

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

HDR

Mémoire présenté pour l'obtention de
L'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Dans la section Sciences Naturelles.

par

Bruno BASTIDE

Le 3 décembre 2003

**PLASTICITE DE L'EXPRESSION DE PROTEINES CLES DU
COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DU MUSCLE
SQUELETTIQUE DANS UN MODELE D'ATROPHIE
FONCTIONNELLE.**

Directeur de l'HDR : Pr Y. Mounier

JURY

Mme G.S. Butler-Browne Directeur de Recherches INSERM, Paris V	Rapporteur
M C. Cognard Directeur de Recherches CNRS, Poitiers	Rapporteur
M C.Y Guezennec Professeur, IMASSA, Brétigny s/Orges	Rapporteur
M M. Falempin Professeur des Universités, Lille I	Examineur
M P. Gailly Professeur des Universités, Louvain	Examineur
M J.C. Michalski Directeur de Recherche CNRS, Lille I	Examineur
Mme Y. Mounier Professeur des Universités, Lille I	Directeur

Travail réalisé au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, Université de Lille I

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mme *Yvonne Mounier* pour m'avoir intégré dans son laboratoire et pour la confiance qu'elle m'a témoignée au cours de ces années. Je tiens à lui exprimer ici toute mon estime. Son sens de l'organisation, ses conseils avisés, sa rigueur scientifique et son enthousiasme sont pour moi de précieux alliés.

J'associe à ces remerciements Mr *Maurice Falempin*, directeur du laboratoire pour sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Mes remerciements vont à Madame le Dr *G.S. Butler-Browne*, Monsieur le Professeur *C.Y. Guezennec*, et le Dr *C. Cognard* pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury en tant que rapporteurs.

Monsieur le Professeur *P. Gailly* m'a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'exprime mes remerciements à Monsieur le Professeur *J.C. Michalski* pour avoir accepté de faire partie de mon jury et d'être examinateur de ce travail en espérant que notre collaboration fructueuse se poursuivra.

Je remercie particulièrement Philippe Kischel, Laurence Stevens et Caroline Cieniewski ainsi que Thierry Toursel, Marie Pierre Catinot, qui ont contribué à ce travail, et j'ai une pensée pour toutes les personnes rencontrées dans les différents laboratoires où j'ai travaillé jusqu'à présent.

Enfin, je remercie tous les membres du Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, statutaires ou étudiants, pour leur soutien et leur bonne humeur. Merci également aux membres de l'équipe technique, car finalement, que ferions nous sans eux ?

Je tiens à remercier toute ma famille pour son soutien moral, plus particulièrement mes deux petits papillons Elliott et Samuel et bien sur Michèle...

Ce travail réalisé au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire a reçu le soutien financier du Centre National d'Etudes Spatiales, du Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, de la génopole de Lille.

SOMMAIRE

CURRICULUM VITAE	1
-------------------------	----------

INTRODUCTION GENERALE	21
------------------------------	-----------

I Ultrastructure du muscle et principe de fonctionnement : données de base	23
--	----

I. A. Structure du muscle

<u>I. B. Structure des fibres musculaires</u>	24
--	-----------

I. C. Structure des myofibrilles

<u>I. D. Les protéines contractiles motrices</u>	26
---	-----------

I. D. 1. L'actine

α - Structure

<i>β - Polymorphisme</i>	27
--------------------------	-----------

<i>γ - Fonction</i>	28
---------------------	-----------

I. D. 2. La myosine

α - structure

<i>β - Famille multigénique</i>	30
---------------------------------	-----------

γ - Fonction

<u>I. D. 3. Principe général du mécanisme de la contraction musculaire – Le cycle ATPasique de la myosine</u>	31
--	-----------

<u>I. E. Régulation calcique de la contraction musculaire</u>	33
<u>I. E. 1. Les protéines régulatrices</u>	34
<u>I. E. 1. a – la tropomyosine</u>	36
<i>α - Structure</i>	
<i>β - Polymorphisme</i>	
<i>γ - Etat on et off de la Tm</i>	38
<u>I. E. 1. b– la troponine I</u>	39
<i>α - Structure</i>	
<i>β - Polymorphisme</i>	
<i>γ - fonction</i>	
<u>I. E. 1. c - La troponine T</u>	43
<i>α - Structure</i>	
<i>β - Polymorphisme</i>	44
<i>γ - fonction</i>	45
<u>I. E. 1. d - La troponine C</u>	49
<i>α - Structure</i>	
<i>β - Polymorphisme</i>	51
<i>γ - fonction</i>	
<u>I. E. 2. Modélisation de la régulation de la contraction</u>	55
<u>I. E. 3. le canal de largage calcique du réticulum sarcoplasmique</u>	59
<u>I. E. 3. a - Structure fonction des RyR</u>	
<i>α - Structure</i>	

<i>β- Polymorphisme</i>	62
<i>γ- fonction</i>	64
- <i>Propriété de conductance de RyR</i>	
- <i>Vue générale des régulations du RyR</i>	
• Agents physiologiques	65
• Agents pharmacologiques	66
• Régulation du canal RyR par les protéines associées	67
II Couplage excitation contraction	69
<u>II. A. Interaction morphologique entre DHPR et RyR</u>	72
<u>II. B. Interaction fonctionnelle entre DHPR et RyR</u>	73
III Plasticité musculaire	78
<u>III. A. Polymorphisme des fibres squelettiques</u>	
<u>III.B. Le muscle, une structure plastique</u>	79
<u>III. B. 1 Modification de l'activité neuromusculaire par des stimulations électriques chroniques</u>	80
<u>III. B. 2. Diminution de l'activité neuromusculaire</u>	81
<i>III. B. 2. a. Blocage pharmacologique de l'influx nerveux par le tétródotoxine</i>	
<i>III. B. 2. b. L'immobilisation</i>	82
<i>III. B. 2. c. La dénervation</i>	
<i>III. B. 2. d Microgravité réelle ou simulée</i>	84
• <i>modèles de microgravité réelle et simulée</i>	
• <i>Diminution de la commande motrice</i>	85

- *Effets de la microgravité réelle sur les propriétés morphologiques, contractiles et électrophorétiques du tissu musculaire* **88**
- *Effets de la microgravité simulée sur les propriétés morphologiques, contractiles et électrophorétiques du tissu musculaire* **90**

III C. Quelles sont les voies intracellulaires impliquées dans cette plasticité musculaire ?

