-deficient SolC1 myotubes. (A) Three days differentiated SolC1 muscle cells were harvested after transfection with siRNAs against TRPC1. Bars graph represent the amount of TRPC1 mRNA analyzed by qRT-PCR (value relative to the siRNA ghost control oligo). (B) Expression level of TRPC1 in SolC1 myotubes control cells or in cells transfected with TRPC1 siRNAs were analyzed by Western Blot using a TRPC1 polyclonal antibody. Level of TRPC1 was compared to the one of α-tubulin detected with a monoclonal antibody. (C) Effect of siRNA knock-down of TRPC1 on store-operated cation entry in SolC1 myotubes. Bar-graphs represent mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolC1 myotubes (black column) and in SolC1 transfected with siRNA TRPC1 (grey column). Difference between mean values of measured parameters was determined by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (* = $0.01\leq P<0.05$, ** = $0.001\leq P<0.01$, *** = $P<0.001$). (D) Muscle lysates from C57BL/10 and *mdx* muscles (input lane) were incubated with polyclonal antibodies against PLC (IP: PLC lane), α1-syntrophin (IP: syn lane), TRPC1 (IP: TRPC1 lane). Western Blot of the immunoprecipitated proteins was probed with polyclonal antibody against TRPC1.

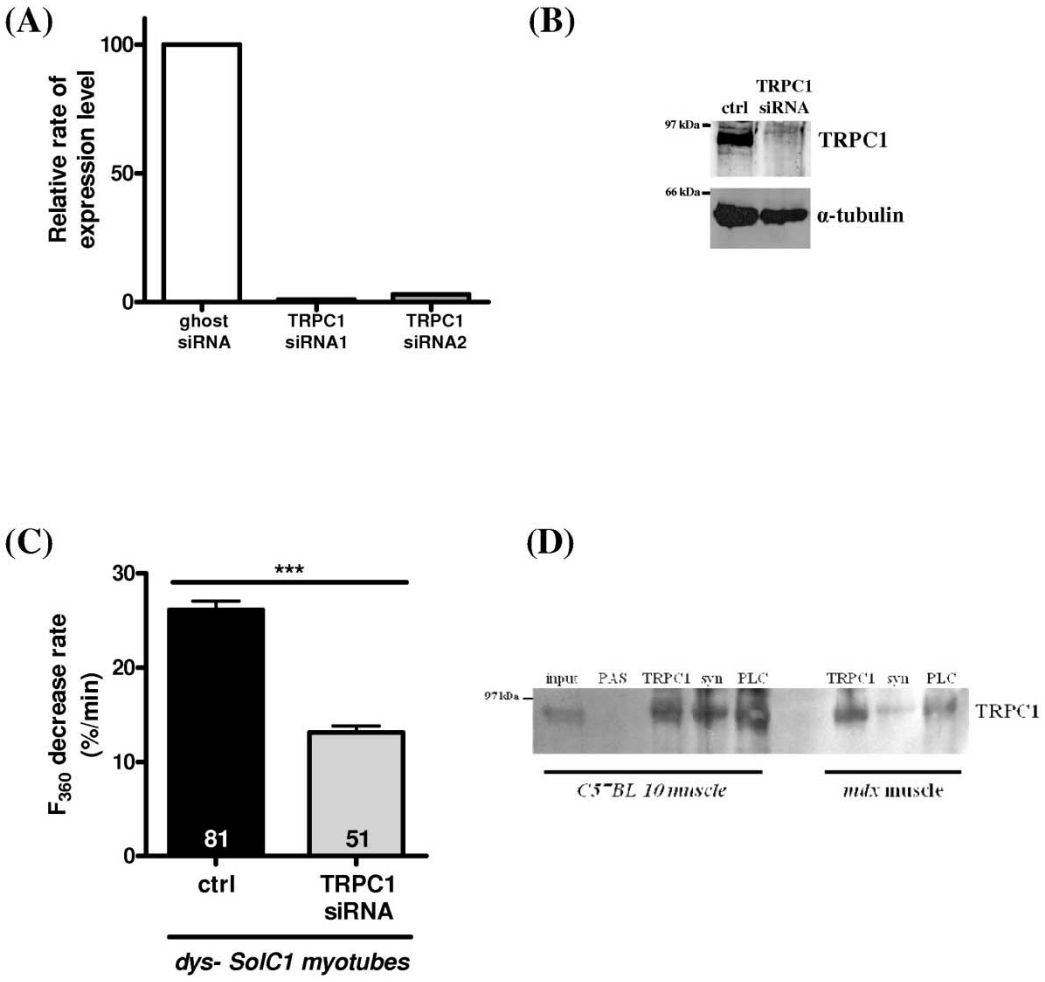


Figure 4

3.5. Calcium dependency of cation entry in dystrophin-deficient SolC1 myotubes

During application of the protocol, caffeine and CPA addition results in store depletion but also in elevation of the free concentration of calcium in cytoplasm. The increase of intracellular calcium was also the results of external sources, thus, multiple mechanisms can contribute to the global intracellular calcium elevation. A way to further explore if the increase in intracellular calcium concentration is involved in the activation of elevated cation influx in dystrophin-deficient SolC1 myotubes is to control the intracellular calcium by buffering it. The rise of intracellular calcium was then inhibited by the presence of a diffusible chelator of calcium BAPTA-AM (10 µM, 15 min pre-incubation). In BAPTA loaded myotubes, store dependent cation entry was suppressed by 27 % in minidys+ SolD6 myotubes (control cells: 15.5 %/min ± 0.3, n=246; BAPTA loaded cells: 11.4 %/min ± 0.5, n=92). In BAPTA-pretreated SolC1 myotubes, store dependent cation entry was inhibited by 44 % (control cells: 26.6 %/min ± 0.5, n=256; BAPTA loaded cells: 15 %/min ± 0.7, n=115) (Fig. 5A). These results suggest that at least one part of cation entry was dependent on released intracellular calcium during stores depletion and/or cytosolic free calcium. Additionally, because chelation of free calcium intracellular blocked cation entry, the data suggest that changes in calcium intracellular directly or indirectly initiate cation influx. This component sensitive to calcium is higher in dystrophin-deficient myotubes and is supported by TRPC1 as shown in Fig. 5B. Indeed, pre-incubation of BAPTA-AM in myotubes transfected with siRNA TRPC1 had no additional effect on store dependent cation entry (siRNA TRPC1 transfected SolC1 myotubes: 13.1 %/min ± 0.7, n=51; siRNA TRPC1 transfected SolC1 myotubes treated with BAPTA-AM: 15.3 %/min ± 0.8, n=78). Clearly, the component of cation influx affected by TRPC1 knock-down in SolC1 myotubes is dependent on cytosolic calcium level.

3.6. Role of cytosolic calcium level in cation influx activated by PLC/PKC pathway

Alternatively, the actions of PLC/PKC on cation entry may be mediated by an intermediary target which can be calcium ion. It is possible that increased intracellular calcium may cause store-dependent channel modulation since PLC [64,65] and PKC isoforms are calcium sensitive [66]. To investigate if calcium-induced cation entry is dependent on PLC and PKC activities in SolC1 myotubes, we performed double treatments of cells: to one side with U13122 plus BAPTA-AM and on the other side chelerythrine plus BAPTA-AM.

Double treatment with U73122 and BAPTA-AM leads to store-dependent cation entry value similar to the one measured in single treatment with BAPTA-AM (BAPTA-AM treated cells: 15 %/min ± 0.7, n=115 and U73122 plus BAPTA-AM treated cells: 16.3 %/min ± 1.4, n=24). Double treatment with chelerythrine and BAPTA-AM also did not have additional effect on store-dependent cation entry (14.7 %/min ± 0.7, n=40) (Fig. 5C). These results clearly demonstrate a calcium dependence of the PLC/PKC pathway in dystrophin-deficient myotubes.

Fig. 5. Involvement of intracellular calcium in activation of PLC/PKC pathway in SolC1 myotubes. Slopes of the Mn^{2+}-induced decreasing phase of fura-2 fluorescence were measured and expressed as % of decrease per min. (A) Bar-graphs represent mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in SolD6 myotubes loaded with 10 µM BAPTA-AM (grey column), in control SolC1 myotubes (black column) and in SolC1 myotubes loaded with 10 µM BAPTA-AM (dotted grey column). (B) Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolC1 myotubes (black column), in SolC1 myotubes transfected with TRPC1 siRNAs (grey column) and in SolC1 myotubes transfected with TRPC1 siRNAs and loaded with 10 µM BAPTA-AM (dark-grey column). (C) Mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolC1 myotubes (black column), in 10 µM BAPTA-AM loaded SolC1 myotubes (dark-grey column), in 10 µM BAPTA-AM loaded SolC1 myotubes treated with 10 µM chelerythrine (grey column) and in 10 µM BAPTA-AM loaded SolC1 myotubes treated with 5 µM U73122 (white column). Difference between mean values of measured parameters was determined by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$).

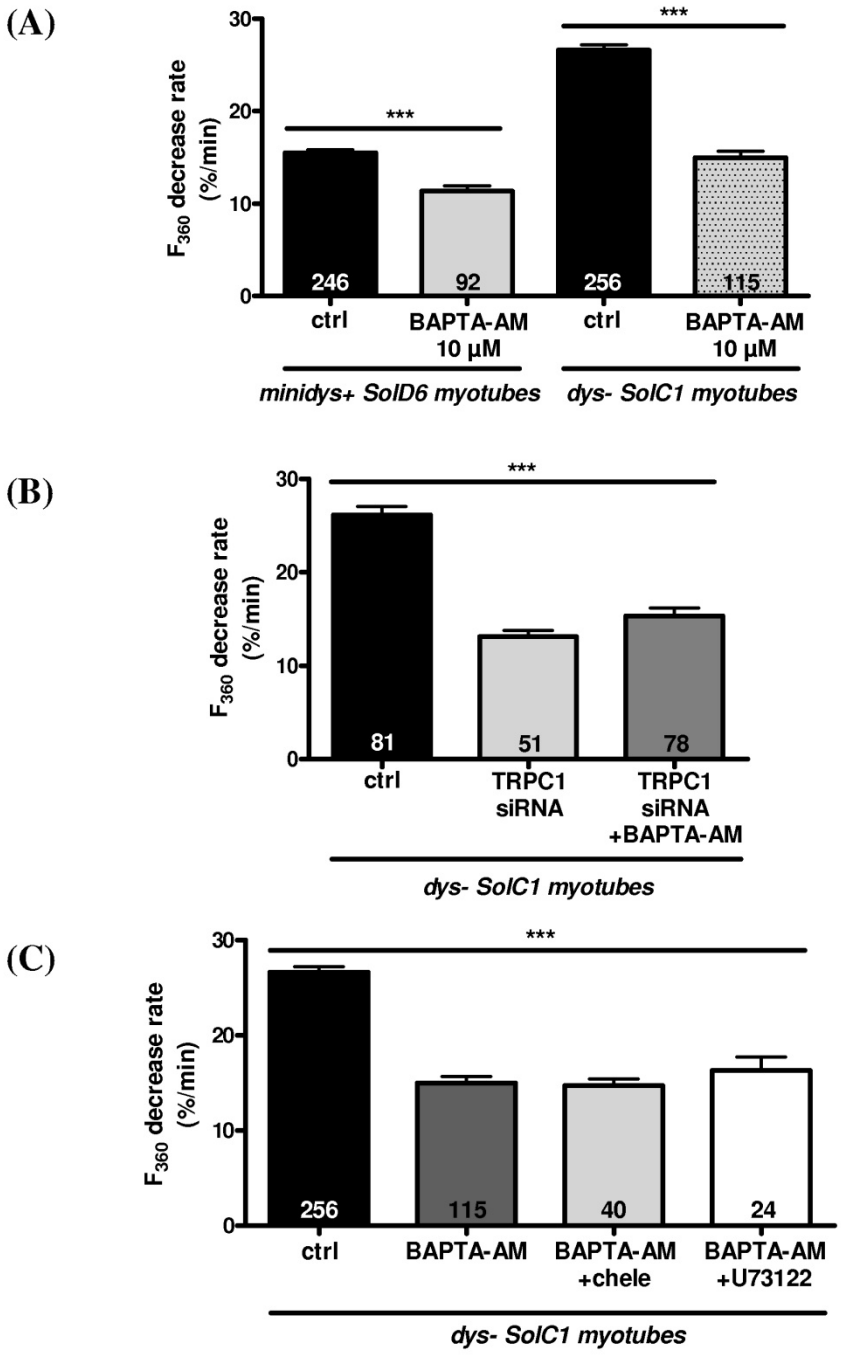

(A)
F_{360} decrease rate (%/min)
30
20
10
0
***
***
246
92
256
115
ctrl
BAPTA-AM 10 µM
ctrl
BAPTA-AM 10 µM
minidys+ SolD6 myotubes
dys- SolC1 myotubes
(B)
F_{360} decrease rate (%/min)
30
20
10
0
***
81
51
78
ctrl
TRPC1 siRNA
TRPC1 siRNA +BAPTA-AM
dys- SolC1 myotubes
(C)
F_{360} decrease rate (%/min)
30
20
10
0
***
256
115
40
24
ctrl
BAPTA-AM
BAPTA-AM +chele
BAPTA-AM +U73122
dys- SolC1 myotubes

Figure 5

3.7. siRNA inhibition of α1-syntrophin expression leads to abnormal increase of PLC/PKC-dependent cation influx in myotubes.

Previously, we have demonstrated the association in a macromolecular complex of α1-syntrophin and TRPC1 and the requirement of the presence of α1-syntrophin in the DAPC for normal regulation of TRPC-dependent cation entry in cultured myotubes [36,41]. We observed abnormal increase of cation entry in absence of α1-syntrophin similar to the one measured in dystrophin-deficient myotubes [36,41]. In order to determine if the PLC pathway is involved in cation entry regulated by the expression of α1-syntrophin, experiments with siRNAs against α1-syntrophin conjugated with chelerythrine or U73122 treatments were performed in SolD6 myotubes. The quenching results in Fig. 6 demonstrate that the abnormal influx measured when α1-syntrophin was knock-down (24.0 %/min ± 0.9, n=81) was reduced after U73122 pre-incubation (10 %/min ± 0.7, n=59) or after chelerythrine pre-incubation (12.6 %/min ± 0.6, n=59). The inhibition of PLC and PKC action counteracted the increase of cation influx resulting from repression of α1-syntrophin. The remaining part of cation entry is similar to the one recorded in control minidys+ myotubes. Therefore, these data clearly show that when dystrophin is absent or α1-syntrophin is reduced, a cation influx is modulated by PLC/PKC pathway, which could lead to TRPC1 stimulation.

Fig. 6. Store-dependent cation influx deregulated by α1-syntrophin knock-down in minidys+ SolD6 myotubes is sensitive to chelerythrine and U73122. Effect of 10 µM chelerythrine and of 10 µM U73122 on store-dependent cation influx in minidys+ SolD6 myotubes transfected with siRNAs against α1-syntrophin. Bar-graphs represent mean rates of fluorescence decrease induced by Mn^{2+} (expressed in %/min) ± SE in control SolD6 myotubes (black column), in SolD6 transfected with α1-syntrophin siRNA (white column), in SolD6 transfected with α1-syntrophin siRNA after administration of 10 µM chelerythrine (dark-grey column) and in SolD6 transfected with α1-syntrophin siRNA after administration of 10 µM U73122 (grey column). Difference between mean values of measured parameters was analysed by Student's t test and considered significant at $P<0.05$ (* = $0.01\leq P<0.05$, ** = $0.001\leq P<0.01$, *** = $P<0.001$).

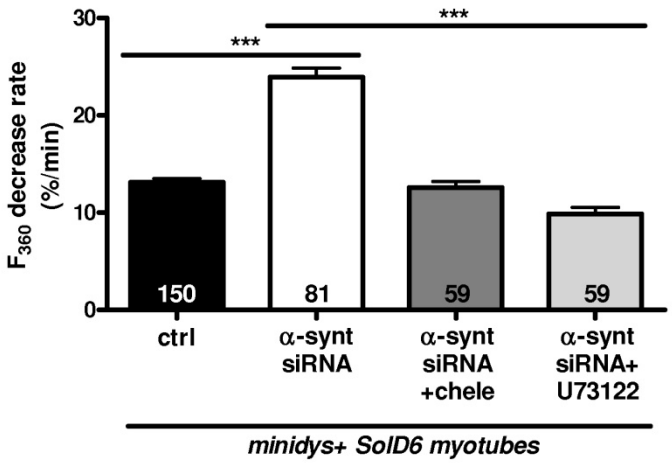


Figure 6

4. Discussion

In this study, we investigated the molecular basis for the native non-voltage dependent cation channels activity in dystrophin-deficient myotubes. We placed our attention on TRPC1 because this protein was shown to play a role in the divalent cation entry pathway activated after store-depletion [10,36,41] or membrane stretch in skeletal muscle [37,38]. Moreover, the TRPC1 channel was shown to be implicated in abnormal divalent cation entry associated with myopathy [36, 39,40], and suggested to be regulated by scaffolding proteins, α1-syntrophin, homer-1, and caveolin-3. In our hands, inhibiting TRPC1 expression by siRNAs strongly attenuated the elevated divalent cation entry measured by quenching of fura-2 by manganese in α1-syntrophin-deficient myotubes [41] as well as in dystrophin-deficient SolC1 myotubes. We show here, that this elevated influx was decreased at similar level by chelation of cytoplasmic calcium by BAPTA and by silencing TRPC1 by means of siRNAs in dystrophin-deficient myotubes. We suggest that TRPC1 activity in the sarcolemma of dystrophin-deficient muscle cells, are potentiated by cytosolic calcium. Such an effect was also shown to exist for TRPC3 in CHO cells [50]. The activation of TRPC1 by intracellular calcium in dystrophin-deficient myotubes may represent either a direct interaction of calcium with the channel or may be the result of a more complex process involving a calcium-dependent step.

Several studies have previously reported that PLC regulates calcium entry in different cell types [47-49]. In this work, we show for the first time that inhibition of PLC caused a substantial decrease in cation entry through TRPC1 channels in dystrophin-deficient myotubes. This suggests that, in these cells, store-dependent channels are modulated by PLC activity or that TRPC1 channels are activated by the PLC pathway mobilized during a depletion protocol using caffeine repetitive activation of calcium-release and inhibition of SERCA by CPA. The possibility of indirect effect of inhibition of PLC through a decrease in the concentration of DAG is unlikely, since the application of 200 µM OAG or applications of DAG lipase (RHC-80267) and DAG kinase (R59949) inhibitors had no effect on store-dependent cation entry. On the other hand, store-dependent cation influx was inhibited with chelerythrine, the usual inhibitor of PKC, in dystrophin-deficient myotubes. This kinase is known to modulate the activity of TRPCs by phosphorylation state [58,62,67]. Indeed, TRPCs channels are known to possess potential PKC phosphorylation sites at the N and C-terminal domains [68,69]. These data suggest that PKC mediates, through phosphorylation of TRPC1, the increase of divalent cation entry in dystrophin-deficient myotubes. On the contrary, the dependency of store-dependent cation entry on PLC and PKC activity was never observed

when normal calcium homeostasis and divalent cation entry was restored by expression of mini-dystrophin. Inhibition of PKC and PLC decreased the cation influx in dystrophin-deficient myotubes at the same level measured in myotubes expressing mini-dystrophin. The remaining component may reflect a store-operated cation entry activated in both types of myotubes. In dystrophin-deficient myotubes, the increased cation influx may thus be the result of an additional component dependent on PLC/PKC pathway, which is repressed in SolD6 myotubes.

Different studies have proposed that PLC has a role in the activation of store-dependent channels unrelated to its catalytic activity [46-48,70]. Since modulation of DAG production had no impact on divalent cation entry, this suggests that activation/potentiation by PLC may not involve its catalytic activity. It is possible that PLC interacts directly with TRPC1 channels, since several members of the TRP family were recently shown to interact with PLC, including TRPM7 [71], TRPC1 [47], TRPC2 [72], and TRPC3 [73]. In accordance with this idea, we were able to coimmunoprecipitate PLC with TRPC1 in C57BL/10 and *mdx* muscle.

It is also well known that PLC and PKC isoforms are sensitive to calcium [64-66,74]. Several works demonstrated the influence of intracellular calcium for generating non-voltage dependent calcium entry [51,75]. They described that the calcium effect on calcium entry was not direct, but mediated through a calcium-calmodulin-dependent pathway in T lymphocytes and in CHO cells. Moreover, in fetal skeletal muscle, Collet and Ma revealed an important mechanism of calcium-dependent facilitation of SOCE [76]. Their study showed that a component of SOCE in the fetal skeletal muscle could be enhanced by a transient elevation of intracellular calcium. This was observed in a majority of the cell preparations, and clearly demonstrated by the increase in Mn^{2+} entry rate when strong intracellular calcium elevation was generated by SOCE in the presence of thapsigargin, preventing calcium refilling into the SR. The enhancement of Mn^{2+} entry rate appears to be specific for calcium ions.

A dependency on cytosolic calcium of the modulation/activation effect exerted by PLC/PKC on cation influx was supported by experiments where intracellular calcium was directly chelated by BAPTA. Chelation of cytosolic calcium by BAPTA led to reduction to the half of increased cation entry induced by CPA and caffeine. Moreover, PLC and PKC inhibitors had no additional effect to BAPTA treatment, suggesting that a same cation influx was modulated by a single calcium/PLC/PKC pathway.

This potentiation of divalent cation entry through a calcium/PLC/PKC pathway may be achieved by an elevation in intracellular calcium in dystrophin-deficient myotubes, or the loss

of an inhibitory mechanism due to the decrease of α1-syntrophin-mediated regulation [41]. As shown previously, the dystrophin or α1-syntrophin deficiencies result in an increased store-dependent cation influx that can be restored to a normal level by mini-dystrophin and α1-syntrophin forced expression [36,41]. We show here that increased cation influx recorded both in dystrophin-deficient myotubes and in α1-syntrophin-deficient myotubes were dependent on PLC/PKC activity. This suggests that the loss of this scaffold resulted in a calcium/PLC/PKC dependent potentiation of divalent cation influx in cultured myotubes. Quantification of mRNA and protein levels encoding for PLC isoforms, showing no expression changes at the transcriptional and protein levels, are in favor of a modulation of PLC activity by α1-syntrophin. The α1-syntrophin is a component of dystrophin-associated complex in normal skeletal muscle and recruit signaling proteins such as nNOS [77], sodium channels SkM1 and SkM2 [78,79], the potassium channel Kir4.1 [80] via their multiples protein-protein interaction motifs. It is possible that dystrophin and α1-syntrophin can form a macromolecular complex with PLC in muscle. α1-syntrophin can act directly as regulatory a molecule on PLC pathway or indirectly thanks to G protein. Two studies from Okumura and colleagues and Zhou and colleagues are in favor of this hypothesis demonstrating that α1-syntrophin interacts *in vitro* with multiple isoforms of heterotrimeric G protein α subunits in COS-7 cells and with heterotrimeric G protein β,γ subunits in rabbit skeletal muscle [81,82]. As shown before [41], the N-terminal part of α1-syntrophin, containing the PDZ domain, is necessary for recovery of normal influx transported by TRPC1 in dystrophin-deficient myotubes. This may reflect a critical role of this domain for recruiting regulatory components near TRPC1 channels, and for repressing the Ca^{2+}/PLC/PKC pathway, which overactivates TRPC1 channels when the scaffolding protein is lost in dystrophin-deficient cells. Moreover, the increase in sub-plasmalemmal calcium concentration related to higher activity of sarcolemmal cation channels or from other internal sources [4,5,83,84] may in turn amplify the overactivation of this pathway. The figure 7 represents hypothesis concerning the regulation of cation entry by dystrophin/α1-syntrophin complex in myotubes expressing mini-dystrophin and the increased cation entry through TRPC1 in dystrophin-deficient myotubes.

This deregulation dependent on calcium signaling pathway observed at early stages of development in cultured myotubes may be accompanied by other phenomenon in contractile mature fibers. Repeat contractile activity of dystrophin-deficient fibers may overactivate MS channels through the changes in membrane properties and the loss of the linkage to cytoskeleton, as well as inducing microdisruption of the sarcolemma.

Our work and other studies suggest that TRPC1 is involved in a slow and cumulative calcium entry observed in dystrophin-deficient muscle cells because of changes in regulation by signaling pathway and/or mechanical properties. It suggests that this channel may be at the center of a signaling complex dependent on α1-syntrophin and dystrophin which could be the target of future pharmacological research for reducing the calcium overload responsible for higher proteolysis activity and muscle cells necrosis.

Fig. 7. Schema of the store-dependent cation entry pathway mechanism. (A) A proposed structural model of the mini-dystrophin/α1-syntrophin reduction effect on PLC activity. The presence of mini-dystrophin and α1-syntrophin proteins would repress the activity of PLC via direct interaction or via the Gi protein. TRPC1 and TRPC4 are core components for store-dependent channels in SolD6 myotubes expressing mini-dystrophin. TRPC1/TRPC4 channels are regulated by the presence of mini-dystrophin and α1-syntrophin. (B) The absence of dystrophin and α1-syntrophin at the sarcolemma lead to activation of PLC/PKC pathway and consequently increased cation influx through TRPC1 channels in dystrophin-deficient myotubes. This is due to the loss of an inhibitory mechanism due to the decrease of α1-syntrophin at the sarcolemma. This phenomenon is accompanied with a sub-sarcolemmal increase of calcium at rest, which also could activate PLC and PKC and consequently overactivate TRPC1 channels in dystrophin-deficient myotubes. (DG, dystroglycans; SS, sarcospan; SOC, Store-Operated Channels; MS, MechanoSensitive; CPA, CycloPiazonic Acid).

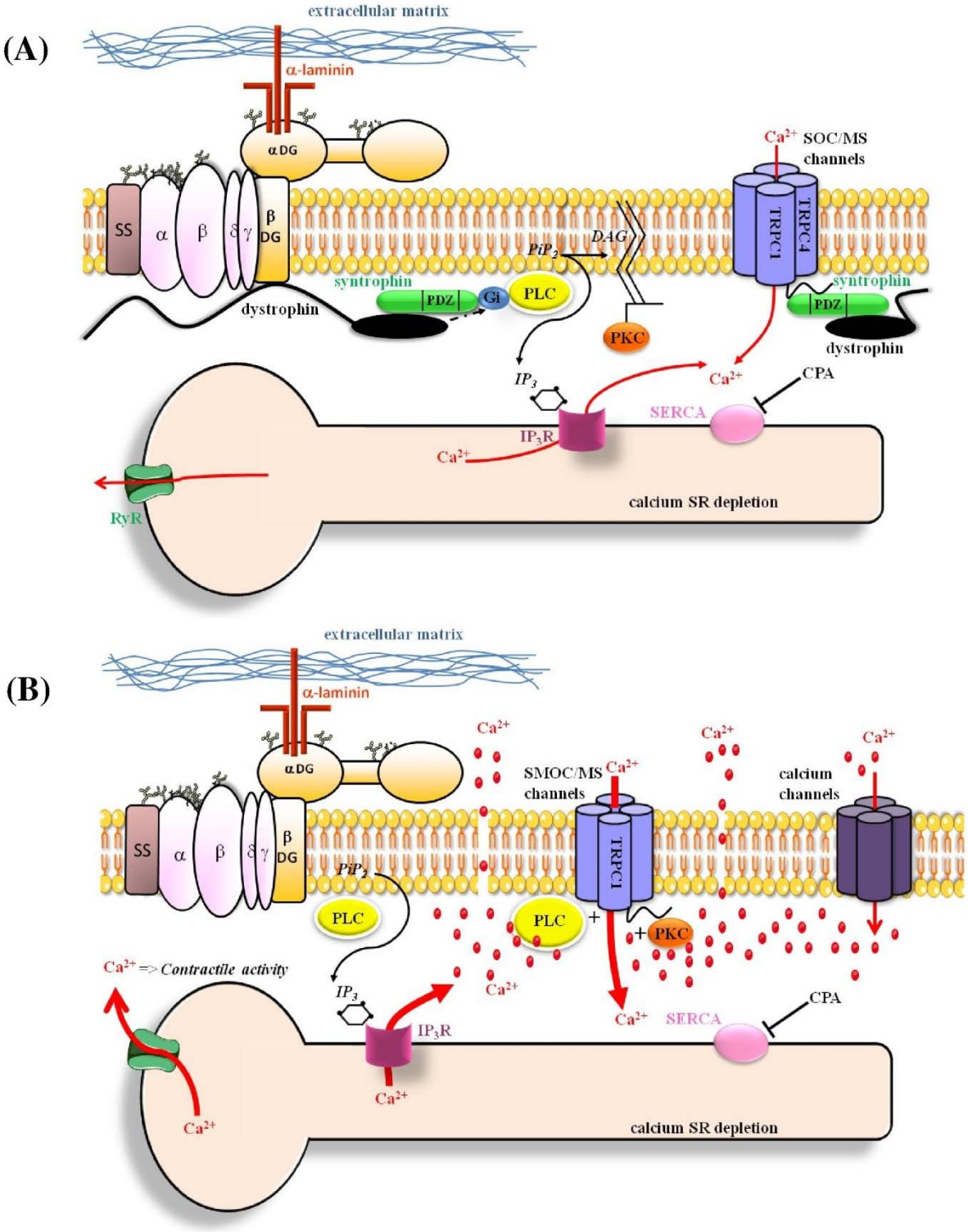

(A)
extracellular matrix
α-laminin
αDG
SS
α
β
δ γ
β DG
dystrophin
syntrophin
PDZ
Gi
PLC
PiP2
DAG
PKC
Ca2+ SOC/MS channels
TRPC1
TRPC4
syntrophin
PDZ
dystrophin
IP3
Ca2+
CPA
SERCA
IP3R
Ca2+
RyR
calcium SR depletion
(B)
extracellular matrix
α-laminin
αDG
SS
α
β
δ γ
β DG
PiP2
PLC
PLC
SMOC/MS channels
Ca2+
TRPC1
calcium channels
Ca2+
Ca2+
Ca2+
PKC
Ca2+ => Contractile activity
IP3
IP3R
Ca2+
Ca2+
Ca2+
SERCA
CPA
Ca2+
calcium SR depletion

Figure 7

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS, the French Ministry of Research, and by "Association Française contre les Myopathies" (AFM). We thank Dr. Craig Montell from The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore USA, for giving us the plasmid encoding for TRPC1 and TRPC4 channels. We thank Françoise Mazin for technical assistance.

References

[1]Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50:** 509-517.

[2]Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; **51:** 919-928.

[3]Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993; **122:** 809-823.

[4]Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 1988; **335:** 735-738.

[5]Turner PR, Fong PY, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol* 1991; **115:** 1701-1712.

[6]Fong PY, Turner PR, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 1990; **250:** 673-676.

[7]Tutdibi O, Brinkmeier H, Rudel R, Fohr KJ. Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol* 1999; **515 (Pt 3):** 859-868.

[8]MacLennan PA, McArdle A, Edwards RH. Effects of calcium on protein turnover of incubated muscles from mdx mice. *Am J Physiol* 1991; **260:** E594-E598.

[9]Hopf FW, Reddy P, Hong J, Steinhardt RA. A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. *J Biol Chem* 1996; **271:** 22358-22367.

[10]Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, Debaix H, Gailly P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 2002; **158:** 1089-1096.

[11]Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; **7:** 1-12.

[12]Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 1997; **77:** 901-930.

[13]Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC et al. Attenuation of store-operated Ca2+ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104:** 17542-17547.

[14]Freichel M, Suh SH, Pfeifer A et al. Lack of an endothelial store-operated Ca2+ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nat Cell Biol* 2001; **3:** 121-127.

[15]Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. *J Cell Biol* 2005; **169:** 435-445.

[16]Huang GN, Zeng W, Kim JY et al. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 2006; **8:** 1003-1010.

[17]Vig M, Beck A, Billingsley JM et al. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 2006; **16:** 2073-2079.

[18]Peinelt C, Vig M, Koomoa DL et al. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 2006; **8:** 771-773.

[19]Vig M, DeHaven WI, Bird GS et al. Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat Immunol* 2008; **9:** 89-96.

[20]Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS et al. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2008; **10:** 688-697.

[21]Lyfenko AD, Dirksen RT. Differential dependence of store-operated and excitation-coupled Ca2+ entry in skeletal muscle on STIM1 and Orai1. *J Physiol* 2008; **586:** 4815-4824.

[22]Liou J, Kim ML, Heo WD et al. STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. *Curr Biol* 2005; **15:** 1235-1241.

[23]Zhang SL, Yu Y, Roos J et al. STIM1 is a Ca2+ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca2+ store to the plasma membrane. *Nature* 2005; **437:** 902-905.

[24]Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G et al. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 1998; **396:** 478-482.

[25]Rosado JA, Sage SO. Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca2+ stores are depleted. *Biochem J* 2000; **350 Pt 3:** 631-635.

[26]Randriamampita C, Tsien RY. Emptying of intracellular Ca2+ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca2+ influx. *Nature* 1993; **364:** 809-814.

[27]Csutora P, Su Z, Kim HY et al. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96:** 121-126.

[28]Yao Y, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Tsien RY. Activation of store-operated Ca2+ current in Xenopus oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 1999; **98:** 475-485.

[29]Alderton JM, Ahmed SA, Smith LA, Steinhardt RA. Evidence for a vesicle-mediated maintenance of store-operated calcium channels in a human embryonic kidney cell line. *Cell Calcium* 2000; **28:** 161-169.

[30]Kurebayashi N, Ogawa Y. Depletion of Ca2+ in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca2+ entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2001; **533:** 185-199.

[31]Boittin FX, Petermann O, Hirn C et al. Ca2+-independent phospholipase A2 enhances store-operated Ca2+ entry in dystrophic skeletal muscle fibers. *J Cell Sci* 2006; **119:** 3733-3742.

[32]Ducret T, Vandebrouck C, Cao ML, Lebacq J, Gailly P. Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2006; **575:** 913-924.

[33]Gonzalez Narvaez AA, Castillo A. Ca2+ store determines gating of store operated calcium entry in mammalian skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2007; **28:** 105-113.

[34]Gutierrez-Martin Y, Martin-Romero FJ, Henao F. Store-operated calcium entry in differentiated C2C12 skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1711:** 33-40.

[35]Weigl L, Zidar A, Gscheidlinger R, Karel A, Hohenegger M. Store operated Ca2+ influx by selective depletion of ryanodine sensitive Ca2+ pools in primary human skeletal muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; **367:** 353-363.

[36]Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J et al. Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *FASEB J* 2007; **21:** 608-617.

[37]Louis M, Zanou N, Van Schoor M, Gailly P. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci* 2008; **121:** 3951-3959.

[38]Formigli L, Sassoli C, Squecco R et al. Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci* 2009; **122:** 1322-1333.

[39]Stiber JA, Zhang ZS, Burch J et al. Mice lacking Homer 1 exhibit a skeletal myopathy characterized by abnormal transient receptor potential channel activity. *Mol Cell Biol* 2008; **28:** 2637-2647.

[40]Gervasio OL, Whitehead NP, Yeung EW, Phillips WD, Allen DG. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Sci* 2008; **121:** 2246-2255.

[41]Sabourin J, Lamiche C, Vandebrouck A, Magaud C, Rivet J, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B. Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an α1-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes. *J Biol Chem* 2009.

[42]Liberona JL, Powell JA, Shenoi S, Petherbridge L, Caviedes R, Jaimovich E. 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* 1998; **21:** 902-909.

[43]Balghi H, Sebille S, Constantin B et al. Mini-dystrophin expression down-regulates overactivation of G protein-mediated IP3 signaling pathway in dystrophin-deficient muscle cells. *J Gen Physiol* 2006; **127:** 171-182.

[44]Mondin L, Balghi H, Constantin B, Cognard C, Sebille S. NEGATIVE MODULATION OF INOSITOL 1,4,5-TRISPHOSPHATE TYPE 1 RECEPTOR EXPRESSION PREVENTS DYSTROPHIN-DEFICIENT MUSCLE CELLS DEATH. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009.

[45]Rosado JA, Sage SO. Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *J Physiol* 2000; **529 Pt 1:** 159-169.

[46]Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GS, Kurosaki T, Putney JW, Jr. Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 2001; **276:** 15945-15952.

[47]Tu CL, Chang W, Bikle DD. Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2005; **124:** 187-197.

[48]Patterson RL, van Rossum DB, Ford DL et al. Phospholipase C-gamma is required for agonist-induced Ca2+ entry. *Cell* 2002; **111:** 529-541.

[49]Litjens T, Nguyen T, Castro J et al. Phospholipase C-gamma1 is required for the activation of store-operated Ca2+ channels in liver cells. *Biochem J* 2007; **405:** 269-276.

[50]Zitt C, Obukhov AG, Strubing C et al. Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol* 1997; **138:** 1333-1341.

[51]Haverstick DM, Gray LS. Increased intracellular Ca2+ induces Ca2+ influx in human T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 1993; **4:** 173-184.

[52]Ahmmed GU, Mehta D, Vogel S et al. Protein kinase Calpha phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated Ca2+ entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; **279:** 20941-20949.

[53]Zhang F, Wen Q, Mergler S et al. PKC isoform-specific enhancement of capacitative calcium entry in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47:** 3989-4000.

[54]Smani T, Patel T, Bolotina VM. Complex regulation of store-operated Ca2+ entry pathway by PKC-epsilon in vascular SMCs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **294:** C1499-C1508.

[55]Vandebrouck A, Ducret T, Basset O, Sebille S, Raymond G, Ruegg U, Gailly P, Cognard C, Constantin B. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J* 2006; **1**:136-138.

[56]Jin W, Lo TM, Loh HH, Thayer SA. U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* 1994; **642:** 237-243.

[57]Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999; **397:** 259-263.

[58]Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem* 2003; **278:** 29031-29040.

[59]Shuttleworth TJ, Thompson JL. Discriminating between capacitative and arachidonate-activated Ca(2+) entry pathways in HEK293 cells. *J Biol Chem* 1999; **274:** 31174-31178.

[60]Gailly P. Ca2+ entry in CHO cells, after Ca2+ stores depletion, is mediated by arachidonic acid. *Cell Calcium* 1998; **24:** 293-304.

[61]Sutherland CA, Amin D. Relative activities of rat and dog platelet phospholipase A2 and diglyceride lipase. Selective inhibition of diglyceride lipase by RHC 80267. *J Biol Chem* 1982; **257:** 14006-14010.

[62]Saleh SN, Albert AP, Peppiatt-Wildman CM, Large WA. Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes. *J Physiol* 2008; **586:** 2463-2476.

[63]Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **172:** 993-999.

[64]Essen LO, Perisic O, Cheung R, Katan M, Williams RL. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 1996; **380:** 595-602.

[65]Allen V, Swigart P, Cheung R, Cockcroft S, Katan M. Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca2+ ion concentrations. *Biochem J* 1997; **327 (Pt 2):** 545-552.

[66]Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008; **88:** 1341-1378.

[67]Large WA, Saleh SN, Albert AP. Role of phosphoinositol 4,5-bisphosphate and diacylglycerol in regulating native TRPC channel proteins in vascular smooth muscle. *Cell Calcium* 2009; **45:** 574-582.

[68]Beech DJ, Xu SZ, McHugh D, Flemming R. TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* 2003; **33:** 433-440.

[69]Ambudkar IS. Ca2+ signaling microdomains:platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol Sci* 2006; **27:** 25-32.

[70]Berven LA, Barritt GJ. Evidence obtained using single hepatocytes for inhibition by the phospholipase C inhibitor U73122 of store-operated Ca2+ inflow. *Biochem Pharmacol* 1995; **49:** 1373-1379.

[71]Runnels LW, Yue L, Clapham DE. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol* 2002; **4:** 329-336.

[72]Tong Q, Chu X, Cheung JY et al. Erythropoietin-modulated calcium influx through TRPC2 is mediated by phospholipase Cgamma and IP3R. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **287:** C1667-C1678.

[73]van Rossum DB, Patterson RL, Sharma S et al. Phospholipase Cgamma1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature* 2005; **434:** 99-104.

[74]Rebecchi MJ, Pentyala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 2000; **80:** 1291-1335.

[75]Gailly P, Hermans E, Gillis JM. Role of [Ca2+]i in "Ca2+ stores depletion-Ca2+ entry coupling' in fibroblasts expressing the rat neurotensin receptor. *J Physiol* 1996; **491 (Pt 3):** 635-646.

[76]Collet C, Ma J. Calcium-dependent facilitation and graded deactivation of store-operated calcium entry in fetal skeletal muscle. *Biophys J* 2004; **87:** 268-275.

[77]Brenman JE, Chao DS, Gee SH et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 1996; **84:** 757-767.

[78]Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* 1998; **18:** 128-137.

[79]Schultz J, Hoffmuller U, Krause G et al. Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol* 1998; **5:** 19-24.

[80]Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* 2004; **279:** 28387-28392.

[81]Okumura A, Nagai K, Okumura N. Interaction of alpha1-syntrophin with multiple isoforms of heterotrimeric G protein alpha subunits. *FEBS J* 2008; **275:** 22-33.

[82]Zhou YW, Oak SA, Senogles SE, Jarrett HW. Laminin-alpha1 globular domains 3 and 4 induce heterotrimeric G protein binding to alpha-syntrophin's PDZ domain and alter intracellular Ca2+ in muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **288:** C377-C388.

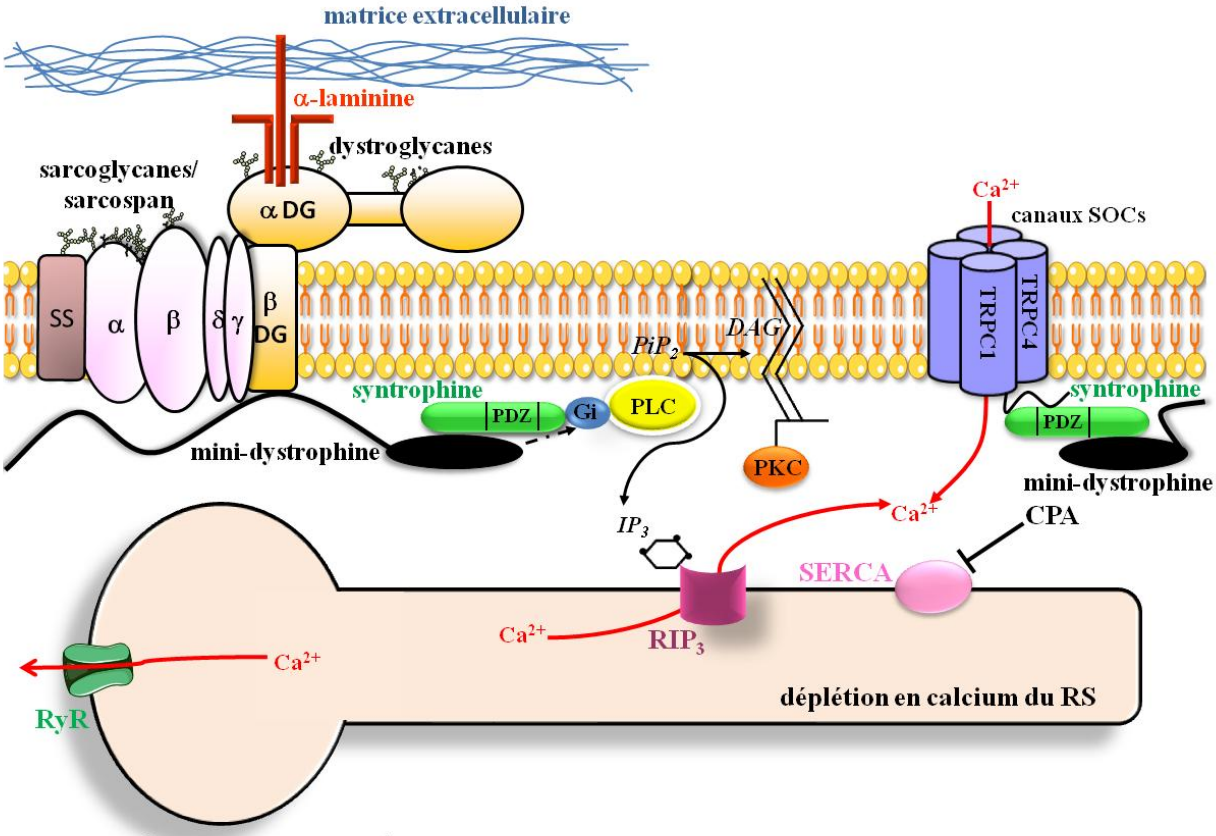
[83]Hopf FW, Turner PR, Denetclaw WF, Jr., Reddy P, Steinhardt RA. A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am J Physiol* 1996; **271:** C1325-C1339.