94

RESULTATS **101**

I. Le RYR **103**

- **Fonctionnement du canal de largage calcique du réticulum sarcoplasmique (RS) dans le muscle lent et rapide** **105**
- **Plasticité du RyR après atrophie musculaire** **108**
- **Régulation de RyR₁ par l'ADPr** **112**

II. Les protéines régulatrices **116**

- **Effets de la microgravité réelle ou simulée sur l'expression protéique et les propriétés d'activation calcique liées à la TnC** **117**
- **Mise en évidence du ciblage spécifique du bépridil sur la molécule de TnC** **121**
- **Pattern d'expression des troponines dans le soleus de rat après HU** **124**
- **Implication de la TnT dans la modulation de la réponse contractile et la coopérativité au sein du filament fin** **127**

PERSPECTIVES **130**

I. Identification de nouvelles isoformes de TnT et mise en évidence de leur rôle fonctionnel **131**

II. Etude des modifications post-traductionnelles des protéines contractiles. Implications fonctionnelles **136**

I. A. Phosphorylation

I. B. O-glycosylation **139**

III Régulation de RyR1 par la calséquestrine **148**

REFERENCES **149**

CURRICULUM VITAE

NOTICE INDIVIDUELLE, CURRICULUM VITAE

Nom: BASTIDE

Prénoms: Bruno, Patrick, Louis

Date et lieu de naissance: 12/10/63 à Fontenay aux Roses (92)

Nationalité: française

Obligations militaires: effectuées.

Situation de famille: marié , deux enfants.

Adresse personnelle:

Adresse professionnelle:

Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire
Université des Sciences et Technologies de Lille
Bat SN 4
59655 Villeneuve d'Ascq
Tel:03 20 43 40 94 ; Fax: 03 20 43 68 88
E-mail :bruno.bastide@univ-lille1.fr.

Fonctions: Maitre de Conférences à l'Université des Sciences et Technologies de Lille depuis le 1^{er} Septembre 1995.

Titres universitaires français:

1981 . Baccalauréat D, Poitiers

1983 . DEUG B, Sciences de la nature et de la vie, mention AB, Poitiers

- 1984 . Licence de Physiologie et biologie cellulaire, mention AB, Poitiers
- 1985 . Maîtrise de Physiologie option pharmacologie, mention B, Poitiers
- 1986 . DEA Biomembranes, option physiologie et pharmacologie cellulaires, mention B, Poitiers
- 1992 . Doctorat de l'Université de Poitiers, spécialité Biomembranes, option électrophysiologie et pharmacologie membranaires, interactions cellulaires. Direction scientifique: Prof. J. Délèze, Laboratoire Physiologie Cellulaire, URA CNRS 290. Soutenu le 4 Mars 1992 à Poitiers, mention très honorable avec les Félicitations du Jury.

Titre : « Modes d'action de molécules produisant le découplage électrique et diffusionnel des cellules cardiaques. Effet d'anticorps dirigés contre des sites définis de la protéine jonctionnelle connexine 43 ».

Stage postdoctoral : du 1/03/92 au 31/10/93. Etude des connexines cardiaques. Institut für Genetik, abt. Molekulargenetik, Römerstrasse, 164, 53117 Bonn, (Allemagne) sous la direction du Prof. K. Willecke.

Langues:

- Anglais: écrit et parlé
- Allemand: lu et parlé (Niveau Terminale)

Statuts:

- . Allocataire Ministère Recherche et Technologie du 1/10/86 au 1/10/90
- . Boursier AFM en 1991
- . Boursier dans le cadre d'un programme d'échange franco-allemand européen PROCOPE du 1/3/92 au 31/10/93
- . Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER), Université Paris XII Val De Marne du 1/11/93 au 30/08/95.
- . Maître de conférences depuis le 1^{er} septembre 1995.

Responsabilités administratives :

- Membre de la commission de spécialistes 66-69, 1996-2000.
- Membre nommé du CNU section 66, 1999-2003.
- Membre de la commission scientifique de la bibliothèque universitaire de l'USTL.
- Responsable des travaux pratiques et de la gestion des travaux pratiques de physiologie animale depuis janvier 2002.
- Correspondant pour le service informatique de l'université (CRI) pour le laboratoire de Plasticité Neuromusculaire.

TRAVAUX, OUVRAGES, ARTICLES:

Publications dans des ouvrages à comités de lecture :

- [1] Hervé, J.C., **Bastide B.** and Délèze, J. (1989) Segmental electrical uncoupling and conduction blocks after calcium removal and replacement in a mammalian auricle. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 21: 1017-1027.
- [2] Adovelande, J., **Bastide, B.**, Délèze, J. and Schrevel, J. (1993) Cytosolic free calcium in Plasmodium falciparum infected erythrocytes and the effect of verapamil: a cytofluorometric study. *Exp parasitology* , 76:247-258.
- [3] **Bastide, B.**, Neyses, L., Ganten, D., Paul, M., Willecke, K. and Traub, O. (1993) The gap junction protein connexin 40 is preferentially expressed in vascular endothelium as well as conductive bundles of rat heart and is increased under hypertensive conditions. *Circ. Res.*, 73: 1138-1149.
- [4] Traub, O., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Elfgang, C., **Bastide, B.**, Scheidtmann, K.H., Hülser, D. F. and Willecke, K. (1994) Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 expressed in transfected human cells and in mouse tissues. *Eur. J. Cell Biol.*, 64:101-113.
- [5] Cronier, L., **Bastide, B.**, Hervé, J.C., Délèze, J. and Malassiné, A. (1994) Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 135:402-408.
- [6] **Bastide, B.**, Hervé, J.C. and Délèze, J. (1994) The uncoupling effect of diacylglycerol on gap junctional communication of mammalian heart cells is independent of protein kinase C. *Exp. Cell Res.*, 214:519-527.
- [7] **Bastide, B.**, Hervé, J.C., Cronier, L. and Délèze, J. (1995) Rapid onset and calcium independence of the block of cell-to-cell conductance induced by heptanol in neonatal rat ventricular cells. *Pflügers Arch.*, 429:386-393.
- [8] Mellitti, K., Bournaud, R., **Bastide, B.** and Shimahara, T. (1996) Nifedipine sensitive intramembrane charge movement in Purkinje Cells from mice cerebellum. *J. Physiol* (London), 490:363-372.
- [9] Pluciennik, F., Verrecchia, F., **Bastide, B.**, Hervé, J.C., Joffre, M. and Délèze, J. (1996) Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes. *J. Memb. Biol.*, 149:169-177.
- [10] Hervé, J.C., Pluciennik, F., Verrecchia, F., **Bastide, B.**, Delage, B., Joffre, M. and Délèze. (1996) Influence of the molecular structure of steroids on their ability to interrupt gap junctional communication. *J. Membr. Biol.*, 149:179-187.

- [11] **Bastide, B.**, Jarry-Guichard, T., Briand, J.P., Deleze, J. and Gros, D. (1996) Effect of antipeptide directed against three domains of connexin43 on the gap junctional permeability of cultured heart cells. *J. Memb. Biol.*, 150:243-253.
- [12] Hervé, J.C., Pluciennik, F., **Bastide, B.**, Cronier, L., Verracchia, F., Malassiné, A., Joffre, M., and Délèze, J. (1996) Contraceptive gossypol blocks cell-to-cell communication in human and rat cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 313:243-255.
- [13] Melliti, K., Bournaud, R., **Bastide, B.**, Hidalgo, J. and Shimahara, T. (1996) Effect of SR33805 on barium current and asymmetric intramembrane charge movement in freshly dissociated mouse cerebellar Purkinje neurons. *Neuroscience Lett.*, 216: 1-4.
- [14] Catinot, M.P., **Bastide, B.**, Montel, V., Suarez-Kurtz, G. and Mounier, Y. (1997) Effect of bovine serum albumin on the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscle. *Acta Scand. Physiol.*, 160: 199-205.
- [15] Catinot, M.P., **Bastide, B.**, Suarez-Kurtz, G. and Mounier, Y. (1998) Uridine triphosphate-sensitive pathway of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *Eur. J. Pharmacol.* 362(2-3):221-7.
- [16] **Bastide, B.** and Mounier, Y. (1998) Single-channel properties of the sarcoplasmic reticulum calcium-release channel in slow- and fast-twitch muscles of Rhesus monkeys. *Pflugers Arch.* 436(3):485-8.
- [17] Toursel, T., **Bastide, B.**, Stevens, L., Rieger, F. & Mounier, Y. (2000) Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobbler mouse muscles. *Exp. Neurol.*, 162, 311-320.
- [18] **Bastide, B.**, Conti, A., Sorrentino, V. and Mounier, Y. (2000) Properties of ryanodine receptors in rat muscles submitted to hindlimb suspension. *Biochem Biophys Res. Comm.*, 270, 442-447.
- [19] Stevens, L., Firinga, C., Gohlsch, B., **Bastide, B.**, Mounier, Y. and Pette, D. (2000) Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am. J. Physiol.*, 279, 1558-1563.
- [20] Kischel, P., **Bastide, B.**, Potter, J.D. and Mounier, Y. (2000) The role of the Ca^{2+} regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca^{2+} sensitizer bepridil. *Br. J. Pharmacol.*, 131, 1496-1502.
- [21] Kischel, P., **Bastide, B.**, Stevens, L. and Mounier, Y. (2001) Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading. *J. Appl. Physiol.*, 90, 1095-1101.

- [22] Cronier, L., **Bastide, B.**, Defamie, N., Niger, C., Pointis, G., Gasc, J.M. and Malassine, A. (2001) Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta (Review). *Histol. Histopathol.*, 16, 285-295.
- [23] Stevens, L., **Bastide, B.**, Kischel; P., Pette, D. and Mounier, Y. (2002) Time-dependent changes in the expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, 282, C1025-C1030.
- [24] **Bastide, B.**, Kischel, P., Puterflam, J., Stevens, L., Pette, D., Jin, J.P. and Mounier, Y. (2002) Expression and functional implications of TnT isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading. *Pflugers Arch.*, 444, 345-352.
- [25] **Bastide, B.**, Snoeckx, K. and Mounier, Y. (2002) ADP-ribose stimulates the calcium release channel RyR1 in skeletal muscle of rat. *Biochem Biophys Res. Comm.*, 296, 1267-1271.
- [26] Cieniewski, C., **Bastide, B.**, Lemoine, J., Michalski, JC. And Mounier, Y. Identification of O-linked N-acetyl glucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Molecular and Cellular Proteomics*, (Soumis).
- [27] Stevens, L., **Bastide, B.**, Mounier, Y. Correlated changes in Myosin heavy and Light chains of soleus fibers in conditions of slow-to-fast Transitions. *Biochem Biophys Res. Comm.*, (soumis).
- [28] Kischel, P., **Bastide, B.**, Muller, M., Jin, J.P., Mounier, Y. and Martial, J. A slow TnT4 isoform increases skeletal troponin T diversity in soleus rat muscle. *FEBS Lett*, (soumis).