[84]Imbert N, Cognard C, Duport G, Guillou C, Raymond G. Abnormal calcium homeostasis in Duchenne muscular dystrophy myotubes contracting in vitro. *Cell Calcium* 1995; **18:** 177-186.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons mis en évidence, dans le muscle squelettique, un complexe macromoléculaire (ou signalosome) constitué du canal cationique TRPC1/TRPC4, de la dystrophine et de la protéine adaptatrice, l'α1-syntrophine. La dystrophine constitue le lien entre les canaux TRPCs et le DAP. L'α1-syntrophine, membre du DAP, y joue un rôle essentiel par ces multiples domaines d'interaction, en apportant à proximité des canaux de nombreuses protéines de signalisation. Cet environnement bien spécifique et organisé également appelé microdomaine concoure au bon fonctionnement et à la régulation normale des canaux TRPCs dans le muscle squelettique (voir schéma ci-dessous). Ce complexe macromoléculaire semble être conservé de la lignée myogénique jusqu'au muscle entier.

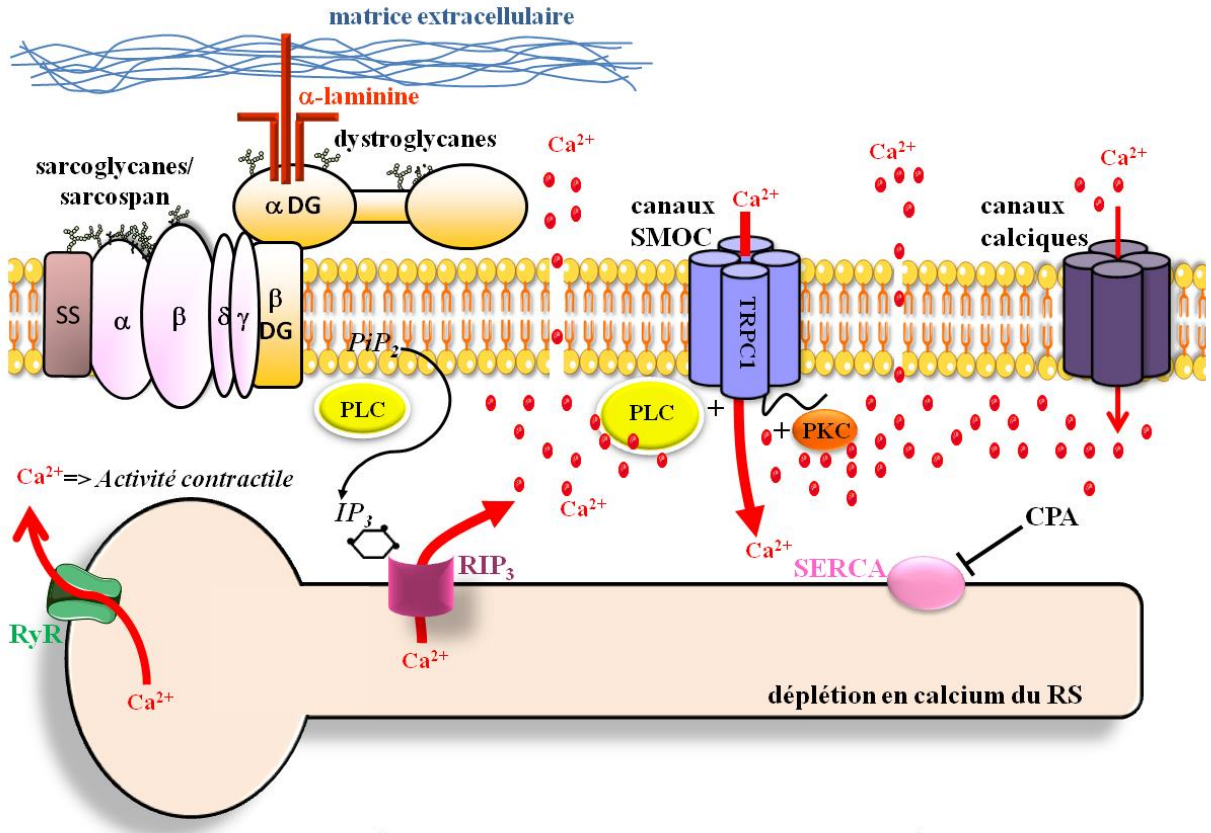
Les études sur les systèmes d'expressions hétérologues ne peuvent pas reconstruire cet environnement particulier et les résultats sur l'activité et/ou les modes d'activation des canaux TRPCs apparaissent souvent très disparates. Néanmoins, en combinant des approches sur différentes préparations, il est possible de dégager une vision assez détaillée des systèmes à l'œuvre.



Régulation des entrées cationiques transitant par le canal TRPC1/TRPC4 par le complexe α1-syntrophine/mini-dystrophine dans les myotubes SolD6

-Conclusion générale-

L'altération du signalosome dans les cellules déficientes en dystrophine perturbe l'agencement et l'organisation du canal et modifie son activité. Ainsi, dans les conditions pathologiques, la composition et le mode d'activation des canaux cationiques semblent être modifiés (voir schéma ci-dessous). En effet, seul le canal TRPC1 supporte les entrées cationiques dans les myotubes déficients en dystrophine. Celui-ci est sensible à la déplétion en calcium des stocks intracellulaires mais également à la voie PLC/PKC. Cette sensibilité conduit alors à une activité accrue des canaux TRPC1 et participe donc à la surcharge calcique et à la nécrose des cellules déficientes en dystrophine. La dystrophine et l'α1-syntrophine semblent donc agir comme éléments régulateurs négatifs par une association directe ou indirecte avec la voie PLC dans le muscle squelettique. Mais le calcium, lui-même, semble avoir une part de responsabilité dans la dérégulation de l'activité du canal TRPC1. En effet, l'augmentation du calcium libre sous membranaire, dans les cellules déficientes en dystrophine, va créer un pool de calcium à proximité du complexe macromoléculaire qui peut augmenter l'activité du canal de manière directe, ou de manière indirecte en agissant sur des protéines calcium-dépendantes telles que la PLC et la PKC qui, par conséquent, vont accroître l'activité des canaux TRPC1.



Implication de la voie Ca^{2+}/PLC/PKC dans l'augmentation des entrées cationiques transitant par le canal TRPC1 dans les myotubes SolC1

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

I. LOCALISATION DES TRPCs DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

Nous avons précédemment démontré que le canal TRPC1 faisait partie du complexe sarcolemmien associé à la dystrophine. Mais les immunomarquages de TRPC1, réalisés sur les myotubes, montrent également une présence intracellulaire de cette protéine. Cette idée est renforcée par le marquage de TRPC1 dans les fibres C57BL/10 qui montre une localisation membranaire mais également le long des striations perpendiculaires à l'axe longitudinal des fibres contrairement au marquage de TRPC4 qui ne parait essentiellement qu'au sarcolemme (Fig. 4, Article 2). Les striations sont des sillons parallèles répétés et organisés qui traduisent la disposition des sarcomères mais également les invaginations membranaires des tubules T. Nous nous sommes donc posés la question de savoir s'il n'existait pas deux populations distinctes de TRPC1 selon leur distribution géographique. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de coimmunoprécipitations avec les canaux calciques du RS. La figure S9 met en évidence une association entre TRPC1 et les canaux calciques du RS tels que RyR1, isoforme prédominante du muscle squelettique, et les RIP_3 dans les tissus musculaires sains C57BL/10 et *mdx* par la présence d'une bande autour de 90 kDa correspondant à TRPC1 dans les immunoprécipitations anti-RyR1 et anti-RIP_3.

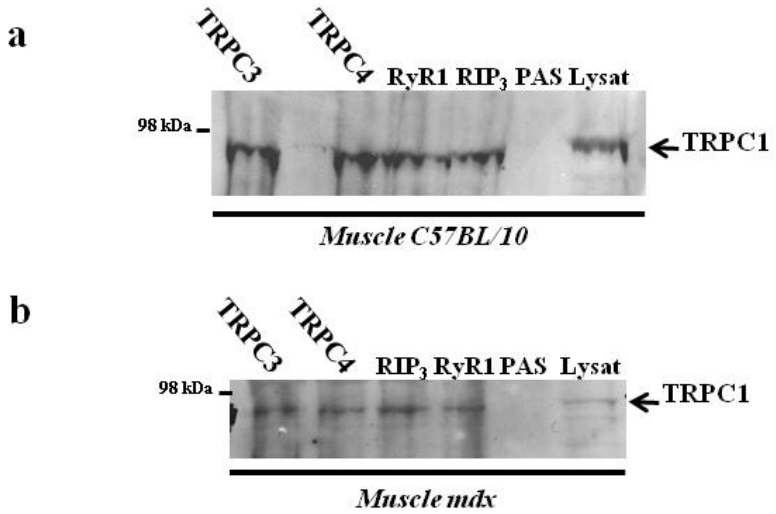


Figure S9: TRPC1 interagit *in vivo* avec les canaux calciques du RS dans les tissus musculaires de souris saines C57BL/10 et souris *mdx*.
Les protéines TRPC1, TRPC3, TRPC4, le RyR1 et les RIP_3 ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats provenant de tissus musculaires de souris saines (a) et de souris *mdx* (b). Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-TRPC1, anti-TRPC3, anti-TRPC4, anti-RyR1 et anti-RIP_3, l'immunoblot révélé par l'anticorps anti-TRPC1. Des billes A sont utilisées en absence de lysat comme contrôle négatif (PAS pour Protein A Sepharose).

La protéine TRPC1 semble donc se situer au niveau du RS terminal par son association avec les RIP_3 mais également au niveau des tubules T en face des citernes terminales, centre du couplage fonctionnel DHPR/RyR. Ces résultats confirment les travaux de Woo et collaborateurs montrant une interaction fonctionnelle entre TRPC1 et RyR1 dans les triades du muscle squelettique (Woo et al., 2008). Il est à noter également que TRPC4, contre toute attente, interagit *in vivo* avec TRPC1 dans le muscle *mdx*. Ceci peut s'expliquer par une expression, un mode d'ancrage et un rôle différents de TRPC4 dans les fibres matures contrairement aux cellules en développement. Ceci n'est pas en faveur de notre hypothèse précédente dans laquelle nous proposions que TRPC1 et TRPC4 ne forment plus un canal hétérotétramérique dans les cellules dépourvues de dystrophine. Cependant, cela n'élimine pas la possibilité que TRPC1 en homotétramères soit seul responsable (ou en association avec d'autres canaux) des influx exacerbés, alors qu'il subsiste toujours dans la fibre une autre population de canaux TRPC1/TRPC4.

La protéine TRPC4, au contraire de TRPC1, n'interagit pas avec les canaux calciques du RS, ceci est démontré par l'absence de bande autour de 110 kDa correspondant à TRPC4 dans les immunoprécipitations anti-RIP_3 et anti-RyR1 dans le tissu C57BL/10 sain (Fig. S10). TRPC4 est une protéine essentiellement localisée au sarcolemme, comme le suggère les immunomarquarges (Fig. 4, Article 2).

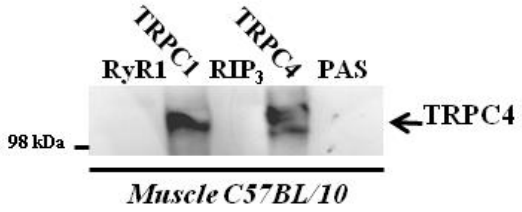


Figure S10: TRPC4 n'interagit pas *in vivo* avec les canaux calciques du RS dans le tissu musculaire de souris C57BL/10 saines.
Les protéines TRPC1, TRPC4, RIP_3 et RyR1 ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats provenant de tissus musculaires de souris C57BL/10. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-TRPC1, anti-TRPC4, anti-RyR1 et anti-RIP_3, l'immunoblot révélé par l'anticorps anti-TRPC4. Des billes A sont utilisées en absence de lysat comme contrôle négatif (PAS pour Protein A Sepharose).

D'autre part, TRPC1 coimmunoprécipite avec TRPC3 dans les tissus musculaires sains et *mdx* (Fig. S9). Ceci suggère une association directe ou indirecte entre ces deux canaux afin de constituer un canal hétérotétramérique. Cette supposition est justifiée puisque dans la littérature, ces deux isoformes sont largement connues pour s'associer et former un canal SOC ou ROC selon le type cellulaire (Zagranichnaya et al., 2005; Liu et al., 2005). La localisation et la fonction de TRPC3 dans le muscle squelettique restent mal connues et très controversées.

Dernièrement, Lee et collaborateurs ont démontré que TRPC3 serait impliqué dans la libération calcique provenant du RS pendant le Couplage Excitation/Contraction ou pendant une activation du calcium release par un activateur des RyR (caféine) suggérant une fonction commune entre TRPC3 et RyR (Lee et al., 2006). La figure S11 met clairement en évidence une association entre TRPC3 et les canaux calciques impliqués dans le Couplage Excitation/Contraction, le RyR1 et le DHPR.

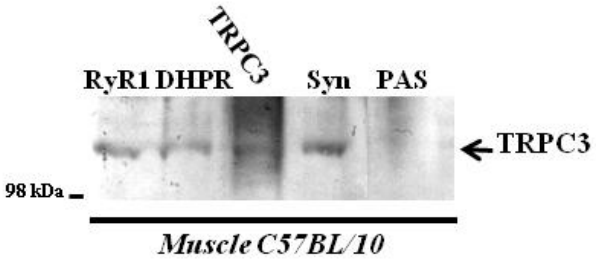
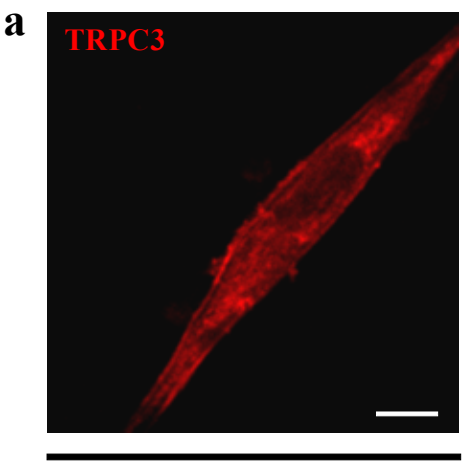
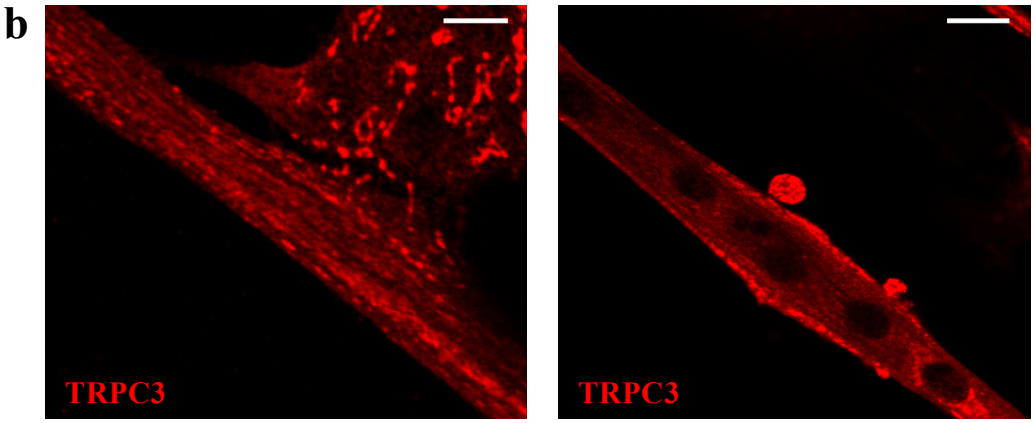


Figure S11: TRPC3 interagit *in vivo* avec les canaux calciques impliqués dans le Couplage Excitation-Contraction dans le tissu musculaire de souris C57BL/10.
Les protéines TRPC3, le RyR1 et le DHPR ont été coimmunoprécipitées à partir de lysats provenant du tissu musculaire de souris saines. Les lysats ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-TRPC3, anti-α1-syntrophine, anti-RyR1 et anti-DHPR, l'immunoblot révélé par l'anticorps anti-TRPC3. Des billes A sont utilisées en absence de lysat comme contrôle négatif (PAS pour Protein A Sepharose).

La protéine TRPC3 semble coimmunoprécipiter également avec l'α1-syntrophine dans le tissu C57BL/10. Ce résultat suggère une localisation au sarcolemme (en plus d'une localisation dans les tubules T) de TRPC3 où il formerait un canal hétérotétramérique avec TRPC1 puisque ces deux protéines semblent également interagir (Fig. S9). Il existe peut être également de l'α1-syntrophine au niveau des tubules T dans les fibres matures. Des immunomarquages de TRPC3 dans des myotubes provenant de cultures primaires de souris C57BL/10 et *mdx* illustrent une localisation réticulaire de TRPC3 mais aussi une localisation à la membrane plasmique (Fig. S12).



Myotubes C57BL/10



Myotubes mdx

Figure S12: Localisation de TRPC3 dans les myotubes provenant de cultures primaires de muscles de souris C57BL/10 et *mdx* .
Immunomarquage de TRPC3 natif dans les myotubes C57BL/10 (a) et *mdx* (b) et visualisation par microscopie confocale. La protéine TRPC3 a été marquée par un anticorps polyclonal anti-TRPC3 révélé par un anticorps secondaire GAR-RRX. Echelle: 10 µM.

Ces résultats ne nous permettent pas de connaître la localisation exacte et la fonction de TRPC1 et TRPC3. *Cependant, il est clair que TRPC1, associé au DAP, forme un canal cationique sarcolemmien dans les myotubes en développement mais il apparaît également et nettement l'existence d'une deuxième population de TRPC1 dans un autre compartiment dans les fibres matures.*

A l'aide des coimmunoprécipitations sur muscle entier, deux hypothèses apparaissent plausibles:

-les canaux TRPC1 et TRPC3 sont situés au niveau du RS terminal où ils interagissent avec les RyR1. Dans ce cas, TRPC1 et TRPC3 peuvent participer à la libération calcique provenant

du RS lors de la dépolarisation en collaboration avec les RyR1. Cette hypothèse rejoint celle de Lee en 2006 et de Woo en 2008.

-les canaux TRPC1 et TRPC3 sont situés le long des tubules T en face des citernes terminales où ils interagissent avec le couplage physique DHPR/RyR au niveau des triades. Ce canal hétérotétramérique (TRPC1/TRPC3) participerait aux ECCEs qui requièrent un couplage conformationnel entre trois différents types de canaux que sont les DHPR, les RyR et les canaux calciques TRPC1/TRPC3. Ce mécanisme, présent dans les tubules T, permet une entrée de calcium et par conséquent un remplissage rapide en calcium du RS pour subvenir aux besoins accrus en calcium des cellules musculaires lors de la contraction musculaire. Ces deux hypothèses sont représentées schématiquement sur la figure S13.

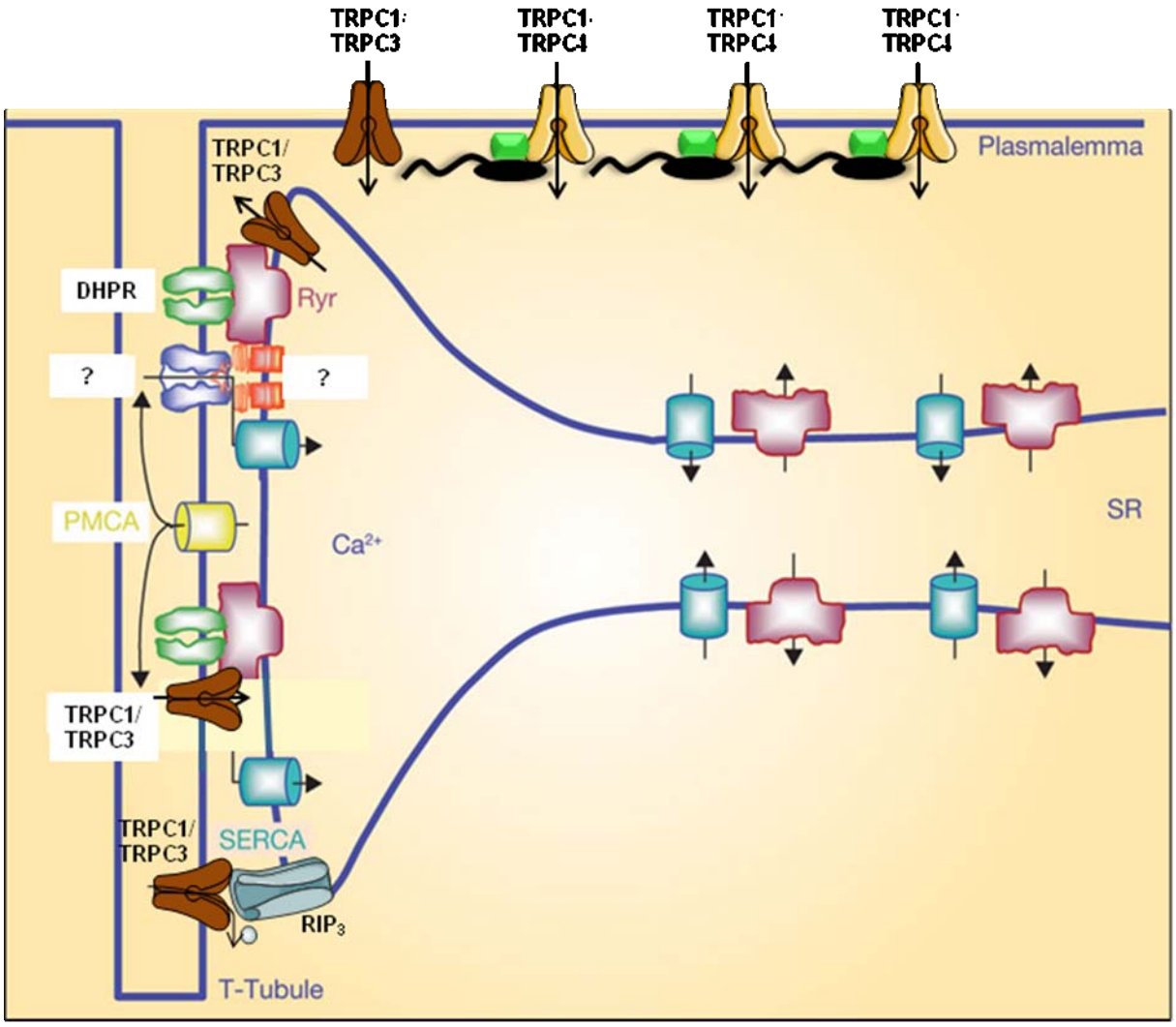


Figure S13: Schéma hypothétique de la répartition des canaux TRPCs dans le muscle squelettique (modifié d'après Shin et Muallem, 2008).