Publications dans autres ouvrages :

- [29] **Bastide, B.**, Jarry-Guichard, T., Gros, D. and Délèze, J. (1995) Effect of antibodies directed against three different peptide sequences of connexin43 on diffusional communication of heart cells in primary culture. In "Intercellular communication through gap junctions", Progress in Cell Res., vol 4, Y. Kanno K. Kataoka, Y. Shiba, Y. Shibata, T. Shimazu. Ed., Elsevier Science B.V. , pp159-162).
- [30] **Bastide, B.**, Neyses, L., Ganten, D., Paul, M., Willecke, K. and Traub, O. (1995) Specific expression of connexin40 and connexin43 in normal and hypertensive rat hearts. In "Intercellular communication through gap junctions"Progress in Cell Res., vol 4, Y. Kanno K. Kataoka, Y. Shiba, Y. Shibata, T. Shimazu. Ed., Elsevier Science B.V. , pp: 217-220.
- [31] Hervé, J.C., Verracchia, F., **Bastide, B.** and Délèze, J. (1995) Characteristics of heptanol action on cell-to-cell communication, studied by electrophysiological and intracellular calcium detection methods. In "Intercellular communication through gap junctions", Progress in Cell Res., vol 4, Y. Kanno K. Kataoka, Y. Shiba, Y. Shibata, T. Shimazu. Ed., Elsevier Science B.V. , pp: 225-228.

- [32] Hervé, J.C., **Bastide, B.** and Délèze, J. (1995) Interruption of cell-to-cell communication triggered in cardiac cells by a synthetic diacylglycerol. In "Intercellular communication through gap junctions", Progress in Cell Res., vol 4, Y. Kanno K. Kataoka, Y. Shiba, Y. Shibata, T. Shimazu. Ed., Elsevier Science B.V. , pp: 163-166.

Résumés publiés de communications à congrès:

Une communication orale est indiquée par le nom du présentateur souligné.

- [1] **Bastide, B.**, Délèze, J. and Hervé, J.C. (1988) Segmental electrical uncoupling of mammalian auricle after calcium repletion in vitro. *J. Physiol.* (London), 107: 138P.
- [2] Hervé, J.C., **Bastide, B.** and Délèze, J. (1989) Conduction block after the calcium paradox in excised mammalian auricles. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 20, (suppl.IV):58.
- [3] **Bastide, B.** and Délèze, J. (1991) Diffusional uncoupling by gossypol in cultured rat heart cells. *J. Physiol.* (London), 438: 138P.
- [4] Délèze, J., Hervé, J.C. and **Bastide, B.** (1991) Electrical uncoupling and conduction block in the injured mammalian heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 23: S151.
- [5] **Bastide, B.** and Délèze, J. (1991) Uncoupling of diffusional communication in neonatal rat ventricular cells by a synthetic diacylglycerol is independent of protein kinase C. *Biol. Cell*, 73:8a.
- [6] **Bastide, B.**, Hervé, J.C., Cronier, L. and Délèze, J. (1991) Rapid kinetics of the calcium independent block of gap-junctional conductance induced by heptanol in neonatal rat ventricular cells. *Biol. Cell*, 73:7a.
- [7] Hervé, J.C., Noble, D., **Bastide, B.**, Cronier, L. and Délèze, J. (1992) Nexus channels requirements for action potential entrainment in ventricular cardiac cells: simulation and experimental approaches. *J. Physiol.* (London), 446: 343P.
- [8] **Bastide, B.**, Pluciennik, F., Délèze, J., Joffre, M. and Hervé, J.C. (1992) Diffusional uncoupling induced by steroid esters in cultured neonatal rat heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 24, (suppl VI):S32.
- [9] Hervé, J.C., **Bastide, B.**, Pluciennik, F. and Délèze, J. (1992) Electrical uncoupling induced by gossypol in neonatal rat ventricular cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 24, (suppl VI):S45.
- [10] **Bastide, B.**, Jarry-Guichard, T., Gros, D. and Délèze, J. (1993) Effect of antibodies directed against three peptide sequences of connexin 43 on gap junctional communication of heart cells in primary culture. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 25 (Suppl.IV):S35.
- [11] Hervé, J.C., **Bastide, B.** and Délèze, J. (1993) Electrical uncoupling induced by a synthetic diacylglycerol in neonatal rat ventricular cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 25 (Suppl.IV):S37.

- [12] Hervé, J.C., **Bastide, B.**, Pluciennik, F. and Délèze, J. (1993) Kinetics of the electrical uncoupling induced by gossypol in neonatal rat ventricular cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 25 (Suppl.IV):S36.
- [13] Cronier, L., **Bastide, B.**, Hervé, J.C., Délèze, J. and Malassiné, A. (1993) Gap junction communication during trophoblast differentiation: influence of hCG. *Placenta*, 14 : A12.
- [14] **Bastide, B.**, Neyses, L., Willecke, K. and Traub, O. (1993) Preferential expression of the gap junction connexin40 in vascular endothelium and conductive bundles of rat heart and increase of its expression under hypertensive conditions. *Eur. J. Cell Biol.*, 60, suppl 37:22.
- [15] **Bastide, B.**, Hu, K., Gergs, U., Traub, O., Willecke, K., Neyses, L., Vetter, H. and Ertl, G. (1994) Connexin expression in myocardial infarction. *Eur. Heart J.*, 325:1702.
- [16] **Bastide, B.**, Hu, K., Gergs, U., Gaudron, P., Traub, O., Willecke, K., Neyses, L. and Ertl, G. (1994) Connexin43 and -40 expression in myocardial infarction. *Circulation*, 90; I-538.
- [17] Cronier, L., **Bastide, B.**, Traub, O., Hervé, J.C., Délèze, J. and Malassiné, A. (1994) Stimulation of connexin expression and gap junctional communication by hCG during human trophoblast differentiation. *Placenta*, 15; A10.
- [18] Mellitti, K., Bournaud, R., **Bastide, B.** and Shimahara, T. (1994) Is there a calcium mobilization process independent of calcium influx in Purkinje Cells from mice cerebellum? *J.Physiol.(Paris)*, 88:405.
- [19] **Bastide, B.**, Catinot, M.P. and Mounier, Y. (1997) Comparison of the Ca²⁺-release channel activity in fast and slow twitch muscles of rat after activation with ATP. XXVème Congrès Européen du Muscle (EMC), La Grande Motte, 14-17 Septembre, *J. Muscle Res.Cell Motility*, 18 :189.
- [20] **Bastide, B.**, and Mounier, Y. (1998) Electrophysiological characteristics of Ca²⁺-release channel currents of slow twitch muscles of rhesus monkeys. XXVIème European Muscle Congress, Schneverdingen (Germany), 21-26 septembre. *J. Muscle Res.Cell Motility*, 19, p. 304.
- [21] Toursel, T., Stevens, L., **Bastide, B.**, Kischel, P., Rieger, F. and Mounier, Y. (1999) Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobbler mouse muscles. 28th European Muscle Congress, York (UK), 4-7 septembre. *J. Muscle Res.Cell Motility*, .
- [22] Kischel, P., **Bastide, B.**, Stevens, L. and Mounier, Y. (1999) Effects of real or simulated microgravity on troponin C properties in slow and fast muscle fibres. 28th European Muscle Congress, York (UK), 4-7 septembre. *J. Muscle Res. Cell Motility*, .
- [23] Kischel, P., **Bastide, B.**, Stevens, L., Potter, J.A. and Mounier, Y. (2000) TnC isoform is responsible for the differential effect of the Ca⁺⁺ sensitizer bepridil in slow and fast fibres.

68^e Congrès de la Société de Physiologie, Faculté de Médecine et Faculté de Médecine Vétérinaire - Université de Liège, 19-22 septembre. *Pflügers Arch.*, 440, R 264.

- [24] Stevens, L., Bozzo, C., **Bastide, B.**, Bouet, V., Lacour, M. and Mounier, Y. (2001) Adaptation of biochemical and functional characteristics of rat extensor muscles to an elevation of gravity factor. XXX European Muscle Conference, Pavia (Italie), 8-12 septembre. *J. Muscle Res. Cell Motility*, .
- [25] **Bastide, B.**, Stevens, L., Kischel, P., Pette, D., Jin, J.P. and Mounier, Y. (2001) Troponin subunit expression pattern in rat soleus muscle and functional implications of troponin T after unloading conditions. XXX European Muscle Conference, Pavia (Italie), 8-12 septembre. *J. Muscle Res. Cell Motility*, .
- [26] Cieniewski, C., **Bastide, B.**, Lefebvre, T., Leroy, T., Michalski, JC and Mounier, Y. (2002) O-linked β -N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle under control conditions and after hindlimb unloading. XXXI European Muscle Conference, Lunteren (Netherlands), septembre. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 23, 21.
- [27] **Bastide, B.**, Snoeckx, K. and Mounier, Y. (2002) ADP ribose is a potent activator of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle. XXXI European Muscle Conference, Lunteren (Netherlands), septembre. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 23, 21.
- [28] Bozzo, C., Toniolo, L., Stevens, L., **Bastide, B.**, Mounier, Y. and Reggiani, C. (2003) Slow-to-fast transformation of muscle phenotype : myosin expression and regulation XXXII European Muscle Conference, Montpellier, 7-10 septembre. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 24, 325.

Communications à Congrès:

- [29] Cronier, L., **Bastide, B.**, Hervé, J.C., Délèze, J. and Malassiné, A. (1992) Gap junction communication during human trophoblast differentiation. 9th International Congress of Endocrinology, Nice 1992.
- [30] Shimahara, T., Melliti, K., **Bastide, B.** and Bournaud, R. (1994) Nifedipine sensitive charge movement in dissociated Purkinje cells from mice cerebellum. 19th INSERM European Symposium , Mt St Odile, France. 14-19 sept,
- [31] Pluciennik, F., **Bastide, B.**, Hervé, J.C., Delage, B., Verracchia, F., Joffre, M. and Délèze, J. (1994) Uncoupling of gap junctional communication by sexual steroids in cultured mammalian cells. Workshop on Intercellular Communication, Pushchino, Russie, sept 1994.
- [32] Herve, J.C., Pluciennik, F., **Bastide, B.**, Cronier, L., Malassine, A., Joffre, M. and Délèze, J. (1995) Closure of mammalian gap junction channels triggered by Gossypol. Gap Junction Conferences, Les Embiez, France, 5-10 Mars 1995.