Le canal TRPC1 interagit également avec les RIP_3. Néanmoins, la localisation de ces derniers n'est pas évidente. Certains, comme Volpe et collaborateurs suggèrent une localisation des RIP_3 dans les citernes terminales où ils participent au Couplage Excitation/Contraction (Volpe

et al., 1985; pour revue: Volpe et al., 1986). De ce fait, TRPC1 collaborerait avec les RIP_3 par un couplage structural et participerait aux ECCEs ou aux SOCEs dans les citernes terminales. D'autres voient leurs localisations enrichies au niveau du noyau (Liberona et al., 1998) ou dans les compartiments périnucléaires (Jaimovich et al., 2000). Il se peut que TRPC1 interagissent à ce niveau avec les RIP_3. Ces résultats préliminaires amènent beaucoup de questions auxquelles il est très difficile d'y répondre à ce stade de l'étude. Il faudrait de plus s'assurer de la validité des résultats obtenus avec l'anticorps anti-TRPC3, comme nous l'avons précédemment fait pour TRPC1 et TRPC4 grâce à l'utilisation de siRNA.

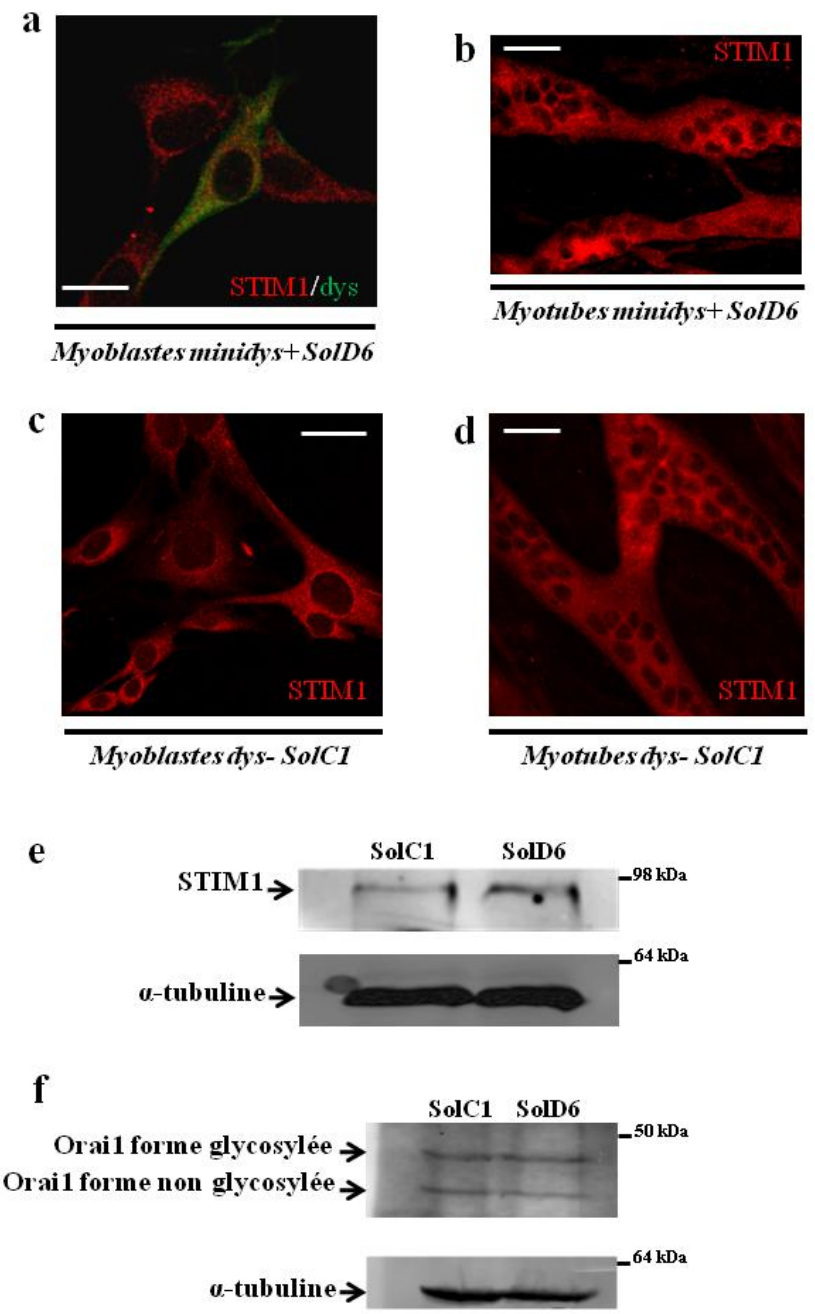


Figure S14: Localisation et expression de STIM1 et Orai1 dans les cellules musculaires SolD6 et SolC1. a-d) Immunomarquage de STIM1 native dans les myoblastes et myotubes SolD6 et SolC1. La protéine STIM1 a été marquée par un anticorps polyclonal anti-STIM1 révélé par un anticorps secondaire GAR-RRX. a) Coimmunomarquage de STIM1 (en rouge) et de la mini-dystrophine (en vert) dans les myoblastes SolD6. b) Immunomarquage de STIM1 (en rouge) dans les myotubes SolD6. c et d) Immunomarquage de STIM1 (en rouge) dans les myoblastes SolC1 (c) et dans les myotubes SolC1 (d). Expression des protéines STIM1 (e) et Orai1 (f) par western blot dans les myotubes SolD6 et SolC1. Echelle: 10 µM.

II. STIM1 ET ORAI: DEUX NOUVELLES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES ENTREES CALCIQUES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

Les protéines STIM et Orai, décrites dans les chapitres ***B.*** *3.1.2.4. STIM1 et 3.1.2.5. Orai* de l'état de l'art, sont des protéines abondamment exprimées dans le muscle squelettique (Vig et al., 2008; Stiber et al., 2008). Du fait de leur contribution majeure dans les SOCEs dans de nombreux types cellulaires y compris les cellules musculaires squelettiques, nous avons voulu étudier l'expression et la distribution de ces deux protéines dans nos lignées cellulaires. Des immunomarquages de STIM1 sur myoblastes et sur myotubes SolD6 et SolC1 montrent une localisation essentiellement au niveau du RS (Fig. S14a-d). La dystrophine (marquage vert) semble être localisée dans le cytoplasme et ne colocalise pas avec STIM1 dans les myoblastes SolD6. Ces deux protéines ne semblent pas se situer dans les mêmes compartiments cellulaires. L'intensité du marquage rouge représentant STIM1 semble être identique entre les deux lignées cellulaires. Le niveau d'expression des protéines STIM1 (Fig. S14e) et Orai1 (Fig. S14f) a été ensuite déterminé par western blot et celui-ci s'avère être le même pour chaque protéine entre les myotubes SolD6 et SolC1. *Les entrées accrues de calcium dans les cellules déficientes en dystrophine ne peuvent donc pas s'expliquer par la surexpression de ces deux protéines.* La présence de ces deux protéines de manière endogène est maintenant acquise dans les cellules SolD6 et SolC1. Pour connaître le rôle fonctionnel de STIM1, nous avons choisi de surexprimer cette dernière et d'étudier l'impact de la surexpression sur les entrées cationiques dans les myotubes SolD6. Pour cela, l'équipe américaine de Worley nous a généreusement donné des plasmides codant pour la protéine STIM1 sauvage (STIM-WT), pour la protéine STIM1 Constitutivement Active ayant la mutation D76A au niveau de son domaine EF-hand, senseur au calcium (STIM-CA) et pour une protéine STIM1 dépourvue de son domaine C-terminal (STIM-DN pour Dominante Négative) (Fig. S15a). Les mesures d'entrées cationiques par la technique d'extinction du fura-2 par le manganèse ont été réalisées selon deux conditions expérimentales: des mesures sans déplétion et après déplétion en calcium du RS (Fig. S15b).

Les influx cationiques de base (absence de déplétion) sont augmentés de 53 % dans les myotubes SolD6 surexprimant STIM-WT (12,1 %/min ± 1,6, n=17), de 33 % dans les myotubes surexprimant STIM-CA (9,7 %/min ± 0,9, n=23) alors que la surexpression du STIM-DN n'a aucun effet sur les influx de base (6,5 %/min ± 0,5, n=34) (Fig. S15b).

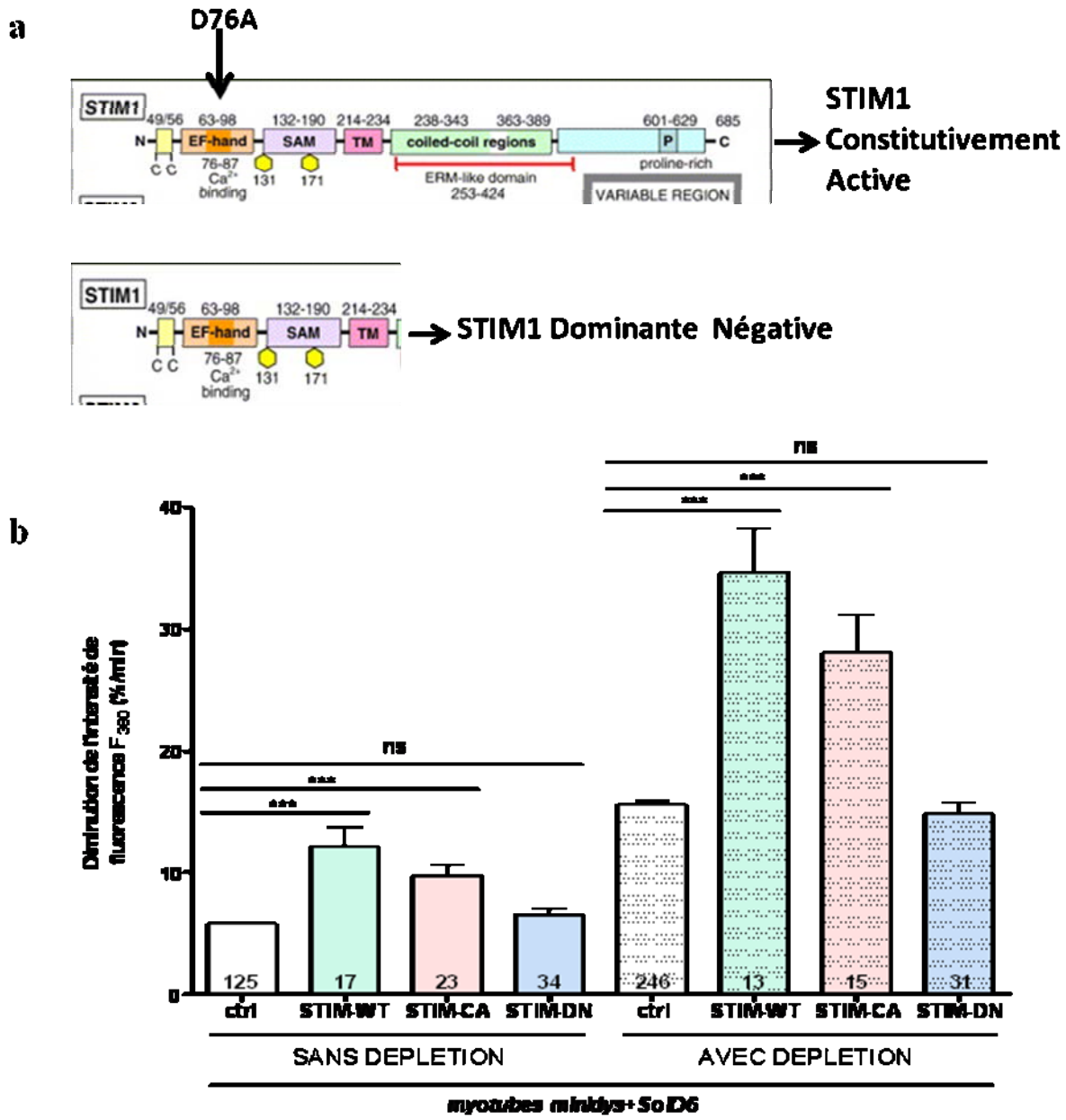


Figure S15: Effet de la surexpression de STIM1 sur les entrées cationiques dans les myotubes SolD6.
a) Représentation des domaines structuraux (domaine EF-hand, domaine SAM, région transmembranaire (TM), le motif Coiled-Coil dans le domaine ERM, région riche en proline (PR) et la queue C-terminale riche en lysine (KK).
b) Histogrammes présentant les pentes moyennes (± S.E.M) d'extinction de la fluorescence du fura-2 par le manganèse (50 µM) dans les myotubes contrôles SolD6 et myotubes SolD6 surexprimant STIM-WT, STIM-CA et STIM-DN. La différence entre les valeurs moyennes est mesurée puis considérée significative à l'aide du t test de Student à partir de $P<0.05$ (ns, non significative, ***$P<0.001$).

STIM-CA avec son domaine EF-hand muté (D76A), s'agrège néanmoins et forme des clusters vers la membrane entrainant une entrée constitutive de cations, vraisemblablement à travers le canal ionique Orai grâce à une interaction physique. Cette interaction physique se fait par l'intermédiaire de la partie C-terminale, c'est pourquoi la surexpression de STIM-DN n'a

aucun effet sur les influx cationiques de base. En effet, l'absence du domaine C-terminal va réduire la translocation de STIM1 vers la membrane plasmique et donc diminuer son interaction avec Orai et, par conséquent inhiber les entrées cationiques. La surexpression de STIM-WT a un effet quelque peu surprenant, car celui-ci n'ayant pas de signal concernant l'état de remplissage en calcium du RS, ne devrait pas avoir le même effet que la surexpression de STIM-CA. Ces résultats pourraient résulter d'une efficacité de transfection du plasmide STIM-WT trop importante où STIM-WT formerait des agrégats suffisant pour activer les entrées de cations. Ou alors, STIM-CA ne joue pas son rôle de 'constitutivement actif' et la surexpression suffit également pour former des agrégats et activer les canaux. Enfin, il se peut que la déplétion en calcium des stocks intracellulaires ne soit pas nécessaire pour l'activation de ces canaux.

D'autre part, les entrées cationiques mesurées suite à la déplétion en calcium du RS sont également augmentées de 55 % dans les myotubes surexprimant STIM-WT (34,6 %/min ± 3,7, n=13) et de 44 % pour STIM-CA (28 %/min ± 3,2, n=15). De manière similaire, la surexpression de STIM-DN n'a aucun effet sur ces influx (14,8 %/min ± 1, n=31).

De manière intrigante, les influx mesurés après la déplétion dans les myotubes STIM-CA sont beaucoup plus importants que ceux mesurés à l'état basal alors que nous sommes exactement dans les mêmes conditions expérimentales puisque la mutation D76A de STIM1 mime la déplétion en calcium du RS grâce à sa faible affinité pour le calcium luminal. Ces résultats montrent clairement la présence de deux populations bien distinctes de canaux cationiques activés par la vidange en calcium du RS. Une première et importante population TRPCs-dépendante que nous avons démontré dans les 3 articles précédents d'une valeur environ de 15 %/min et une deuxième population plus faible et dépendante des protéines STIM/Orai que nous avons mis en évidence par la stratégie de surexpression. Nous proposons que cette dernière composante soit constituée au moins de la protéine Orai1 et qu'elle soit distincte des canaux TRPCs costamériques.

Dans nos conditions expérimentales de mesures d'influx cationiques contrôles, la voie dépendante de STIM/Orai n'apparaît pas ou du moins semble minoritaire. Pourquoi? STIM/Orai semblent être présentes au niveau des tubules T à proximité des citernes terminales et semblent participer aux entrées cationiques à ce niveau (Stiber et al., 2008). Il est probable que les entrées de cations transitant par STIM/Orai soient restreintes à l'espace intertriadique et soient difficiles à mesurer par la technique globale d'extinction du fura-2 par le manganèse. De ce fait, la surexpression de STIM1 amplifie le phénomène et le rend plus perceptible par notre technique. Il faut préciser que nous réalisons une déplétion partielle des

réserves en calcium et que la pompe SERCA est inhibée de manière réversible. Du fait de la proximité entre le RS terminal et les tubules T, le calcium entrant par ces canaux serait immédiatement recapté par la SERCA au niveau du RS, rendant peu visible la variation de calcium par la sonde fura-2. Il faut noter que de telles entrées à travers la membrane des tubules T ont été observées grâce à la diminution de la fluorescence d'une sonde calcique spécifique emprisonnée dans la lumière des tubules T (Launikonis et Rios, 2007). Ces conclusions rejoignent étroitement celles de Stiber et collaborateurs. En effet, les travaux de Stiber montrent l'importance des SOCs dépendants de STIM1 dans le remplissage des stocks intracellulaires qui seront soumis à des stimulations répétées pour préparer la cellule à une nouvelle dépolarisation lors de la contraction musculaire.

Lyfenko et Dirksen proposent eux, deux entités différentes pour les SOCEs et les ECCEs (Lyfenko et Dirksen, 2008). Ils montrent également que les SOCEs requièrent STIM1 et Orai1 dans les myotubes provenant de cultures primaires de muscles squelettiques de souris sauvages et souris dyspédiques (dépourvues de RyR1) mais pas les ECCEs (Lyfenko et Dirksen, 2008). De ce fait, ces deux voies d'entrées calciques reflètent deux entités moléculaires distinctes au niveau des tubules T qui servent à limiter la fatigue musculaire pendant les contractions répétées. Il faut noter que ce groupe mesure les SOCEs dans les myotubes en vidant les stocks de calcium du RS avec la thapsigargine afin d'éviter la recapture du calcium par la SERCA.

Comme nous l'avons suggéré dans un autre chapitre, nous suspectons au moins deux populations distinctes de TRPC1, l'une costamérique étroitement régulée par le DAP, l'autre localisée dans le compartiment des tubules T. La localisation des canaux calciques TRPCs ainsi que STIM/Orai est représentée dans la figure S16. Cette représentation s'inspire de celle proposée par Shin et Muallem en 2008 où ils tentent de synthétiser les différents canaux au niveau de la triade (Shin et Muallem, 2008). Nous y avons intégré différents couples de TRPCs présents au niveau du sarcolemme, au niveau des tubules T et dans les citernes terminales. Le modèle hypothétique que nous proposons repose sur une compartimentalisation spécifique de certains canaux qui seront impliqués soit:

-dans les entrées rapides de calcium directement liées à la libération de calcium des citernes terminales et au Couplage Excitation/Contraction.

-dans les entrées lentes de calcium au niveau du sarcolemme. Celles-ci peuvent moduler l'homéostasie calcique mitochondriale, l'activité de nombreuses protéines de signalisation calcium-dépendantes et le couplage calcium/transcription au niveau des noyaux périphériques.

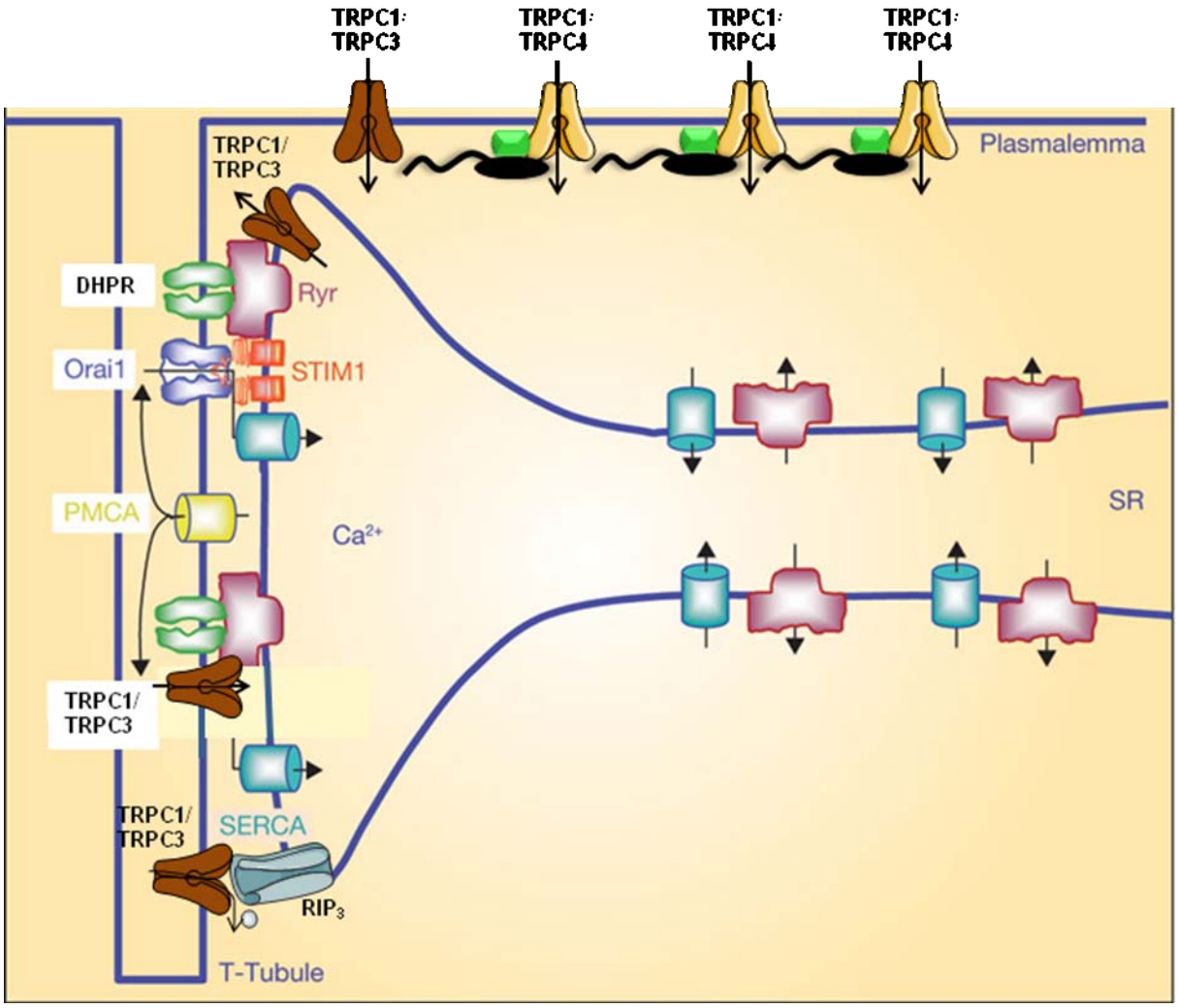


Figure S16: Schéma hypothétique de la répartition des canaux TRPCs, STIM1/Orai1 dans le muscle squelettique (modifié d'après Shin et Muallem, 2008).