- [33] Pluciennik, F., **Bastide, B.**, Herve, J.C., Verrecchia, F., Joffre, M. and Délèze, J. (1995) Sexual steroid esters interrupt gap junctional communication in primary cultures of mammalian cells. Gap Junction Conferences, Les Embiez, France, 5-10 Mars 1995.
- [34] Pluciennik, F., **Bastide, B.**, Herve, J.C., Verrecchia, F., Delage, B., Joffre, M and Délèze, J. (1995) Factors influencing the capacity of steroid compounds to interrupt gap junctional communication in mammalian cells. Gap Junction Conferences, Les Embiez, France, 5-10 Mars 1995.
- [35] Shimahara, T., Hidalgo, J., Mellitti, K., **Bastide, B.** and Bournaud, R. (1995) Effet du SR33805C sur les mouvements de charge intramembranaires dans les cellules de Purkinje du cervelet de souris. Société des Neurosciences , 14-18 mai 1995, Lyon.
- [36] Catinot, M.P., Suarez-Kurtz, G., **Bastide, B.**, Montel, V. and Mounier, Y. (1996) Effet de la bovine serum albumine sur le canal de largage calcique du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de lapin . Communication orale à la réunion d'Azay Le Ferron, 30-31 Mai.
- [37] Kischel, P., Stevens, L., **Bastide, B.** and Mounier, Y. (1999) Troponin C properties during slow to fast changes in muscles submitted to real or simulated microgravity. 7th European Symposium on Life Sciences Research in Space, Maastrich (NL), 29 mai-2 juin.
- [38] Kischel, P., **Bastide, B.**, Stevens, L. and Mounier, Y. (1999) Characteristics of Troponin C in slow and fast muscles after unloading conditions. 20th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Orlando (USA), 6-11 juin.
- [39] **Bastide, B.**, Conti, A., Kischel, P., Sorrentino, V. and Mounier, Y. (2000) Variation of ryanodine receptor expression in unloaded rat soleus muscle. Congrès International de Myologie, Nice (France), 27-31 mars.
- [40] Mounier, Y., Kischel, P., **Bastide, B.** and Stevens, L. (2000) Troponin C plasticity in unloading conditions. BAM' 2000 - Basics & Applications of Muscle plasticity, Abano Terme (Padova - Italy), 11-13 juin.
- [41] Kischel, P., **Bastide, B.**, Stevens, L. and Mounier, Y. (2000) Expression et rôle fonctionnel de la troponine C dans l'activité contractile de muscles atrophies. 17^{ème} réunion du Club Locomotion, Villeneuve d'Ascq, 5-6 octobre.
- [42] Mounier, Y., Kischel, P., **Bastide, B.** and Stevens, L. (2001) The regulatory contractile proteins in soleus muscle submitted to unloading conditions. 22nd Annual International Gravitational Physiology Meeting, Budapest (Hongrie), 22-27 avril.
- [43] Mounier, Y., **Bastide, B.** and Stevens, L. (2002) Changes in expression and functional implications of some key proteins involved in muscle contraction after real or simulated microgravity. Symposium : "Gravity mechanisms in sensorimotor system" - Satellite of the XXIV Annual International Meeting on Gravitational Physiology. Moscou, 11-13 juin.

- [44] Cieniewski, C., **Bastide, B.**, Lefebvre, T., Leroy, T., Mounier, Y. and Michalski, JC (2002) Proteomic analysis of O-linked β -N-acetyl-glucosaminyl proteins in control and atrophied skeletal muscles. Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Lille, 16-18 octobre.
- [45] Cieniewski, C., **Bastide, B.**, Lefebvre, T., Leroy, T., Michalski, JC and Mounier, Y. (2002) O-linked β -N-acetyl-glucosamine level in skeletal normal and atrophied muscle under control conditions and after hindlimb unloading. 13th Joint meeting , 21-23 novembre Munster, Germany .
- [46] Mounier, Y., Bozzo, C., Picquet, F., Stevens, L., Montel, V., **Bastide, B.** and Falempin, M. (2003) Role of the gravity factor on mechanical properties and expression of contractile proteins in rat soleus muscles. 24th Annual International Gravitational Physiology Meeting, 4-9 May 2003, CA, USA.
- [47] **Bastide, B.**, Cieniewski, C., Stevens, L., Bozzo, C., Lemoine, J., Michalski, JC and Mounier, Y. (2003) Characterization of some post-traductional modifications in rat skeletal muscle. Société française de myologie, Caen, 9-10 Octobre 2003, France.
- [48] Stevens, L., **Bastide, B.**, Maurage, C.A., Cochon, L., Cuisset, J.M., Vallée, L. and Mounier, Y. (2003) Repercussions of childhood spinal muscular atrophy at the muscle protein level. Société française de myologie, Caen, 9-10 Octobre 2003, France.

ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT:

1 / Vacations effectuées lors de ma thèse:

- Enseignement des **travaux pratiques de l'unité de valeur PA3 (Les grandes fonctions) de Maîtrise de physiologie** à l'**UFR SCIENCES de Poitiers**, durant l'année universitaire 1989-1990
- Enseignement des **travaux pratiques de Physiologie de l'unité de valeur PG1 de Licence d'enseignement** à l'**UFR SCIENCES de Poitiers**, durant l'année universitaire 1990-1991

2 / Activité d'enseignement effectuée à l'université Paris XII Val de Marne correspondant au poste d'ATER (192 h eqTD).

- Enseignement des **travaux pratiques de Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie et Maitrise de Sciences et Techniques** : mise en place de systèmes d'acquisition numérique.
- Enseignement des **travaux pratiques de la Maitrise de Biologie Cellulaire** : Enregistrement de potentiels intracellulaires à l'aide de la **technique de microélectrode et démonstration de la technique de Patch Clamp**. (canal Ach en configuration "cell attached" et courants Ca, K et Na en configuration "whole cell").
- Enseignement de **travaux dirigés en Maitrise de Biologie Cellulaire**

3 / Activité actuelle d'enseignement à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (~211h eqTD)

- Enseignement des **travaux dirigés** et du **cours de Physiologie Cellulaire** en Deug B deuxième année section Bio II (36h TD +12h cours).
- Enseignement des **travaux pratiques de Physiologie de l'option BC5 des Licences de Biochimie et de Biologie Cellulaire et Physiologie (36h TP eqTD)** et des **travaux dirigés portant sur la circulation et la digestion (9h TD)**.

- Enseignement du **cours** de Physiopathologie des canaux ioniques musculaires dans le module **M2 de la Maitrise de Biologie Cellulaire et Physiologie** (18h).
- Encadrement **d'étudiants dans le cadre du TER 9** (Travaux d'études et de recherches d'électrophysiologie) **de la Maitrise de Biologie Cellulaire et Physiologie:** (11hTP eqTD).
- Enseignement de **cours et de leçons d'Agrégation (15h eq TD).**
- Enseignement **cours et leçons de CAPES (15 h).**
- **Cours en DESS « protéomique » (4 h)**

4 / Encadrement de stagiaires, DEA, Thèses.

- Encadrement d'une étudiante Solenn Maguer de l'Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé. Sujet : Etude de l'activité électrophysiologique du canal calcique du réticulum sarcoplasmique chez le singe après réincorporation dans les bicouches lipidiques.", du 4 novembre 1996 au 31 janvier 1997.
- Encadrement d'un étudiant belge Koen Snoeckx dans le cadre d'un stage de formation Erasmus pendant 3 mois (2001).
- Encadrement d'une stagiaire Marion Lucas de l'IUT A de l'USTL, département génie biologique, 2e année option analyses biologiques et biochimiques pendant 2 mois (2003).
- Encadrement d'une étudiante en DEA Emmanuelle Leonetti : « Propriétés du canal calcique du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique du rat après atrophie musculaire consécutive à un épisode d'hypodynamie-hypokinésie. », année 1997/1998.

- Coencadrement du stage de DEA de Caroline Cieniewski : « Etude de la O-N-acétylglucosaminylation et de la phosphorylation dans le muscle squelettique normal et après un épisode d'hypodynamie-hypokinésie », année 2000/2001.
- Coencadrement du stage de DEA de Clotilde Doriot : « Etude de la modulation des états de phosphorylation de la tropomyosine et de la troponine I dans le muscle squelettique et dans des conditions de dysfonctionnement. », année 2003-2004.
- Coencadrement du doctorat d'université de Caroline Cieniewski , depuis septembre 2001.

Collaborations nationales et internationales :

- Dr P. Kischel, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Génie Génétique, Allée de la Chimie 3, Campus du Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique.
- Professeur JC Michalski, Laboratoire de Glycobiologie UMR 8576, IFR 118, USTL, Lille.
- Professeur JP Jin, Department of Physiology and Biophysics, Case Western Reserve University School of Medicine , Cleveland, OH44106-4910, USA.
- Professeur V. Sorrentino, Dipartimento di Ricerca Biologica e Tecnologica (DIBIT), San Raffaele Scientific Institute, via Olgettina 58, 20132 Milan , Italie.
- Professeur J.D. Potter, Department of Molecular and Cellular Pharmacology, University of Miami, School of Medicine, 1600 N.W. 10th Ave. Room6085 RMSB, Miami, Florida, FL 33136, USA.

ACTIVITE de RECHERCHE

Mes travaux de recherche ont été effectués respectivement:

- au **laboratoire de Physiologie Cellulaire (URA CNRS 290 "Biomembranes)** dans l'équipe du **Professeur Déléze** à l'**UFR des Sciences de Poitiers** de 1986 à 1992.
- à l'**Institut für Genetik, Abt. Molekulargenetik, à Bonn (Allemagne)**, dirigé par le **Professeur K. Willecke** (stage postdoctoral) de mars 1992 à octobre 1993.
- à l'**institut de Neurobiologie Moléculaire et Cellulaire (CNRS à Gif/Yvette)** dirigé par le **Professeur L.Tauc** dans le laboratoire dirigé par le **Dr. T. Shimahara** dans le cadre du poste d'Attaché d'Enseignement et de Recherche de Physiologie Générale obtenu à l'Université Paris XII d'octobre 1993 à août 1995.
- J'effectue maintenant ma recherche dans le cadre **du laboratoire de Plasticité Neuromusculaire** dirigé par le **Professeur M. Falempin à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.**

I. Travaux de recherche correspondant à la formation doctorale du candidat: 7 publications, 16 Communications.

J'ai effectué pour mon travail de thèse une étude de la régulation de la communication cellulaire cardiaque. La communication intercellulaire se fait grâce à des structures, les jonctions gap. Les jonctions gap permettent l'échange d'ions et de petits métabolites. Elles sont constituées d'éléments unitaires, les connexons, un connexon étant un hexamère de protéines jonctionnelles ou connexines. L'appariement de deux connexons de deux membranes adjacentes forme un canal fonctionnel. L'altération de cette communication intercellulaire pourrait jouer un rôle fondamental dans de nombreuses pathologies (cancer, troubles du rythme cardiaque et ischémie cardiaque).

Lors de mon travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressé à l'étude de la communication jonctionnelle des cellules cardiaques en utilisant des cultures de cellules néonatales ventriculaires de rat, des techniques de patch clamp et d'analyse du retour de fluorescence de traceurs de diffusion dans une cellule photoblanchie (FRAP).

Ces techniques nous ont permis de :

- décrire l'effet découplant d'anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine jonctionnelle du coeur (Cx43),

- déterminer les cinétiques et proposé un mode d'action de l'effet découplant de l'heptanol,
- décrire l'effet découplant de l'oléoyl acétyl glycérol sans activation de la protéine kinase C,
- de montrer que le gossypol, dont l'action contraceptive est connue, avait un effet découplant pouvant expliquer ses effets cardiotoxiques et,
- de montrer que les esters de stéroïdes pouvaient inhiber la communication jonctionnelle sans effet génomique.

II. Travaux de recherche correspondant au stage postdoctoral du candidat: 2

Publications , 3 Communications.

Ce séjour fut financé par une bourse accordée dans le cadre du programme européen PROCOPE d'échanges franco-allemand, renouvelée à compter de Janvier 1993 pour une seconde année.

- Expression des connexines 43 et 40 dans le coeur de rat normal et hypertrophié.

Nous avons pu mettre en évidence la coexpression des Cx 43 et 40 dans les myocytes du coeur de rat et discerner une distribution spatiale de la Cx40. Cette connexine exprimée plus fortement dans les couches endothéliales des vaisseaux cardiaques est caractéristique du tissu conducteur rapide du coeur (où la Cx43 est absente).

Nous avons démontré l'augmentation de l'expression de la Cx40 lors de l'hypertrophie cardiaque chez le rat. Cette Cx40 dont la conductance unitaire est plus importante que celle de la Cx43 serait donc caractéristique du tissu cardiaque rapide. L'augmentation de son expression lors de l'hypertrophie cardiaque pourrait permettre d'augmenter la conduction de l'impulsion cardiaque dans le coeur hypertrophié et de prévenir les arythmies fréquemment observées dans cette pathologie.

- Expression des connexines après ischémie cardiaque chez le rat.