III. LES ENTREES CATIONIQUES DE BASE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE

Nous avons mis en évidence plusieurs populations de canaux calciques dépendants des stocks intracellulaires dans notre modèle cellulaire mais reste encore à connaître l'identité moléculaire des canaux cationiques permettant l'entrée cationique de base. Ces entrées cationiques de base sont mesurées grâce à l'administration de 50 µM Mn^{2+} dans le milieu extracellulaire sans vidange calcique du RS au préalable.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé deux agents pharmacologiques tels que le SKF-96365 et le rouge de ruthénium. Le SKF-96365 est largement connu pour inhiber les canaux calciques indépendants du potentiel portés par les protéines TRPCs, STIM et Orai. L'administration de cet inhibiteur dans le milieu extracellulaire n'a aucun effet sur les influx de base mesurés dans les myotubes SolD6 (ctrl SolD6: 5,7 %/min ± 0,1, n=125; après addition du SKF: 6,2 %/min ± 0,3, n=35) (Fig. S17). L'utilisation de siRNA dirigé contre

TRPC1 ne montre également aucun effet de l'absence de l'expression de TRPC1 sur cet influx (5,5 %/min ± 0,5, n=11). Ces premiers résultats suggèrent que TRPC1, STIM et Orai ne soient pas impliqués dans les influx cationiques de base.

Les canaux cationiques TRPVs et TRPMs sont fortement exprimés dans le muscle squelettique plus particulièrement TRPM3, TRPM4, TRPM7, TRPV2 et TRPV4 (Kunert-Keil et al., 2006; Kruger et al., 2008). Le rouge de ruthénium est connu pour être un inhibiteur non spécifique des TRPVs et TRPMs et l'administration de celui-ci n'a également aucun effet sur cet influx (5,5 %/min ± 0,2, n=80) (Fig. S17).

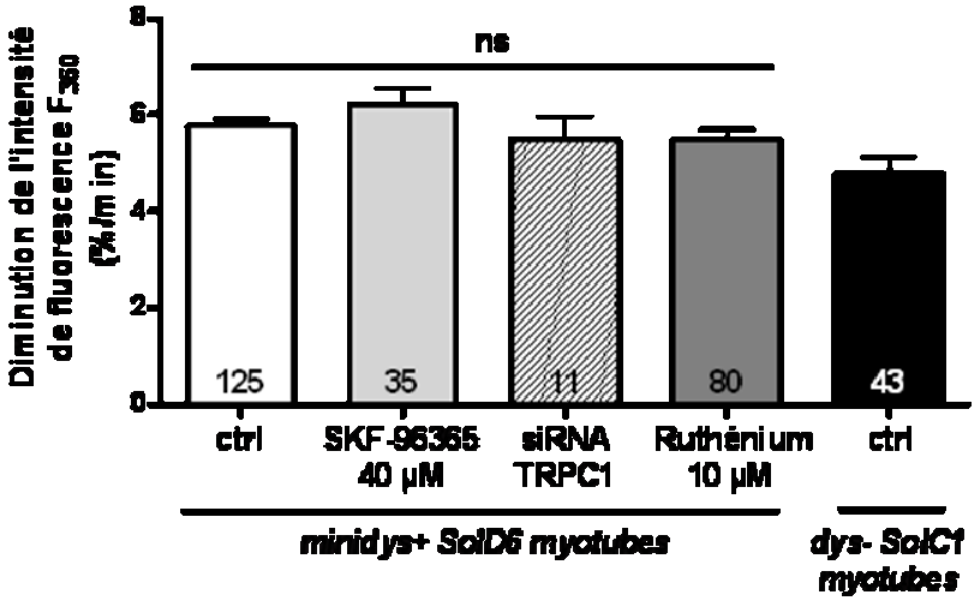


Figure S17: Effet du SKF-96365 et du rouge de ruthénium sur les entrées cationiques indépendantes des stocks intracellulaires dans les myotubes SolD6 et SolC1.
Histogrammes présentant les pentes moyennes (± S.E.M) d'extinction de la fluorescence du fura-2 par le manganèse (50 µM) dans les myotubes contrôles SolD6 et SolC1 et après application des inhibiteurs SKF-96365, rouge de ruthénium et après traitement avec le siRNA TRPC1. La différence entre les valeurs moyennes est mesurée puis considérée significative à l'aide du t test de Student à partir de $P<0.05$ (ns, non significative).

Ce dernier, néanmoins, est sensible à 10 µM Gd^{3+} car cette drogue inhibe de manière drastique les influx atteignant des valeurs proches de 0 (Fig. S4). A l'heure actuelle, nous n'avons pas pu identifier l'entité moléculaire de ce canal. Les canaux calciques de type L ne peuvent pas être impliqués dans ces entrées car ils sont activés à un potentiel de -30 mV (Cognard et al., 1986; Imbert et al., 2001) or le potentiel de repos dans les myotubes SolD6 est de -67 mV (tableau I supplémentaire, Article 2). De plus, l'effet de la nifédipine, inhibiteur

des canaux voltage-dépendants, n'a aucun effet sur les influx enregistrés (data supplémentaire 1, Article 2). Par ailleurs, cet influx de base semble similaire entre les myotubes SolD6 et les myotubes déficients en dystrophine SolC1 (4,8 %/min ± 0,3, n=43). Il ne semble donc pas participer à la dérégulation calcique dans les cellules déficientes en dystrophine.

PERSPECTIVES

Il serait intéressant d'identifier d'autres partenaires protéiques et de mettre en évidence des interactions déterminantes dans la pathologie de la DMD qui pourraient alors fournir de nouvelles cibles thérapeutiques (pharmacologique ou génique).

Parmi les candidats, il serait important d'étudier les autres isoformes de la syntrophine également exprimées dans le muscle squelettique et de montrer leurs éventuelles implications dans la régulation des entrées calciques dans les myotubes de souris. Les souris KO syntrophines ne présentent pas de pathologies apparentes grâce au système de compensation. Il serait essentiel de faire des doubles knock down ou knock out syntrophines afin de voir leur rôle physiologique distinct. De plus, dans les cellules DMD humaines, il existe également un système de compensation car la β1-syntrophine se retrouve surexprimée dans toutes les fibres musculaires, probablement pour contrecarrer l'absence de l'α1-syntrophine (Compton et al., 2005). Il serait intéressant de savoir si celle-ci n'interagit pas avec TRPC1 et connaître son rôle fonctionnel. D'autre part, contrairement à la souris, la β2-syntrophine se situe au niveau du sarcolemme du muscle humain post-natal et l'absence de celle-ci accompagnée de celle de l'α-dystrobrévine contribue à la mort des patients, un an après la naissance, d'une myopathie congénitale (Jones et al., 2003). Nous pourrions également étudier l'homéostasie calcique (plus particulièrement et dans un premier temps les entrées calciques dépendantes des réserves intracellulaires) sur les myotubes provenant de ces patients et déterminer l'éventuel rôle de la β2-syntrophine sur la régulation de ces entrées de calcium. Il faudrait savoir si l'absence de l'α-dystrobrévine est une conséquence de l'absence de la β2-syntrophine à la membrane. Pour cela, une étude biochimique des interactions entre ces deux protéines serait envisageable.

Nous devons également déterminer si la liaison de TRPC1 et de TRPC4 au domaine PDZ de l'α1-syntrophine s'effectue de manière directe. Pour cela, il faudrait réaliser des constructions avec le N et C-terminal de TRPC1 et de TRPC4 et voir s'ils interagissent avec le PDZ mais également les autres domaines (PH1, PH2 et SU) de l'α1-syntrophine. Il faudrait également définir quels sont les domaines qui permettent le lien entre les TRPCs et la dystrophine. Si la liaison s'avère indirecte, il faudrait ensuite déterminer quelle est la protéine intermédiaire impliquée dans l'édifice de ce macrocomplexe. Le candidat idéal serait la calmoduline car elle est connue pour lier la syntrophine et la dystrophine au niveau N et C-terminal (Madhavan et al., 1992; Newbell et al., 1997). C'est une protéine calcium-dépendante dite modulatrice qui régule l'activité de nombreux canaux qui, comme les TRPCs, possèdent un site de liaison à la

calmoduline au niveau C-terminal (Vazquez et al., 2004). C'est pourquoi une étude biochimique et fonctionnelle sur cette protéine serait appropriée.

Il faudrait ensuite confirmer l'étude du rôle régulateur de la syntrophine sur les entrées cationiques dépendantes des réserves intracellulaires et de ses interactions sur le modèle humain. Il faut confirmer également l'implication des canaux TRPCs dans les entrées dépendantes des stocks intracellulaires dans ces myotubes humains sains et DMD.

La surexpression de l'α1-syntrophine rétablit les entrées cationiques dans les myotubes SolC1. Il serait donc intéressant de réaliser une étude histologique et comportementale (force musculaire, capacité à l'exercice) sur les souris *mdx* après injection d'un plasmide muscle-spécifique codant pour la syntrophine. L'utilisation de siRNA TRPC1 diminue également les influx anormaux dans les myotubes SolC1. Ce travail pourrait être complété avec des injections de siRNA TRPC1 dans les muscles de souris *mdx*.

Une autre piste concerne la protéine d'échafaudage homer qui pourrait également faire partie du complexe car l'absence de celle-ci dans les souris KO homer1 est responsable d'une augmentation des influx de calcium spontanés transitant par TRPC1. Ces souris présentent d'ailleurs une forme de myopathie. Stiber et collaborateurs proposent un rôle de la protéine homer1 dans la formation de microdomaine liant TRPC1 aux costamères et régulant alors son activité (Stiber et al., 2008). Il serait intéressant d'étudier les interactions de cette protéine dans nos modèles cellulaires et d'éteindre ou de surexprimer l'expression de celle-ci afin de voir les conséquences sur les entrées cationiques. Si les résultats s'avèrent convaincants, des injections de plasmide codant pour homer1 sur souris *mdx* seraient nécessaires pour une étude histologique et comportementale.

L'inhibition de l'expression de TRPC1 et de TRPC4 conduit à une diminution des influx cationiques. Cependant, une partie des influx restants semble être indépendante de ces isoformes. Tout d'abord, une vérification serait nécessaire par une expérience de double siRNA TRPC1 et TRPC4 dans les SolD6 afin de voir s'il existe un système de compensation. Ce dernier peut dépendre d'autres isoformes telles que TRPC3 et TRPC6 abondamment présentes dans le muscle squelettique. Pour cela, il faudrait compléter ce travail avec plusieurs combinaisons de double knock down (TRPC1/TRPC3, TRPC4/TRPC3, TRPC1/TRPC6 etc.). Plusieurs travaux montrent également l'implication des protéines STIM1 et Orai1 dans les entrées calciques dans le muscle squelettique (Stiber et al., 2008; Lyfenko et Dirksen, 2008). De plus, nos travaux préliminaires de surexpression mettent en évidence des influx cationiques dépendants de STIM1 dans les myotubes SolD6. Il serait intéressant de voir leur

implication dans les entrées cationiques grâce à des siRNA dirigés spécifiquement contre ces deux protéines.

Concernant les différentes populations de TRPCs, il faudrait définir la localisation exacte des différentes isoformes par la méthode de fractionnement membranaire. Pour séparer la membrane plasmique des tubules T, nous pourrions procéder à une détubulation afin de s'affranchir des populations présentes sur ce compartiment. Au contraire, pour visualiser les protéines situées au niveau du sarcolemme, un tag des TRPCs avec la biotine, marqueur spécifique de la membrane plasmique, serait envisageable. Enfin, selon leur répartition géographique, il serait nécessaire de définir leur rôle fonctionnel par la mesure des entrées cationiques transitant par les:

-SOCs grâce à une déplétion en calcium des stocks intracellulaires avec ou sans siRNA TRPCs.

-SACs grâce à des chocs osmotiques ou par des étirements membranaires à l'aide d'une pipette de patch (pression négative exercée sur la membrane) avec ou sans siRNA TRPCs.

-ECCEs grâce à une dépolarisation membranaire avec une solution hyperpotassique (KCl) tout en inhibant la pompe Ca^{2+} ATPase afin d'empêcher la recapture du calcium dans le RS avec ou sans siRNA TRPCs. En parallèle, il serait intéressant d'inhiber, par des outils pharmacologiques, les canaux RyR et DHPR pour voir également leur implication dans ces entrées. De plus, une étude des interactions des canaux TRPCs mais également des protéines STIM et Orai avec RyR et DHPR serait intéressante afin de mettre en évidence la présence d'un macrocomplexe dans les tubules T nécessaire pour une activité normale des ECCs.

Nous disposons au sein du laboratoire d'un microscope à conductance ionique appelé SICM (Scanning Ion Conductance Microscopy). Celui-ci permet de visualiser la topographie d'une cellule et donc de discerner les entrées des tubules T. Grâce à cet outil, il serait intéressant de mesurer des courants calciques dépendants des stocks intracellulaires au niveau des tubules T mais également à la surface membranaire correspondant au sarcolemme.

Enfin, il faudrait approfondir l'étude sur l'implication de la voie PLC/PKC dans l'augmentation des entrées cationiques dans les myotubes déficients en dystrophine. Il faudrait définir les interactions directes ou indirectes (coimmunoprécipitation, FRET) entre l'α1-syntrophine, la dystrophine, les TRPCs et la PLC, définir les domaines impliqués dans ces interactions par des expériences de GST Pull down. Il faudrait essayer de connaître également quelle est l'isoforme impliquée dans cette dérégulation calcique par une pharmacologie spécifique. L'activité accrue de TRPC1 dans les SolC1 peut résulter d'un changement dans l'état de phosphorylation de cette protéine. La kinase PKC semble jouer un

rôle sur l'activité des canaux TRPC1 dans notre modèle cellulaire. Une étude sur l'état de phosphorylation des canaux TRPCs est à réaliser et une comparaison du taux de phosphorylation de TRPC1 entre les deux types cellulaires est nécessaire. Une question reste en suspend concernant le canal TRPC4 qui ne paraît pas être impliqué dans les entrées cationiques dépendantes des stocks intracellulaires dans les SolC1. Il est important de savoir si ce canal reste fonctionnel dans les cellules SolC1 et de connaître son mode d'activation. Le calcium joue un rôle prépondérant dans l'activation de la voie PLC. Afin de connaître la source (externe ou interne) de calcium responsable de cette activation, il serait intéressant d'utiliser le TPEN, chélateur du calcium luminal du RS. En effet, celui-ci a une faible affinité pour le calcium à des concentrations de l'ordre du µM, c'est pourquoi, seul le calcium présent dans les stocks est chélaté. Cet agent va mimer la déplétion en calcium du RS sans libérer le calcium dans le cytoplasme. Par cette approche, nous allons pouvoir savoir si le calcium libéré lors de la déplétion classique (CPA et caféine) est responsable de l'activation de la voie PLC.

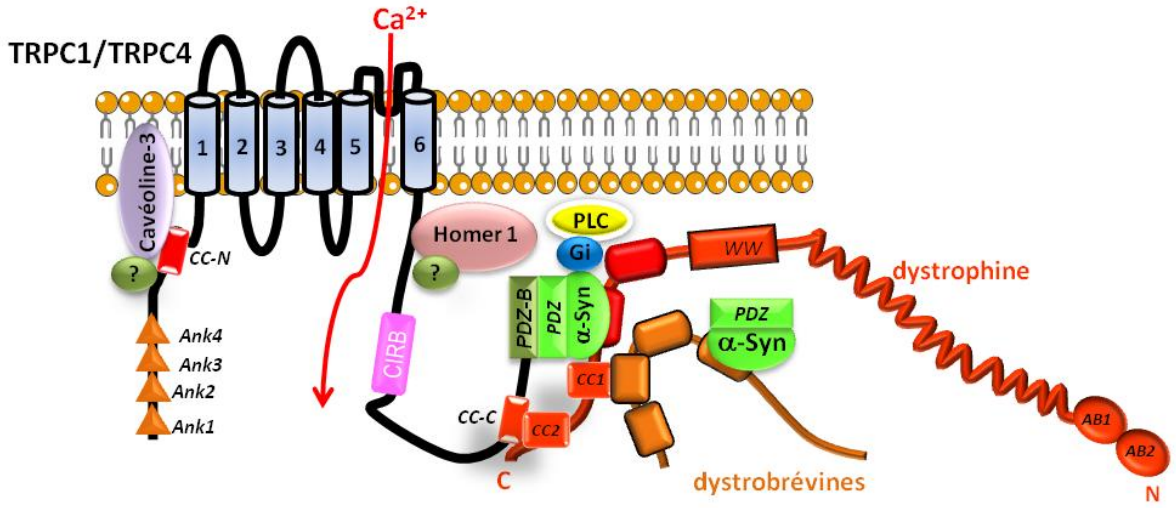
En dernier, il faudrait identifier le canal permettant les entrées cationiques de base dans les myotubes SolD6 et SolC1.

Il est indispensable de confirmer cette étude sur le système humain afin de confirmer notre modèle de régulation des entrées cationiques car les modèles de régulation peuvent être différents d'une espèce à une autre.

PROPOSITION D'UN MODELE DE REGULATION

A l'aide des données littéraires, concernant l'activité exacerbée de TRPC1 dans les cellules déficientes en dystrophine, et de nos travaux, nous proposons un modèle très hypothétique. Celui-ci sera schématisé pour une meilleure compréhension.

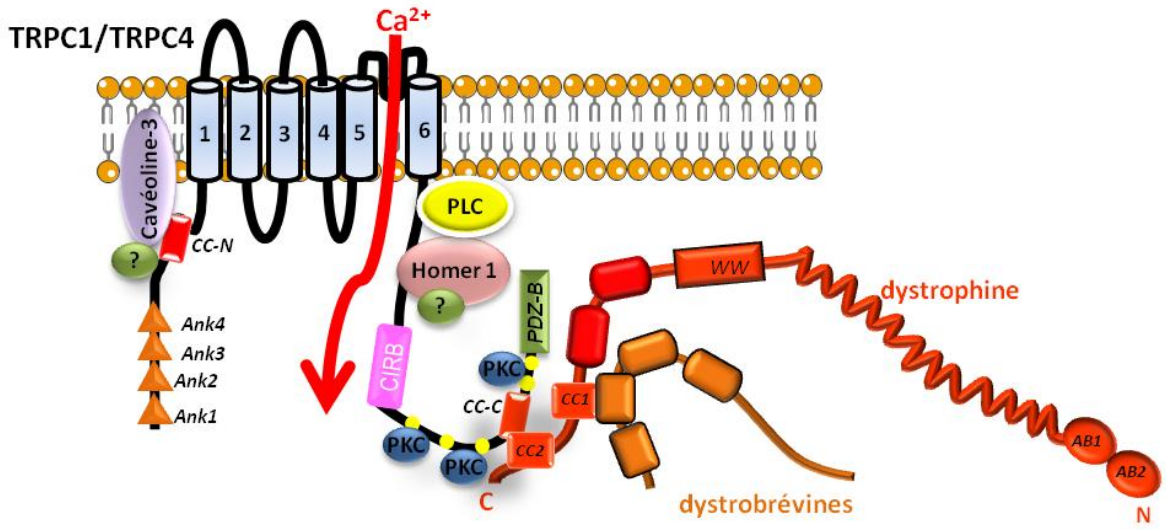
Dans les cellules musculaires normales, nous proposons un complexe macromoléculaire entre les canaux TRPC1/TRPC4, la dystrophine et les protéines d'échafaudage homer1, cavéoline-3 et α1-syntrophine (voir schéma ci-dessous). Homer1 se lierait aux canaux TRPCs au niveau de leur domaine C-terminal. L'α1-syntrophine s'accrocherait au canal hétérotétramérique par l'intermédiaire de TRPC4, seule isoforme possédant un site connu de liaison au domaine PDZ de l'α1-syntrophine. Quant à la cavéoline-3, elle se lierait au niveau N-terminal. Ces trois protéines amèneraient à proximité du canal de nombreuses protéines de signalisation et de ce fait joueraient un rôle régulateur sur les canaux. Il ne faut pas oublier que la dystrophine peut aussi jouer son rôle de protéine d'échafaudage, qui par sa grande taille, peut apporter de nombreuses protéines dans cet environnement. Nous suggérons que l'α1-syntrophine apporterait une protéine Gi, la PLC et autres protéines de signalisation à proximité du canal. L'α1-syntrophine par une interaction directe ou indirecte (grâce à une protéine Gi) jouerait son rôle suppresseur sur la voie PLC qui, de ce fait, serait quiescente dans les myotubes exprimant la (mini-)dystrophine.



Influx cationiques régulés dans les myotubes exprimant la (mini-)dystrophine.

Dans les cellules déficientes en α1-syntrophine, TRPC1 et TRPC4 forment toujours un canal hétérotétramérique lié à la dystrophine, à homer1 et à la cavéoline-3 qui voient leur expression inchangée. L'absence de l'α1-syntrophine et de ces protéines de signalisation rend

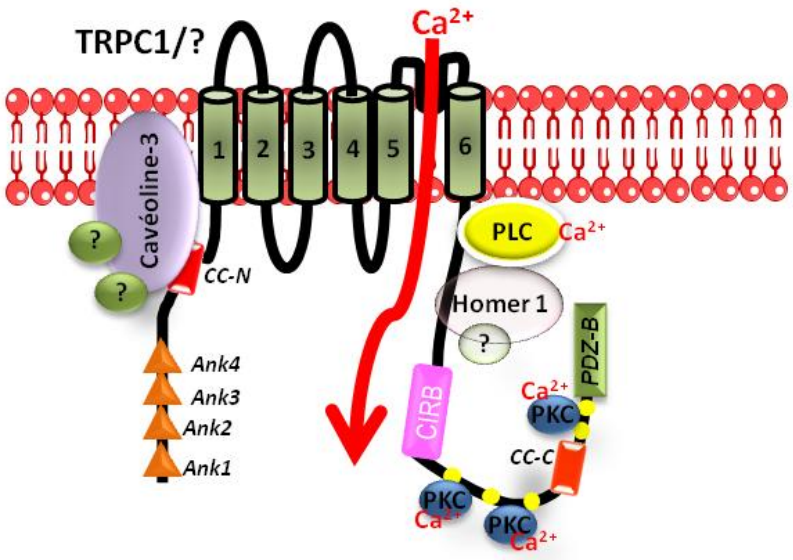
la voie PLC active et libère des sites de phosphorylation, cibles de la PKC, au niveau C-terminal du canal. Ce canal est alors plus sensible à la PLC et la PKC, son état de phosphorylation est modifié entrainant alors une entrée de calcium exacerbée dans les cellules déficientes en α1-syntrophine (voir schéma ci-dessous).



Influx cationiques dérégulés dans les myotubes déficients en α1-syntrophine.

Dans les cellules déficientes en dystrophine, l'absence de la dystrophine est accompagnée de la réduction de tout le DAP à la membrane y compris l'α1-syntrophine. Seule la cavéoline-3 se retrouve surexprimée dans ces cellules. Le DAP, normalement associé au canal, est dans l'incapacité de joindre les protéines de signalisation au canal. Ces perturbations importantes peuvent changer la stabilité et la structure en lipides de la membrane plasmique et de ce fait la conformation du canal. Ce dernier ne semble être formé que de l'isoforme TRPC1 ou du moins ne constitue plus un canal hétérotétramérique avec TRPC4. La dystrophine (ou autres protéines du DAP) permettrait l'hétéromultimérisation des canaux, de ce fait, en son absence TRPC4 ne s'assemble plus avec TRPC1. Par conséquent, TRPC4 ne constitue plus la protéine intermédiaire puisqu'elle ne s'accroche plus au domaine PDZ de l'α1-syntrophine. La surexpression de la cavéoline-3 et la diminution des protéines homer1 et α1-syntrophine concourent à une nouvelle sensibilité de TRPC1. Ce canal est alors sensible à la déplétion en calcium du RS mais également à la voie calcium/PLC/PKC. Cette voie se retrouve activée dans les cellules déficientes en dystrophine puisque la syntrophine, absente du sarcolemme, ne joue plus son rôle répresseur sur la voie PLC. D'autre part, la voie PLC semble être activée par le calcium dans ces cellules. En effet, le niveau anormal de calcium libre sous le sarcolemme dans les cellules déficientes en dystrophine atteint un seuil qui potentialise la voie

PLC/PKC. Cette voie va alors suractiver le canal TRPC1 et entrainer une entrée accrue de calcium. En bref, chaque protéine contribue à un rôle spécifique et important dans la régulation normale des canaux TRPCs soit de manière directe ou par l'intermédiaire de protéines de signalisation.



Influx cationiques dérégulés dans les myotubes déficients en dystrophine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Acsadi G, Dickson G, Love DR et al. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991; **352:** 815-818.

Adams ME, Butler MH, Dwyer TM, Peters MF, Murnane AA, Froehner SC. Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* 1993; **11:** 531-540.

Adams ME, Dwyer TM, Dowler LL, White RA, Froehner SC. Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain. *J Biol Chem* 1995; **270:** 25859-25865.

Adams ME, Kramarcy N, Krall SP et al. Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J Cell Biol* 2000; **150:** 1385-1398.

Adams ME, Kramarcy N, Fukuda T, Engel AG, Sealock R, Froehner SC. Structural abnormalities at neuromuscular synapses lacking multiple syntrophin isoforms. *J Neurosci* 2004; **24:** 10302-10309.

Adams ME, Tesch Y, Percival JM et al. Differential targeting of nNOS and AQP4 to dystrophin-deficient sarcolemma by membrane-directed alpha-dystrobrevin. *J Cell Sci* 2008; **121:** 48-54.

Ahmmed GU, Mehta D, Vogel S et al. Protein kinase Calpha phosphorylates the TRPC1 channel and regulates store-operated Ca2+ entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; **279:** 20941-20949.

Ahn AH, Yoshida M, Anderson MS et al. Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91:** 4446-4450.

Ahn AH, Kunkel LM. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 1995; **128:** 363-371.

Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM. The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* 1996; **271:** 2724-2730.

Aires V, Hichami A, Boulay G, Khan NA. Activation of TRPC6 calcium channels by diacylglycerol (DAG)-containing arachidonic acid: a comparative study with DAG-containing docosahexaenoic acid. *Biochimie* 2007; **89:** 926-937.

Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 2000; **275:** 9452-9460.

Alderton JM, Ahmed SA, Smith LA, Steinhardt RA. Evidence for a vesicle-mediated maintenance of store-operated calcium channels in a human embryonic kidney cell line. *Cell Calcium* 2000; **28:** 161-169.

Alessi A, Bragg AD, Percival JM et al. gamma-Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the alpha/beta syntrophins. *Exp Cell Res* 2006; **312:** 3084-3095.

Alfonso S, Benito O, Alicia S et al. Regulation of the cellular localization and function of human transient receptor potential channel 1 by other members of the TRPC family. *Cell Calcium* 2008; **43:** 375-387.

Allard B, Couchoux H, Pouvreau S, Jacquemond V. Sarcoplasmic reticulum Ca2+ release and depletion fail to affect sarcolemmal ion channel activity in mouse skeletal muscle. *J Physiol* 2006; **575:** 69-81.

Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic* 2007; **8:** 177-183.

Ambudkar IS, Bandyopadhyay BC, Liu X, Lockwich TP, Paria B, Ong HL. Functional organization of TRPC-Ca2+ channels and regulation of calcium microdomains. *Cell Calcium* 2006; **40:** 495-504.

Angelini C. The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve* 2007; **36:** 424-435.

Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV, Jr., Demaurex N. Mitochondria recycle Ca(2+) to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem* 2001; **276:** 29430-29439.

B

Baba Y, Hayashi K, Fujii Y et al. Coupling of STIM1 to store-operated Ca2+ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103:** 16704-16709.

Bakker AJ, Head SI, Williams DA, Stephenson DG. Ca2+ levels in myotubes grown from the skeletal muscle of dystrophic (mdx) and normal mice. *J Physiol* 1993; **460:** 1-13.

Bakowski D, Glitsch MD, Parekh AB. An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca2+ release-activated Ca2+ current I(CRAC) in RBL-1 cells. *J Physiol* 2001; **532:** 55-71.

Balghi H, Sebille S, Mondin L et al. Mini-dystrophin expression down-regulates IP3-mediated calcium release events in resting dystrophin-deficient muscle cells. *J Gen Physiol* 2006; **128:** 219-230.

Balnave CD, Allen DG. Evidence for Na+/Ca2+ exchange in intact single skeletal muscle fibers from the mouse. *Am J Physiol* 1998; **274:** C940-C946.

Bannister RA, Pessah IN, Beam KG. The skeletal L-type Ca(2+) current is a major contributor to excitation-coupled Ca(2+) entry. *J Gen Physiol* 2009; **133:** 79-91.

Barrera NP, Shaifta Y, McFadzean I, Ward JP, Henderson RM, Edwardson JM. AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPC1 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **358:** 1086-1090.

Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999; **104:** 375-381.

Basset O, Boittin FX, Dorchies OM, Chatton JY, van Breemen C, Ruegg UT. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate in nicotinic calcium responses in dystrophic myotubes assessed by near-plasma membrane calcium measurement. *J Biol Chem* 2004; **279:** 47092-47100.

Beech DJ, Xu SZ, McHugh D, Flemming R. TRPC1 store-operated cationic channel subunit. *Cell Calcium* 2003; **33:** 433-440.

Beech DJ. TRPC1: store-operated channel and more. *Pflugers Arch* 2005; **451:** 53-60.

Berbey C, Allard B. Electrically silent divalent cation entries in resting and active voltage-controlled muscle fibers. *Biophys J* 2009; **96:** 2648-2657.

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984; **312:** 315-321.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **766:** 31-43.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4:** 517-529.

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793:** 933-940.

Berthier C, Monteil A, Lory P, Strube C. Alpha(1H) mRNA in single skeletal muscle fibres accounts for T-type calcium current transient expression during fetal development in mice. *J Physiol* 2002; **539:** 681-691.

Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE. Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 2004; **6:** 709-720.

Bidaud I, Monteil A, Nargeot J, Lory P. Properties and role of voltage-dependent calcium channels during mouse skeletal muscle differentiation. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; **27:** 75-81.

Biggar WD, Gingras M, Fehlings DL, Harris VA, Steele CA. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr* 2001; **138:** 45-50.

Bijlenga P, Liu JH, Espinos E et al. T-type alpha 1H Ca2+ channels are involved in Ca2+ signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97:** 7627-7632.

Bodensteiner JB, Engel AG. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 1978; **28:** 439-446.

Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002; **420:** 418-421.

Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Whittemore LA, Khurana TS. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J* 2005; **19:** 543-549.

Boittin FX, Petermann O, Hirn C et al. Ca2+-independent phospholipase A2 enhances store-operated Ca2+ entry in dystrophic skeletal muscle fibers. *J Cell Sci* 2006; **119:** 3733-3742.

Boulay G, Zhu X, Peyton M et al. Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 1997; **272:** 29672-29680.

Boyd Y, Buckle VJ. Cytogenetic heterogeneity of translocations associated with Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* 1986; **29:** 108-115.

Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH. Adult forms of the Ca2+ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987; **262:** 3768-3774.

Braun FJ, Broad LM, Armstrong DL, Putney JW, Jr. Stable activation of single Ca2+ release-activated Ca2+ channels in divalent cation-free solutions. *J Biol Chem* 2001; **276:** 1063-1070.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 1996; **84:** 757-767.

Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GS, Kurosaki T, Putney JW, Jr. Role of the phospholipase C-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 2001; **276:** 15945-15952.

Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 2006; **16:** 525-532.

Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81:** 1189-1192.

Butler MH, Douville K, Murnane AA et al. Association of the Mr 58,000 postsynaptic protein of electric tissue with Torpedo dystrophin and the Mr 87,000 postsynaptic protein. *J Biol Chem* 1992; **267:** 6213-6218.

C

Calloway N, Vig M, Kinet JP, Holowka D, Baird B. Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamically on depletion of Ca2+ stores and on electrostatic interactions. *Mol Biol Cell* 2009; **20:** 389-399.

Carlson CG, Gueorguiev A, Roshek DM, Ashmore R, Chu JS, Anderson JE. Extrajunctional resting Ca2+ influx is not increased in a severely dystrophic expiratory muscle (triangularis sterni) of the mdx mouse. *Neurobiol Dis* 2003; **14:** 229-239.

Carlson CG, Samadi A, Siegel A. Chronic treatment with agents that stabilize cytosolic IkappaB-alpha enhances survival and improves resting membrane potential in MDX muscle fibers subjected to chronic passive stretch. *Neurobiol Dis* 2005; **20:** 719-730.

Carpenter JL, Hoffman EP, Romanul FC et al. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol* 1989; **135:** 909-919.

Castello A, Brocheriou V, Chafey P, Kahn A, Gilgenkrantz H. Characterization of the dystrophin-syntrophin interaction using the two-hybrid system in yeast. *FEBS Lett* 1996; **383:** 124-128.

Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM, Boulay G. Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 2004; **279:** 7241-7246.

Ceccarini M, Grasso M, Veroni C et al. Association of dystrobrevin and regulatory subunit of protein kinase A: a new role for dystrobrevin as a scaffold for signaling proteins. *J Mol Biol* 2007; **371:** 1174-1187.

Challet C, Maechler P, Wollheim CB, Ruegg UT. Mitochondrial calcium oscillations in C2C12 myotubes. *J Biol Chem* 2001; **276:** 3791-3797.

Charnet P, Bourinet E, Dubel SJ, Snutch TP, Nargeot J. Calcium currents recorded from a neuronal alpha 1C L-type calcium channel in Xenopus oocytes. *FEBS Lett* 1994; **344:** 87-90.

Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Berwald-Netter Y. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* 1990; **344:** 64-65.

Chen Z, Hague C, Hall RA, Minneman KP. Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem* 2006; **281:** 12414-12420.

Cheng KT, Liu X, Ong HL, Ambudkar IS. Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *J Biol Chem* 2008; **283:** 12935-12940.

Cherednichenko G, Hurne AM, Fessenden JD et al. Conformational activation of Ca2+ entry by depolarization of skeletal myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101:** 15793-15798.

Cognard C, Lazdunski M, Romey G. Different types of Ca2+ channels in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83:** 517-521.

Cognard C, Traore F, Potreau D, Raymond G. Bay K 8644 enhances slow inward and outward currents in voltage-clamped frog skeletal muscle fibres. *Pflugers Arch* 1986; **407:** 677-683.

Cognard C, Romey G, Galizzi JP, Fosset M, Lazdunski M. Dihydropyridine-sensitive Ca2+ channels in mammalian skeletal muscle cells in culture: electrophysiological properties and interactions with Ca2+ channel activator (Bay K8644) and inhibitor (PN 200-110). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83:** 1518-1522.

Collet C, Allard B, Tourneur Y, Jacquemond V. Intracellular calcium signals measured with indo-1 in isolated skeletal muscle fibres from control and mdx mice. *J Physiol* 1999; **520 Pt 2:** 417-429.

Collet C, Ma J. Calcium-dependent facilitation and graded deactivation of store-operated calcium entry in fetal skeletal muscle. *Biophys J* 2004; **87:** 268-275.

Compton AG, Cooper ST, Hill PM, Yang N, Froehner SC, North KN. The syntrophin-dystrobrevin subcomplex in human neuromuscular disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; **64:** 350-361.

Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* 2004; **279:** 28387-28392.

Constantin B, Cognard C, Raymond G. Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels. *Cell Calcium* 1996; **19:** 365-374.

Constantin B, Sebille S, Cognard C. New insights in the regulation of calcium transfers by muscle dystrophin-based cytoskeleton: implications in DMD. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; **27:** 375-386.

Csutora P, Su Z, Kim HY et al. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96:** 121-126.

Csutora P, Peter K, Kilic H et al. Novel role for STIM1 as a trigger for calcium influx factor production. *J Biol Chem* 2008; **283:** 14524-14531.

Culligan K, Banville N, Dowling P, Ohlendieck K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. *J Appl Physiol* 2002; **92:** 435-445.

D

Darbellay B, Arnaudeau S, Konig S et al. S. *J Biol Chem* 2009; **284:** 5370-5380.

Deconinck N, Ragot T, Marechal G, Perricaudet M, Gillis JM. Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93:** 3570-3574.

Decrouy A, Renaud JM, Lunde JA, Dickson G, Jasmin BJ. Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers. *Gene Ther* 1998; **5:** 59-64.

Deval E, Levitsky DO, Constantin B, Raymond G, Cognard C. Expression of the sodium/calcium exchanger in mammalian skeletal muscle cells in primary culture. *Exp Cell Res* 2000; **255:** 291-302.

Deval E, Levitsky DO, Marchand E, Cantereau A, Raymond G, Cognard C. Na(+)/Ca(2+) exchange in human myotubes: intracellular calcium rises in response to external sodium depletion are enhanced in DMD. *Neuromuscul Disord* 2002; **12:** 665-673.

Dezawa M, Ishikawa H, Hoshino M, Itokazu Y, Nabeshima Y. Potential of bone marrow stromal cells in applications for neuro-degenerative, neuro-traumatic and muscle degenerative diseases. *Curr Neuropharmacol* 2005; **3:** 257-266.

Dietrich A, Mederos YS, Gollasch M et al. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice. *Mol Cell Biol* 2005; **25:** 6980-6989.

Dietrich A, Kalwa H, Storch U et al. Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch* 2007; **455:** 465-477.

Divet A, Huchet-Cadiou C. Sarcoplasmic reticulum function in slow- and fast-twitch skeletal muscles from mdx mice. *Pflugers Arch* 2002; **444:** 634-643.

Divet A, Lompre AM, Huchet-Cadiou C. Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, on skeletal muscles from normal and mdx mice. *Acta Physiol Scand* 2005; **184:** 173-186.

Donoso P, Hidalgo C. Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1989; **978:** 8-16.

Ducret T, Vandebrouck C, Cao ML, Lebacq J, Gailly P. Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2006; **575:** 913-924.

Dziadek MA, Johnstone LS. Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins. *Cell Calcium* 2007; **42:** 123-132.

E

Ehrlich BE, Kaftan E, Bezprozvannaya S, Bezprozvanny I. The pharmacology of intracellular Ca(2+)-release channels. *Trends Pharmacol Sci* 1994; **15:** 145-149.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990; **345:** 315-319.

Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993; **122:** 809-823.

Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1772:** 108-117.

Ervasti JM, Sonnemann KJ. Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex. *Int Rev Cytol* 2008; **265:** 191-225.

F

Feske S, Gwack Y, Prakriya M et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; **441:** 179-185.

Fierro L, Parekh AB. Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (CRAC) in RBL-1 cells. *J Membr Biol* 1999; **168:** 9-17.

Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 2002; **82:** 893-922.

Firth AL, Remillard CV, Yuan JX. TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1772:** 895-906.

Fleischer S. Personal recollections on the discovery of the ryanodine receptors of muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **369:** 195-207.

Flucher BE, Obermair GJ, Tuluc P, Schredelseker J, Kern G, Grabner M. The role of auxiliary dihydropyridine receptor subunits in muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2005; **26:** 1-6.

Fong PY, Turner PR, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 1990; **250:** 673-676.

Formigli L, Sassoli C, Squecco R et al. Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci* 2009; **122:** 1322-1333.

Fosset M, Jaimovich E, Delpont E, Lazdunski M. [3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1983; **258:** 6086-6092.

Franco-Obregon A, Lansman JB. Changes in mechanosensitive channel gating following mechanical stimulation in skeletal muscle myotubes from the mdx mouse. *J Physiol* 2002; **539:** 391-407.

Franco-Obregon A, Jr., Lansman JB. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol* 1994; **481 (Pt 2):** 299-309.

Franco A, Jr., Lansman JB. Stretch-sensitive channels in developing muscle cells from a mouse cell line. *J Physiol* 1990; **427:** 361-380.

Franco A, Jr., Lansman JB. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 1990; **344:** 670-673.

Franzini-Armstrong C. ER-mitochondria communication. How privileged? *Physiology (Bethesda)* 2007; **22:** 261-268.

Franzius D, Hoth M, Penner R. Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. *Pflugers Arch* 1994; **428:** 433-438.

Fraysse B, Rouaud T, Millour M, Fontaine-Perus J, Gardahaut MF, Levitsky DO. Expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280:** C146-C154.

Fraysse B, Liantonio A, Cetrone M et al. The alteration of calcium homeostasis in adult dystrophic mdx muscle fibers is worsened by a chronic exercise in vivo. *Neurobiol Dis* 2004; **17:** 144-154.

Freichel M, Suh SH, Pfeifer A et al. Lack of an endothelial store-operated Ca2+ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nat Cell Biol* 2001; **3:** 121-127.

Friedrich O, Both M, Gillis JM, Chamberlain JS, Fink RH. Mini-dystrophin restores L-type calcium currents in skeletal muscle of transgenic mdx mice. *J Physiol* 2004; **555:** 251-265.

Friedrich O, von Wegner F, Chamberlain JS, Fink RH, Rohrbach P. L-type Ca2+ channel function is linked to dystrophin expression in mammalian muscle. *PLoS One* 2008; **3:** e1762.

Frigeri A, Nicchia GP, Nico B et al. Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *FASEB J* 2001; **15:** 90-98.

Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M, Romanin C. The STIM/Orai coupling machinery. *Channels (Austin)* 2008; **2:** 261-268.

Froehner SC. Peripheral proteins of postsynaptic membranes from Torpedo electric organ identified with monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1984; **99:** 88-96.

Froehner SC, Murnane AA, Tobler M, Peng HB, Sealock R. A postsynaptic Mr 58,000 (58K) protein concentrated at acetylcholine receptor-rich sites in Torpedo electroplaques and skeletal muscle. *J Cell Biol* 1987; **104:** 1633-1646.

Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 1989; **342:** 32-38.

G

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

Gailly P, Colson-Van Schoor M. Involvement of trp-2 protein in store-operated influx of calcium in fibroblasts. *Cell Calcium* 2001; **30:** 157-165.

Gailly P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1600:** 38-44.

Gaschen FP, Hoffman EP, Gorospe JR et al. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci* 1992; **110:** 149-159.

Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA et al. Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res* 2006; **99:** 407-414.

Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* 1998; **18:** 128-137.

Genazzani AA, Carafoli E, Guerini D. Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96:** 5797-5801.

Gervasio OL, Whitehead NP, Yeung EW, Phillips WD, Allen DG. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Sci* 2008; **121:** 2246-2255.

Gilabert JA, Parekh AB. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *EMBO J* 2000; **19:** 6401-6407.

Gonzalez Narvaez AA, Castillo A. Ca2+ store determines gating of store operated calcium entry in mammalian skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2007; **28:** 105-113.

Gottlieb P, Folgering J, Maroto R et al. Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch* 2008; **455:** 1097-1103.

Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F et al. [An opening in Duchenne muscular dystrophy: persistent therapeutic rescue of dystrophin by vectorized antisense mediated exon skipping in mdx mice]. *Med Sci (Paris)* 2004; **20:** 1163-1165.

Grassi F, Pagani F, Spinelli G, De Angelis L, Cossu G, Eusebi F. Fusion-independent expression of functional ACh receptors in mouse mesoangioblast stem cells contacting muscle cells. *J Physiol* 2004; **560:** 479-489.

Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev* 2007; **16:** 857-868.

Gregorevic P, Allen JM, Minami E et al. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* 2006; **12:** 787-789.

Grobet L, Martin LJ, Poncelet D et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet* 1997; **17:** 71-74.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; **260:** 3440-3450.

Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM et al. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992; **356:** 435-438.

Gutierrez-Martin Y, Martin-Romero FJ, Henao F. Store-operated calcium entry in differentiated C2C12 skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1711:** 33-40.

H

Hain J, Nath S, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H. Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Biophys J* 1994; **67:** 1823-1833.

Hannon JD, Lee NK, Yandong C, Blinks JR. Inositol trisphosphate (InsP3) causes contraction in skeletal muscle only under artificial conditions: evidence that Ca2+ release can result from depolarization of T-tubules. *J Muscle Res Cell Motil* 1992; **13:** 447-456.

Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca2+ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* 1992; **8:** 643-651.

Hardie RC, Minke B. Novel Ca2+ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca2+ mobilization. *Trends Neurosci* 1993; **16:** 371-376.

Hartigan-O'Connor D, Chamberlain JS. Developments in gene therapy for muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* 2000; **48:** 223-238.

Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini MG et al. Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem* 1999; **274:** 12626-12631.

Hassock SR, Zhu MX, Trost C, Flockerzi V, Authi KS. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* 2002; **100:** 2801-2811.

Hewavitharana T, Deng X, Soboloff J, Gill DL. Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* 2007; **42:** 173-182.

Hockerman GH, Peterson BZ, Johnson BD, Catterall WA. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; **37:** 361-396.

Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989; **2:** 1019-1029.

Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999; **397:** 259-263.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem J* 2000; **351:** 115-122.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99:** 7461-7466.

Hogan A, Shepherd L, Chabot J et al. Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem* 2001; **276:** 26526-26533.

Holder E, Maeda M, Bies RD. Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet* 1996; **97:** 232-239.

Hopf FW, Turner PR, Denetclaw WF, Jr., Reddy P, Steinhardt RA. A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am J Physiol* 1996; **271:** C1325-C1339.

Hopf FW, Reddy P, Hong J, Steinhardt RA. A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. *J Biol Chem* 1996; **271:** 22358-22367.

Hopf FW, Turner PR, Steinhardt RA. Calcium misregulation and the pathogenesis of muscular dystrophy. *Subcell Biochem* 2007; **45:** 429-464.

Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y et al. Alpha1-syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. *J Cell Biol* 2002; **158:** 1097-1107.

Hoshino S, Ohkoshi N, Ishii A, Kameya S, Takeda S, Shoji S. The expression of dystrophin and alpha1-syntrophin during skeletal muscle regeneration. *J Muscle Res Cell Motil* 2001; **22:** 185-191.

Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992; **355:** 353-356.

Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 1993; **465:** 359-386.

Hoth M, Fanger CM, Lewis RS. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 1997; **137:** 633-648.

Hu Y, Schilling WP. Receptor-mediated activation of recombinant Trpl expressed in Sf9 insect cells. *Biochem J* 1995; **305 (Pt 2):** 605-611.

Huang GN, Zeng W, Kim JY et al. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 2006; **8:** 1003-1010.

I

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992; **355:** 696-702.

Imbert N, Cognard C, Duport G, Guillou C, Raymond G. Abnormal calcium homeostasis in Duchenne muscular dystrophy myotubes contracting in vitro. *Cell Calcium* 1995; **18:** 177-186.

Imbert N, Vandebrouck C, Duport G et al. Calcium currents and transients in co-cultured contracting normal and Duchenne muscular dystrophy human myotubes. *J Physiol* 2001; **534:** 343-355.

Inesi G, Hua S, Xu C et al. Studies of Ca2+ ATPase (SERCA) inhibition. *J Bioenerg Biomembr* 2005; **37:** 365-368.

Inui M, Fleischer S. Purification of Ca2+ release channel (ryanodine receptor) from heart and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Methods Enzymol* 1988; **157:** 490-505.

Irvine RF. 'Quantal' Ca2+ release and the control of Ca2+ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* 1990; **263:** 5-9.

Iwata Y, Pan Y, Yoshida T, Hanada H, Shigekawa M. Alpha1-syntrophin has distinct binding sites for actin and calmodulin. *FEBS Lett* 1998; **423:** 173-177.

J

Jacob R. Agonist-stimulated divalent cation entry into single cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol* 1990; **421:** 55-77.

Jaimovich E, Reyes R, Liberona JL, Powell JA. IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278:** C998-C1010.

Jardin I, Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA. Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca2+ channels. *J Biol Chem* 2008; **283:** 25296-25304.

Jeon JP, Lee KP, Park EJ et al. The specific activation of TRPC4 by Gi protein subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **377:** 538-543.

Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 2008; **41:** 11-22.

Jones KJ, Compton AG, Yang N et al. Deficiency of the syntrophins and alpha-dystrobrevin in patients with inherited myopathy. *Neuromuscul Disord* 2003; **13:** 456-467.

Jousset H, Frieden M, Demaurex N. STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca2+ channels located close to sarco/endoplasmic Ca2+ ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2007; **282:** 11456-11464.

Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca2+ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 2001; **3:** 499-502.

K

Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I et al. alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J Biol Chem* 1999; **274:** 2193-2200.

Kargacin ME, Kargacin GJ. The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1290:** 4-8.

Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D et al. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1993; **34:** 8-17.

Kim HY, Thomas D, Hanley MR. Chromatographic resolution of an intracellular calcium influx factor from thapsigargin-activated Jurkat cells. Evidence for multiple activities influencing calcium elevation in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* 1995; **270:** 9706-9708.

Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S. The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 1999; **4:** 423-429.

Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50:** 509-517.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; **53:** 219-228.

Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 1990; **265:** 4560-4566.

Kornegay JN, Tuler SM, Miller DM, Levesque DC. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 1988; **11:** 1056-1064.

Kruger J, Kunert-Keil C, Bisping F, Brinkmeier H. Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle. *Neuromuscul Disord* 2008; **18:** 501-513.

Kunert-Keil C, Bisping F, Kruger J, Brinkmeier H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 2006; **7:** 159.

Kunichika N, Yu Y, Remillard CV, Platoshyn O, Zhang S, Yuan JX. Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative Ca2+ entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; **287:** L962-L969.

Kunkel LM, Hoffman EP. Duchenne/Becker muscular dystrophy: a short overview of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br Med Bull* 1989; **45:** 630-643.

Kurebayashi N, Ogawa Y. Depletion of Ca2+ in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca2+ entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2001; **533:** 185-199.

L

Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 2005; **24 Suppl 1:** 1-78.

Lansman JB, Franco-Obregon A. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle: a link in the membrane pathology of muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33:** 649-656.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 2004; **94:** 1023-1031.

Larsson KP, Peltonen HM, Bart G et al. Orexin-A-induced Ca2+ entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation. *J Biol Chem* 2005; **280:** 1771-1781.

Launikonis BS, Rios E. Store-operated Ca2+ entry during intracellular Ca2+ release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 2007; **583:** 81-97.

Lee EH, Cherednichenko G, Pessah IN, Allen PD. Functional coupling between TRPC3 and RyR1 regulates the expressions of key triadic proteins. *J Biol Chem* 2006; **281:** 10042-10048.

Lee KP, Jun JY, Chang IY, Suh SH, So I, Kim KW. TRPC4 is an essential component of the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in mouse visceral smooth muscle cells. *Mol Cells* 2005; **20:** 435-441.

Lee YM, Kim BJ, Kim HJ et al. TRPC5 as a candidate for the nonselective cation channel activated by muscarinic stimulation in murine stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; **284:** G604-G616.

Leong P, MacLennan DH. Complex interactions between skeletal muscle ryanodine receptor and dihydropyridine receptor proteins. *Biochem Cell Biol* 1998; **76:** 681-694.

Lepage PK, Lussier MP, McDuff FO, Lavigne P, Boulay G. The self-association of two N-terminal interaction domains plays an important role in the tetramerization of TRPC4. *Cell Calcium* 2009; **45:** 251-259.

Li J, Sukumar P, Milligan CJ et al. Interactions, functions, and independence of plasma membrane STIM1 and TRPC1 in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2008; **103:** e97-104.

Li S, Kimura E, Fall BM et al. Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther* 2005; **12:** 1099-1108.

Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104:** 4682-4687.

Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J et al. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105:** 2895-2900.

Liberona JL, Powell JA, Shenoi S, Petherbridge L, Caviedes R, Jaimovich E. 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* 1998; **21:** 902-909.

Lievremont JP, Bird GS, Putney JW, Jr. Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **287:** C1709-C1716.

Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T et al. Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca2+-sensitive cation channels. *J Biol Chem* 2000; **275:** 27799-27805.

Liou J, Kim ML, Heo WD et al. STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. *Curr Biol* 2005; **15:** 1235-1241.

Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca2+ store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104:** 9301-9306.

Litjens T, Nguyen T, Castro J et al. Phospholipase C-gamma1 is required for the activation of store-operated Ca2+ channels in liver cells. *Biochem J* 2007; **405:** 269-276.

Liu X, Wang W, Singh BB et al. Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem* 2000; **275:** 3403-3411.

Liu X, Singh BB, Ambudkar IS. TRPC1 is required for functional store-operated Ca2+ channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region. *J Biol Chem* 2003; **278:** 11337-11343.

Liu X, Bandyopadhyay BC, Singh BB, Groschner K, Ambudkar IS. Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J Biol Chem* 2005; **280:** 21600-21606.

Liu X, Cheng KT, Bandyopadhyay BC et al. Attenuation of store-operated Ca2+ current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104:** 17542-17547.

Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca2+ stores. *J Biol Chem* 2006; **281:** 28254-28264.

Louis M, Zanou N, Van Schoor M, Gailly P. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci* 2008; **121:** 3951-3959.

Love DR, Hill DF, Dickson G et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 1989; **339:** 55-58.

Lu QL, Mann CJ, Lou F et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003; **9:** 1009-1014.

Lu W, Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT. Differences in STIM1 and TRPC expression in proximal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in Ca2+ responses to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; **295:** L104-L113.

Lu W, Wang J, Peng G, Shimoda LA, Sylvester JT. Knockdown of Stromal Interaction Molecule 1 Attenuates Store-operated Ca2+ Entry and Ca2+ Responses to Acute Hypoxia in Pulmonary Arterial Smooth Muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009.

Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F. A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 2003; **40:** 551-561.

Luin E, Lorenzon P, Wernig A, Ruzzier F. Calcium current kinetics in young and aged human cultured myotubes. *Cell Calcium* 2008; **44:** 554-566.

Lumeng C, Phelps S, Crawford GE, Walden PD, Barald K, Chamberlain JS. Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* 1999; **2:** 611-617.

Luo D, Broad LM, Bird GS, Putney JW, Jr. Signaling pathways underlying muscarinic receptor-induced [Ca2+]i oscillations in HEK293 cells. *J Biol Chem* 2001; **276:** 5613-5621.

Luo S, Chen Y, Lai KO et al. {alpha}-Syntrophin regulates ARMS localization at the neuromuscular junction and enhances EphA4 signaling in an ARMS-dependent manner. *J Cell Biol* 2005; **169:** 813-824.

Lyfenko AD, Dirksen RT. Differential dependence of store-operated and excitation-coupled Ca2+ entry in skeletal muscle on STIM1 and Orai1. *J Physiol* 2008; **586:** 4815-4824.

Lyssand JS, DeFino MC, Tang XB et al. Blood pressure is regulated by an alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *J Biol Chem* 2008; **283:** 18792-18800.

M

Ma HT, Venkatachalam K, Parys JB, Gill DL. Modification of store-operated channel coupling and inositol trisphosphate receptor function by 2-aminoethoxydiphenyl borate in DT40 lymphocytes. *J Biol Chem* 2002; **277:** 6915-6922.

MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B, Green NM. Amino-acid sequence of a Ca2+ + Mg2+-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 1985; **316:** 696-700.

MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. The mechanism of Ca2+ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPases. *J Biol Chem* 1997; **272:** 28815-28818.

MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4:** 566-577.

Madhavan R, Massom LR, Jarrett HW. Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **185:** 753-759

Madhavan R, Jarrett HW. Phosphorylation of dystrophin and alpha-syntrophin by Ca(2+)-calmodulin dependent protein kinase II. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1434:** 260-274.

Maes K, Missiaen L, Parys JB et al. Adenine-nucleotide binding sites on the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor bind caffeine, but not adenophostin A or cyclic ADP-ribose. *Cell Calcium* 1999; **25:** 143-152.

Malli R, Naghdi S, Romanin C, Graier WF. Cytosolic Ca2+ prevents the subplasmalemmal clustering of STIM1: an intrinsic mechanism to avoid Ca2+ overload. *J Cell Sci* 2008; **121:** 3133-3139.

Mallouk N, Jacquemond V, Allard B. Elevated subsarcolemmal Ca2+ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca2+-activated K+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97:** 4950-4955.

Mallouk N, Allard B. Ca(2+) influx and opening of Ca(2+)-activated K(+) channels in muscle fibers from control and mdx mice. *Biophys J* 2002; **82:** 3012-3021.

Manji SS, Parker NJ, Williams RT et al. STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1481:** 147-155.

Marchand E, Constantin B, Balghi H et al. 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* 2004; **297:** 363-379.

Marks AR, Tempst P, Hwang KS et al. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86:** 8683-8687.

Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 2005; **7:** 179-185.

Martonosi AN, Pikula S. The structure of the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim Pol* 2003; **50:** 337-365.

Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P3-induced Ca2+ release. *J Biochem* 1997; **122:** 498-505.

Matsuda T, Takuma K, Baba A. Na(+)-Ca2+ exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol* 1997; **74:** 1-20.

Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 1992; **360:** 588-591.

McArdle A, Edwards RH, Jackson MJ. Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient mdx mouse. *Muscle Nerve* 1994; **17:** 1378-1384.

McKay RR, Szymeczek-Seay CL, Lievremont JP et al. Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3. *Biochem J* 2000; **351 Pt 3:** 735-746.

McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94:** 12457-12461.

Melzer W, Andronache Z, Ursu D. Functional roles of the gamma subunit of the skeletal muscle DHP-receptor. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; **27:** 307-314.

Mendell JR, Kissel JT, Amato AA et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1995; **333:** 832-838.

Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT et al. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* 2006; **281:** 24979-24990.

Metzinger L, Blake DJ, Squier MV et al. Dystrobrevin deficiency at the sarcolemma of patients with muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1997; **6:** 1185-1191.

Miike T, Miyatake M, Zhao J, Yoshioka K, Uchino M. Immunohistochemical dystrophin reaction in synaptic regions. *Brain Dev* 1989; **11:** 344-346.

Mikoshiba K, Huchet M, Changeux JP. Biochemical and immunological studies on the P400 protein, a protein characteristic of the Purkinje cell from mouse and rat cerebellum. *Dev Neurosci* 1979; **2:** 254-275.

Mikoshiba K. IP3 receptor/Ca2+ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* 2007; **102:** 1426-1446.

Miller DJ. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. *J Physiol* 2004; **555:** 585-587.

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.

Monaco AP, Bertelson CJ, Colletti-Feener C, Kunkel LM. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Hum Genet* 1987; **75:** 221-227.

Monnier N, Lunardi J. [Biology of malignant hyperthermia: a disease of the calcium channels of the skeletal muscle]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000; **58:** 147-156.

Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005; **2005:** re3.

Montero M, Alonso-Torre SR, Alvarez J, Sanchez A, Garcia-Sancho J. The pathway for refilling intracellular Ca2+ stores passes through the cytosol in human leukaemia cells. *Pflugers Arch* 1993; **424:** 465-469.

Mouly V, Aamiri A, Perie S et al. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol* 2005; **24:** 128-133.

Muik M, Frischauf I, Derler I et al. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* 2008; **283:** 8014-8022.

Mulle C, Benoit P, Pinset C, Roa M, Changeux JP. 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* 1988; **85:** 5728-5732.

Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S et al. Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem* 2004; **279:** 15091-15095.

N

Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98:** 14108-14113.

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

Newbell BJ, Anderson JT, Jarrett HW. Ca2+-calmodulin binding to mouse alpha1 syntrophin: syntrophin is also a Ca2+-binding protein. *Biochemistry* 1997; **36:** 1295-1305.

Nicoll DA, Ottolia M, Lu L, Lu Y, Philipson KD. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na+-Ca2+ exchanger. *J Biol Chem* 1999; **274:** 910-917.

O

Oak SA, Russo K, Petrucci TC, Jarrett HW. Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochemistry* 2001; **40:** 11270-11278.

Oberc MA, Engel WK. Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. *Lab Invest* 1977; **36:** 566-577.

Odell AF, Scott JL, Van Helden DF. Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *J Biol Chem* 2005; **280:** 37974-37987.

Odell AF, Van Helden DF, Scott JL. The spectrin cytoskeleton influences the surface expression and activation of human transient receptor potential channel 4 channels. *J Biol Chem* 2008; **283:** 4395-4407.

Ogawa Y. Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994; **29:** 229-274.

Ogawa Y. Distinct mechanisms for dysfunctions of mutated ryanodine receptor isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **369:** 208-212.

Ohba T, Watanabe H, Murakami M et al. Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2007; **42:** 498-507.

Ohlendieck K, Campbell KP. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell Biol* 1991; **115:** 1685-1694.

Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 1993; **43:** 795-800.

Okada T, Shimizu S, Wakamori M et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca2+ channel from mouse brain. *J Biol Chem* 1998; **273:** 10279-10287.

Okada T, Inoue R, Yamazaki K et al. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1999; **274:** 27359-27370.

Okuhira K, Fitzgerald ML, Sarracino DA et al. Purification of ATP-binding cassette transporter A1 and associated binding proteins reveals the importance of beta1-syntrophin in cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2005; **280:** 39653-39664.

Okumura A, Nagai K, Okumura N. Interaction of alpha1-syntrophin with multiple isoforms of heterotrimeric G protein alpha subunits. *FEBS J* 2008; **275:** 22-33.

Ong HL, Liu X, Tsaneva-Atanasova K et al. Relocalization of STIM1 for activation of store-operated Ca(2+) entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum Ca(2+) store. *J Biol Chem* 2007; **282:** 12176-12185.

Ong HL, Cheng KT, Liu X et al. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem* 2007; **282:** 9105-9116.

Ort T, Maksimova E, Dirkx R et al. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol* 2000; **79:** 621-630.

Ostrow KL, Mammoser A, Suchyna T et al. cDNA sequence and in vitro folding of GsMTx4, a specific peptide inhibitor of mechanosensitive channels. *Toxicon* 2003; **42:** 263-274.

Otsuguro K, Tang J, Tang Y et al. Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 2008; **283:** 10026-10036.

P

Pan Z, Yang D, Nagaraj RY et al. Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking mg29. *Nat Cell Biol* 2002; **4:** 379-383.

Pani B, Ong HL, Liu X, Rauser K, Ambudkar IS, Singh BB. Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca2+ entry (SOCE). *J Biol Chem* 2008; **283:** 17333-17340.

Parekh AB. Mitochondrial regulation of intracellular Ca2+ signaling: more than just simple Ca2+ buffers. *News Physiol Sci* 2003; **18:** 252-256.

Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005; **85:** 757-810.

Paria BC, Vogel SM, Ahmmed GU et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced TRPC1 expression amplifies store-operated Ca2+ influx and endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; **287:** L1303-L1313.

Park CY, Hoover PJ, Mullins FM et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 2009; **136:** 876-890.

Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL. Store-operated Ca2+ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 1999; **98:** 487-499.

Patterson RL, van Rossum DB, Ford DL et al. Phospholipase C-gamma is required for agonist-induced Ca2+ entry. *Cell* 2002; **111:** 529-541.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 2005; **38:** 233-252.

Peel SE, Liu B, Hall IP. A key role for STIM1 in store operated calcium channel activation in airway smooth muscle. *Respir Res* 2006; **7:** 119.

Penna A, Demuro A, Yeromin AV et al. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* 2008; **456:** 116-120.

Peters MF, Kramarcy NR, Sealock R, Froehner SC. beta 2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *Neuroreport* 1994; **5:** 1577-1580.

Peters MF, Adams ME, Froehner SC. Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* 1997; **138:** 81-93.

Peters MF, Sadoulet-Puccio HM, Grady MR et al. Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J Cell Biol* 1998; **142:** 1269-1278.

Phelps SF, Hauser MA, Cole NM et al. Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice. *Hum Mol Genet* 1995; **4:** 1251-1258.

Philipp S, Cavalie A, Freichel M et al. A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. *EMBO J* 1996; **15:** 6166-6171.

Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L et al. A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 1998; **17:** 4274-4282.

Philipp S, Trost C, Warnat J et al. TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca2+-like channels in adrenal cells. *J Biol Chem* 2000; **275:** 23965-23972.

Potreau D, Raymond G. Slow inward barium current and contraction on frog single muscle fibres. *J Physiol* 1980; **303:** 91-109.

Powell JA, Carrasco MA, Adams DS et al. IP(3) receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca(2+) signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* 2001; **114:** 3673-3683.

Prakriya M, Lewis RS. Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* 2001; **536:** 3-19.

Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 2006; **443:** 230-233.

Pressmar J, Brinkmeier H, Seewald MJ, Naumann T, Rudel R. Intracellular Ca2+ concentrations are not elevated in resting cultured muscle from Duchenne (DMD) patients and in MDX mouse muscle fibres. *Pflugers Arch* 1994; **426:** 499-505.

Putney JW, Jr. Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. *Annu Rev Physiol* 1986; **48:** 75-88.

Putney JW, Jr. Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol Interv* 2001; **1:** 84-94.

Putney JW, Jr., Trebak M, Vazquez G, Wedel B, Bird GS. Signalling mechanisms for TRPC3 channels. *Novartis Found Symp* 2004; **258:** 123-133.

Puwarawuttipanit W, Bragg AD, Frydenlund DS et al. Differential effect of alpha-syntrophin knockout on aquaporin-4 and Kir4.1 expression in retinal macroglial cells in mice. *Neuroscience* 2006; **137:** 165-175.

R

Ragot T, Vincent N, Chafey P et al. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* 1993; **361:** 647-650.

Randriamampita C, Tsien RY. Emptying of intracellular Ca2+ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca2+ influx. *Nature* 1993; **364:** 809-814.

Rao GK, Kaminski NE. Induction of intracellular calcium elevation by Delta9-tetrahydrocannabinol in T cells involves TRPC1 channels. *J Leukoc Biol* 2006; **79:** 202-213.

Repetto S, Bado M, Broda P et al. Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **261:** 547-550.

Ribeiro CM, Reece J, Putney JW, Jr. Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced [Ca2+]i signaling, but not for capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 1997; **272:** 26555-26561.

Riccio A, Medhurst AD, Mattei C et al. mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **109:** 95-104.

Rivet-Bastide M, Imbert N, Cognard C, Duport G, Rideau Y, Raymond G. Changes in cytosolic resting ionized calcium level and in calcium transients during in vitro development of normal and Duchenne muscular dystrophy cultured skeletal muscle measured by laser cytofluorimetry using indo-1. *Cell Calcium* 1993; **14:** 563-571.

Rivet M, Cognard C, Rideau Y, Duport G, Raymond G. Calcium currents in normal and dystrophic human skeletal muscle cells in culture. *Cell Calcium* 1990; **11:** 507-514.

Robert V, Massimino ML, Tosello V et al. Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J Biol Chem* 2001; **276:** 4647-4651.

Romero NB, Braun S, Benveniste O et al. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2004; **15:** 1065-1076.

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. *J Cell Biol* 2005; **169:** 435-445.

Rosado JA, Sage SO. A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. *Trends Cardiovasc Med* 2000; **10:** 327-332.

Rosado JA, Sage SO. Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca2+ stores are depleted. *Biochem J* 2000; **350 Pt 3:** 631-635.

Rosado JA, Sage SO. Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *J Physiol* 2000; **529 Pt 1:** 159-169.

Rosado JA, Sage SO. Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets. *Biochem J* 2001; **356:** 191-198.

Rosado JA, Brownlow SL, Sage SO. Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca2+ entry by conformational coupling in human platelets. *J Biol Chem* 2002; **277:** 42157-42163.

Ross CA, Danoff SK, Schell MJ, Snyder SH, Ullrich A. Three additional inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: molecular cloning and differential localization in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89:** 4265-4269.

Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* 2000; **150:** 1209-1214.

Ryder-Cook AS, Sicinski P, Thomas K et al. Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. *EMBO J* 1988; **7:** 3017-3021.

S

Sadoulet-Puccio HM, Khurana TS, Cohen JB, Kunkel LM. Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum Mol Genet* 1996; **5:** 489-496.

Saleh SN, Albert AP, Peppiatt-Wildman CM, Large WA. Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes. *J Physiol* 2008; **586:** 2463-2476.

Samitt CE, Bonilla E. Immunocytochemical study of dystrophin at the myotendinous junction. *Muscle Nerve* 1990; **13:** 493-500.

Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006; **444:** 574-579.

Sandow A. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharmacol Rev* 1965; **17:** 265-320.

Santillan G, Katz S, Buitrago C, Boland R. 1alpha,25(OH)2D3 induces capacitative calcium entry involving a TRPC3 protein in skeletal muscle and osteoblastic cells. *Biol Res* 2004; **37:** 647-651.

Santillan G, Baldi C, Katz S, Vazquez G, Boland R. Evidence that TRPC3 is a molecular component of the 1alpha,25(OH)2D3-activated capacitative calcium entry (CCE) in muscle and osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; **89-90:** 291-295.

Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem* 2000; **275:** 17517-17526.

Schatzberg SJ, Anderson LV, Wilton SD et al. Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1998; **21:** 991-998.

Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 2004; **350:** 2682-2688.

Schultz J, Hoffmuller U, Krause G et al. Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol* 1998; **5:** 19-24.

Shaw G. The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* 1996; **18:** 35-46.

Shin DM, Muallem S. Skeletal muscle dressed in SOCs. *Nat Cell Biol* 2008; **10:** 639-641.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; **244:** 1578-1580.

Singh BB, Lockwich TP, Bandyopadhyay BC et al. VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca2+ influx. *Mol Cell* 2004; **15:** 635-646.

Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 2004; **6:** 113-120.

Smyth JT, Dehaven WI, Jones BF et al. Emerging perspectives in store-operated Ca2+ entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1763:** 1147-1160.

Smyth JT, Dehaven WI, Bird GS, Putney JW, Jr. Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca2+ channel activator STIM1. *J Cell Sci* 2007; **120:** 3762-3771.

Smyth JT, Dehaven WI, Bird GS, Putney JW, Jr. Ca2+-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *J Cell Sci* 2008; **121:** 762-772.

Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006; **281:** 20661-20665.

Sours-Brothers S, Ding M, Graham S, Ma R. Interaction between TRPC1/TRPC4 assembly and STIM1 contributes to store-operated Ca2+ entry in mesangial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; **234:** 673-682.

Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, Gill DL. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103:** 4040-4045.

Spencer MJ, Mellgren RL. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet* 2002; **11:** 2645-2655.

Staaf S, Maxvall I, Lind U et al. Down regulation of TRPC1 by shRNA reduces mechanosensitivity in mouse dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neurosci Lett* 2009; **457:** 3-7.

Stathopulos PB, Li GY, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M. Stored Ca2+ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca2+ entry. *J Biol Chem* 2006; **281:** 35855-35862.

Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS et al. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2008; **10:** 688-697.

Stiber JA, Zhang ZS, Burch J et al. Mice lacking Homer 1 exhibit a skeletal myopathy characterized by abnormal transient receptor potential channel activity. *Mol Cell Biol* 2008; **28:** 2637-2647.

Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, Koentges G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 2002; **295:** 1493-1500.

Straub V, Bittner RE, Leger JJ, Voit T. Direct visualization of the dystrophin network on skeletal muscle fiber membrane. *J Cell Biol* 1992; **119:** 1183-1191.

Strehler EE, Zacharias DA. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 2001; **81:** 21-50.

Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 2001; **29:** 645-655.

Suchyna TM, Johnson JH, Hamer K et al. Identification of a peptide toxin from Grammostola spatulata spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *J Gen Physiol* 2000; **115:** 583-598.

Sugawara H, Kurosaki M, Takata M, Kurosaki T. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* 1997; **16:** 3078-3088.

Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol* 1995; **128:** 373-381.

T

Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M et al. Involvement of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Atherosclerosis* 2007; **195:** 287-296.

Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M et al. Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **361:** 934-940.

Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW, Jr. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* 1989; **264:** 12266-12271.

Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 1989; **339:** 439-445.

Tanabe T, Takeshima H, Mikami A et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987; **328:** 313-318.

Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX. Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* 2001; **276:** 21303-21310.

Tang Y, Tang J, Chen Z et al. Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF. *J Biol Chem* 2000; **275:** 37559-37564.

Thomas D, Hanley MR. Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into Xenopus oocytes. *J Biol Chem* 1995; **270:** 6429-6432.

Thomas GD, Sander M, Lau KS, Huang PL, Stull JT, Victor RG. Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95:** 15090-15095.

Thomas GD, Shaul PW, Yuhanna IS, Froehner SC, Adams ME. Vasomodulation by skeletal muscle-derived nitric oxide requires alpha-syntrophin-mediated sarcolemmal localization of neuronal Nitric oxide synthase. *Circ Res* 2003; **92:** 554-560.

Tinker A, Williams AJ. Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 1992; **100:** 479-493.

Tinsley J, Deconinck N, Fisher R et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 1998; **4:** 1441-1444.

Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91:** 8307-8313.

Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004; **114:** 182-195.

Tortora et Grabowski. Principes d'Anatomie et de Physiologie. 2001.

Trebak M, St JB, McKay RR, Birnbaumer L, Putney JW, Jr. Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J Biol Chem* 2003; **278:** 16244-16252.

Treinys R, Jurevicius J. L-type Ca2+ channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas)* 2008; **44:** 491-499.

Tu CL, Chang W, Bikle DD. Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2005; **124:** 187-197.

Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 1988; **335:** 735-738.

Turner PR, Fong PY, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol* 1991; **115:** 1701-1712.

Turner PR, Schultz R, Ganguly B, Steinhardt RA. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membr Biol* 1993; **133:** 243-251.

Tutdibi O, Brinkmeier H, Rudel R, Fohr KJ. Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol* 1999; **515 (Pt 3):** 859-868.

U

Ulloa A, Gonzales AL, Zhong M et al. Reduction in TRPC4 expression specifically attenuates G-protein coupled receptor-stimulated increases in intracellular calcium in human myometrial cells. *Cell Calcium* 2009; **46:** 73-84.

Umanskii MA, Pinchuk LB. [Possibility of enhancing the detoxification effectiveness of the forced diuresis method]. *Probl Gematol Pereliv Krovi* 1977; **22:** 46-49.

V

Vaca L, Sampieri A. Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J Biol Chem* 2002; **277:** 42178-42187.

Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, deLahunta A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol* 1986; **71:** 301-310.

Vandebrouck A, Ducret T, Basset O et al. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J* 2006; **20:** 136-138.

Vandebrouck C, Imbert N, Duport G, Cognard C, Raymond G. The effect of methylprednisolone on intracellular calcium of normal and dystrophic human skeletal muscle cells. *Neurosci Lett* 1999; **269:** 110-114.

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

Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, Debaix H, Gailly P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 2002; **158:** 1089-1096.

Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L. The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem* 1998; **273:** 8675-8679.

Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A et al. Store-operated Ca(2+) entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch* 2008; **457:** 377-387.

Varnai P, Toth B, Toth DJ, Hunyady L, Balla T. Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem* 2007; **282:** 29678-29690.

Vazquez G, Lievremont JP, St JB, Putney JW, Jr. Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98:** 11777-11782.

Vazquez G, Wedel BJ, Trebak M, St John BG, Putney JW, Jr. Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *J Biol Chem* 2003; **278:** 21649-21654.

Vazquez G, Wedel BJ, Aziz O, Trebak M, Putney JW, Jr. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1742:** 21-36.

Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007; **76:** 387-417.

Vergara J, Tsien RY, Delay M. Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82:** 6352-6356.

Vig M, Beck A, Billingsley JM et al. CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 2006; **16:** 2073-2079.

Vig M, Peinelt C, Beck A et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca2+ entry. *Science* 2006; **312:** 1220-1223.

Vig M, Dehaven WI, Bird GS et al. Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat Immunol* 2008; **9:** 89-96.

Vilquin JT, Kennel PF, Paturneau-Jouas M et al. Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther* 2001; **8:** 1097-1107.

Volpe P, Salviati G, Di Virgilio F, Pozzan T. Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* 1985; **316:** 347-349.

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

W

Walker D, De Waard M. Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca2+ channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 1998; **21:** 148-154.

Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97:** 13714-13719.

Wang X, Weisleder N, Collet C et al. Uncontrolled calcium sparks act as a dystrophic signal for mammalian skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2005; **7:** 525-530.

Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalie A. Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca2+. *J Physiol* 1999; **518 (Pt 3):** 631-638.

Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1988; **52:** 503-513.

Weigl L, Zidar A, Gscheidlinger R, Karel A, Hohenegger M. Store operated Ca2+ influx by selective depletion of ryanodine sensitive Ca2+ pools in primary human skeletal muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; **367:** 353-363.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007; **447:** 87-91.

Wells DJ, Ferrer A, Wells KE. Immunological hurdles in the path to gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Rev Mol Med* 2002; **4:** 1-23.

Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92:** 9652-9656.

Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; **33:** 657-662.

Williams JC, Armesilla AL, Mohamed TM et al. The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J Biol Chem* 2006; **281:** 23341-23348.

Williams RT, Manji SS, Parker NJ et al. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 2001; **357:** 673-685.

Williams RT, Senior PV, van Stekelenburg L, Layton JE, Smith PJ, Dziadek MA. Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1596:** 131-137.

Woo JS, Kim dH, Allen PD, Lee EH. TRPC3-interacting triadic proteins in skeletal muscle. *Biochem J* 2008; **411:** 399-405.

Woods CE, Novo D, DiFranco M, Capote J, Vergara JL. Propagation in the transverse tubular system and voltage dependence of calcium release in normal and mdx mouse muscle fibres. *J Physiol* 2005; **568:** 867-880.

Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS. Ca2+ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 2006; **174:** 803-813.

Wu X, Babnigg G, Villereal ML. Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **278:** C526-C536.

Wu X, Babnigg G, Zagranichnaya T, Villereal ML. The role of endogenous human Trp4 in regulating carbachol-induced calcium oscillations in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 2002; **277:** 13597-13608.

Y

Yamamoto H, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Ozawa E. Heterogeneity of dystrophin-associated proteins. *J Biochem* 1993; **114:** 132-139.

Yang B, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Moomaw CR, Slaughter CA, Campbell KP. Heterogeneity of the 59-kDa dystrophin-associated protein revealed by cDNA cloning and expression. *J Biol Chem* 1994; **269:** 6040-6044.

Yang B, Jung D, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem* 1995; **270:** 4975-4978.

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

Yao Y, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Tsien RY. Activation of store-operated Ca2+ current in Xenopus oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 1999; **98:** 475-485.

Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 2006; **443:** 226-229.

Yeung EW, Whitehead NP, Suchyna TM, Gottlieb PA, Sachs F, Allen DG. Effects of stretch-activated channel blockers on [Ca2+]i and muscle damage in the mdx mouse. *J Physiol* 2005; **562:** 367-380.

Yoshida J, Ishibashi T, Imaizumi N, Takegami T, Nishio M. Capacitative Ca2+ entries and mRNA expression for TRPC1 and TRPC5 channels in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Eur J Pharmacol* 2005; **510:** 217-222.

Yoshida M, Suzuki A, Yamamoto H, Noguchi S, Mizuno Y, Ozawa E. Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* 1994; **222:** 1055-1061.

Yoshida Y, Imai S. Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn J Pharmacol* 1997; **74:** 125-137.

Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM et al. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* 2003; **114:** 777-789.

Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 2007; **9:** 636-645.

Z

Zagranichnaya TK, Wu X, Villereal ML. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 2005; **280:** 29559-29569.

Zeng W, Yuan JP, Kim MS et al. STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* 2008; **32:** 439-448.

Zhang SL, Yu Y, Roos J et al. STIM1 is a Ca2+ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca2+ store to the plasma membrane. *Nature* 2005; **437:** 902-905.

Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH et al. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103:** 9357-9362.

Zhang Z, Tang Y, Zhu MX. Increased inwardly rectifying potassium currents in HEK-293 cells expressing murine transient receptor potential 4. *Biochem J* 2001; **354:** 717-725.

Zheng L, Stathopulos PB, Li GY, Ikura M. Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca2+ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **369:** 240-246.

Zweifach A, Lewis RS. Mitogen-regulated Ca2+ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca2+ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90:** 6295-6299.

Zweifach A, Lewis RS. Calcium-dependent potentiation of store-operated calcium channels in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 1996; **107:** 597-610.

CURRICULUM VITAE

Jessica Sabourin
Née le 08 Mars 1982 à Poitiers (86)

Adresse professionnelle:
Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires (IPBC)
CNRS UMR 6187, PBS
40, Avenue du Recteur Pineau
86022 Poitiers Cedex
Tél: 05 49 45 38 29
Mail: jessica.sabourin@etu.univ-poitiers.fr

Situation actuelle: Doctorante (3ème année), allocataire de recherche

FORMATION UNIVERSITAIRE

2005-2006: Master 2 Recherche Biologie, Santé et Agronomie, spécialité: Physiologie Biologie Cellulaire et Moléculaire à Poitiers; Mention **Bien**

2004-2005: Master 1 de Biologie Cellulaire et Physiologie à Poitiers; Mention **Bien**

2003-2004: Licence de Biologie cellulaire et Physiologie à Poitiers; Mention **A/Bien**

2000-2003: Deug Sciences de la Vie (1ère et 2ème année) à Poitiers; Mention **P**

ACTIVITES DE RECHERCHE

Depuis octobre 2006: doctorante en Physiologie et Physiopathologie
Au sein de l'équipe «Physiologie et Physiopathologie des Canaux Ioniques» de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, France.
Titre du projet: «Influx cationique dépendant des canaux TRPCs dans les cellules musculaires squelettiques: régulation par le complexe dystrophine/α1-syntrophine et par la voie PLC. *Implication dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne*».
Ce travail est dirigé par le Dr. Bruno Constantin.

Janvier 2006-Juin 2006: Stage de Master 2 recherche
Au sein de l'équipe «Physiologie et Physiopathologie des Canaux Ioniques» de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, France.
Titre du projet: «Etude du complexe α1-syntrophine/TRPC1 et de ses fonctions dans la cellule musculaire squelettique».
Ce travail a été dirigé par le Dr. Bruno Constantin.

Avril 2005-Mai 2005: Stage de Master 1
Au sein de l'équipe «Canaux ioniques et épithéliums» de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, France.
Titre du projet: «Mise en place de la technique de chambre de Ussing sur l'épithélium nasal de rat».
Ce travail a été dirigé par le Pr. Christian Rogier et le Pr Frédéric Becq

COMPETENCES ASSOCIEES

Techniques de physiologie cellulaire:

- Mesure calcique avec sonde fluorescente (Fura-2)
- Patch Clamp en configuration «whole cell»

Techniques de biologie cellulaire:

- Culture cellulaire de lignées cellulaires (SolC57BL/10, SolD6minidys+, Sol C1dys-)
- Culture primaire des muscles squelettiques de souris
- Immunomarquage sur cellules et sur tissus
- Microscopie conventionnelle et confocale (Biorad MRC 1024 et Olympus FV1000)
- Chambre d'Ussing
- Test de prolifération cellulaire MTT

Techniques de biochimie et biologie moléculaire:

- Dosage de protéines
- Western Blot et co-immunoprécipitation
- GST Pull-down
- Transfection de cellules musculaires squelettiques
- Transformation de bactéries compétentes et extraction d'un vecteur plasmidique
- RT PCR quantitative

Informatique:

- Traitement d'images: Photoshop, Confocal assistant.
- Traitements de données et de résultats: GraphPad Prism, Origin 5.0 (microcal), Clampfit 9
- Acquisition de données électrophysiologiques: PClamp9.
- Bureautique: Word, Excel, Power Point

PUBLICATIONS

- **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 alpha syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha syntrophin. *FASEB J* **21**:608-617.
- **Sabourin J, Lamiche C, Vandebrouck A, Magaud C, Rivet J, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B.** (2009). Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an α1-syntrophin-dependent complex in skeletal muscle. *J. Biol. Chem*.
- **Sabourin J, Cognard C, Constantin B**. Increased cation entry through TRPC1 is mediated by PLC/PKC pathway in dystrophin-deficient myotubes. Manuscrit en préparation.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- RNAi Workshop organisé par Myores, 10-15 octobre 2006, Lyon, France.

Présentation orale: "TRPC1/α-syntrophin complex and its function in skeletal muscle cells."

- 2nd Congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Thérapeutique, 11-13 avril 2007, Toulouse, France.

Poster: "Regulation of TRPC-dependent calcium influx by dystrophin/alpha-syntrophin complex: implication in Duchenne muscular dystrophy."
J. Sabourin, A. Vandebrouck, J. Rivet, S. Sebille, C. Cognard, N. Bourmeyster and B. Constantin. Fundamental and Clinical Pharmacology 21 (Sup 1) (2007): 90.

- 36th European Muscle Conference EMC, 8-12 September 2007, Stockholm, Sweden.

Présentation poster: **"**Macromolecular complex between TRPC1/TRPC4 and alpha1-syntrophin/dystrophin: regulation of Capacitative Calcium Entries (CCEs) by PLC and DAG pathway".
J. Sabourin, A. Vandebrouck, J. Rivet, S. Sebille, C. Cognard, N. Bourmeyster and B. Constantin.
Poster: "Regulation of Capacitative Calcium Entries by alpha1-syntrophin and its PDZ domain: macromolecular association between TRPC1/TRPC4 and the alpha1-syntrophin/dystrophin complex".
J. Sabourin, A. Vandebrouck, J. Rivet, S. Sebille, C. Cognard, N. Bourmeyster and B. Constantin.

- International Congress of Myology, 26-30 Mai 2008, Marseille, France.

Présentation poster: "Regulation of TRPC-dependent calcium influx by α1-syntrophin: implication in Duchenne Muscular Dystrophy"
J. Sabourin, C. Magaud, C. Lamiche, J. Rivet, S. Sebille, C. Cognard, N. Bourmeyster and B. Constantin.

- 10th Meeting of the European Calcium Society, 17-20 September 2008, Leuven, Belgium

Poster: "Alpha1-syntrophin and its N-terminal are crucial for regulating store-operated cation entries and associate with TRPC1/TRPC4 channels in muscle: role in dystrophinopathies".
J. Sabourin, C. Lamiche, A. Vandebrouck, C. Magaud, J. Rivet, C. Cognard, N. Bourmeyster and B. Constantin.

- Invitée pour un séminaire au laboratoire des sciences pharmaceutiques dirigé par le Pr Urs T. Ruegg, 20 Avril 2009, Genève

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

2006-2007: Animation d'ateliers scientifiques (en biologie) grand public, école de l'ADN, Poitiers.

RESPONSABILITE ADMINISTRATIVE

Actuellement membre du conseil du laboratoire UMR/CNRS 6187

ACTIVITE PEDAGOGIQUE

Enseignement en biologie générale à l'IUT Hygiène Sécurité et Environnement de Niort pendant 60 heures (TD et TP).
Encadrement de stagiaire niveau BTS, Licence 3, Master 1 Recherche. Encadrement pratique de Master 2 Recherche et de doctorant 1ère année. Université de Poitiers

LANGUES

Français (écrit, parlé)
Anglais (écrit, parlé)

REFERENCES ACADEMIQUES

-Dr. Bruno Constantin, CR CNRS

Université de Poitiers, UMR CNRS 6187,
Institut de Physiologie et Biologie Cellulaire
Equipe Physiopathologie et Pharmacologie des Canaux Ioniques
40, av. Recteur Pineau, Pôle Biologie Santé,
86022 Poitiers Cedex - France
Tel : 33 (0)5 49 45 35 27
Fax : 33 (0)5 49 45 40 14
bruno.constantin@univ-poitiers.fr

-Dr. Christian COGNARD

Equipe Physiopathologie et Pharmacologie des Canaux Ioniques
Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires
UMR CNRS/Université de Poitiers n°6187
Pôle Biologie Santé
40, avenue du Recteur Pineau
86022 POITIERS CEDEX
christian.cognard@univ-poitiers.fr
Tel 33(0) 549 454 064
Fax 33(0) 549 454 014