L'étude de l'expression des Cx43 et 40 a été également envisagée dans le cadre de modèles expérimentaux d'ischémie cardiaque chez le rat. L'ischémie cardiaque est en effet souvent associée à des troubles majeurs du rythme (infarctus) surtout lors de la phase brusque de l'infarctus. Nous avons étudié la distribution des Cx43 et 40 dans le coeur après ischémie cardiaque et démontré une distribution normale des connexines dans le tissu cardiaque non touché par l'ischémie et particulièrement dans le tissu "remodelé", tissu dans lequel se développent des phénomènes tendant à compenser la perte du tissu ischémié. Nous avons

décrit une distribution désorganisée des connexines aux abords de la zone ischémique qui pourrait être propice aux phénomènes d'arythmie.

- Caractérisation d'un anticorps dirigé contre la connexine 40

J'ai participé à ce travail dans le cadre de l'équipe du Dr. O. Traub. Nous avons pu démontrer que la Cx40 était une phosphoprotéine et que cette phosphorylation augmentait après stimulation de la protéine kinase A. En outre, nous avons décrit la localisation et la distribution de cette connexine dans de nombreux tissus et démontré l'existence de régulations post-translationnelles de l'expression de la Cx40.

III. Recherche effectuée dans le cadre de collaborations : 3 Publications, 3 Communications.

La maîtrise de techniques (Patch Clamp, utilisation d'indicateurs calciques, techniques d'immunohistochimie , Western blot et Northern blot) m'a permis de collaborer à d'autres travaux en dehors de ceux décrits précédemment , au cours de ma thèse et au cours de mon stage postdoctoral.

- Une étude du calcium cytosolique des globules rouges normaux et des globules rouges parasités par *Plasmodium Falciparum* (responsable du paludisme) en collaboration avec le laboratoire du Professeur Schrevel (URA CNRS114 , Museum National d'Histoire Naturelle, Paris).

- Une étude de la communication via les jonctions gap lors de la différenciation du trophoblaste humain en collaboration avec l'équipe du Dr. A. Malassiné (UPR CNRS 1869 Labo. Physio. Cellulaire, Poitiers) et l'équipe du Dr. O. Traub (Institut für Genetik, Abt. Moleculargenetik, Bonn, Allemagne).

IV. Recherche effectuée dans le cadre du poste D'ATER obtenu à l'université de Paris

XII: 3 Publications, 3 Communications

Je me suis intégré dans le laboratoire de Physiologie Moléculaire et Biophysique de la Transduction dirigé par le docteur T. Shimahara (Institut CNRS de Neurobiologie Moléculaire et Cellulaire de Gif/ Yvette)

De nombreux canaux calciques ont été décrits dans le cerveau qui pourraient jouer un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie calcique des cellules neuronales et dans les processus de sécrétion (Snutch et coll., Current Opinion in Neurobiology, 1992; 2:247). Il

s'agit des canaux de type T, L, N et P. L'étude de ces canaux calciques est fondamentale afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques permettant de prévenir ou de soigner certaines pathologies du système nerveux, comme l'ischémie et de comprendre certaines maladies dégénératives.

Parmi ces canaux calciques, le canal de type L (appelé encore récepteur aux dihydropyridines (DHP)) est un complexe de 5 sous unités protéiques α_2 , β , δ et γ , α_1 , cette dernière jouant le rôle de canal. Dans les cellules musculaires, le récepteur aux DHP localisé dans la membrane du système tubulaire transverse assure non seulement un rôle de canal mais également un rôle de détecteur de voltage impliqué dans le mécanisme de couplage excitation-libération du calcium intracellulaire nécessaire à la contraction musculaire (Tanabe et coll., 1988).

Le but de ce projet était d'établir le rôle des récepteurs aux DHP de type neuronal, en tant que canal et/ou de voltage sensor engagé dans un processus d'excitation-libération de calcium du réticulum endoplasmique. En effet, la présence de récepteurs à la ryanodine de type squelettique a été décrite dans ces cellules ainsi que l'existence de structures d'apposition entre membranes plasmiques et réticulum endoplasmique (Kuwajima et coll., Neuron, 1992; 9:1133; Furuichi et coll., J. Neurosci., 1994; 14:4794).

Les résultats obtenus démontrent que les mouvements de charge peuvent être enregistrés dans les cellules de Purkinje et qu'ils peuvent être divisés en deux groupes: une composante sensible et une composante insensible à la nifédipine. La composante de mouvement de charge sensible à la nifédipine représente 39% des mouvements de charges totaux. Des variations de calcium évoquées par des sauts de potentiels dépendent en partie de l'influx de calcium à travers les canaux calciques mais aussi du potentiel de membrane. La variation de calcium intracellulaire dépendante du potentiel est bloquée par la nifédipine et la ryanodine.

V. Recherche effectuée actuellement dans le cadre de mon poste de Maître de Conférences obtenu à l'Université de Lille 1 : 12 publications, 23 communications.

Les travaux réalisés par notre laboratoire ont pour objectif d'étudier la plasticité neuromusculaire en conditions d'atrophie musculaire (modèle d'hypodynamie-hypokinésie), de déterminer les rôles respectifs des contrôles myogène et neurogène (sensorimoteur) dans

l'expression de nouveaux phénotypes musculaires et la relation entre ces transformations et les modifications fonctionnelles des muscles atrophiés.

Nos travaux et le programme présenté sont donc focalisés sur un unique objectif : la compréhension de la nature et de l'origine des dysfonctionnements associés à cette atrophie et la recherche de moyens physiologiques susceptibles de l'enrayer. Nos études cherchent à analyser, à l'échelon moléculaire, les transformations de certaines protéines impliquées dans la contraction des muscles atrophiés et les conséquences fonctionnelles de ces transitions d'expression. Les travaux présentés dans ce manuscrit correspondent essentiellement aux études concernant les protéines régulatrices (troponine C, troponine T et troponine I) et la protéine canal du largage calcique du réticulum sarcoplasmique, le récepteur ryanodine.

INTRODUCTION

GENERALE

Le muscle est une structure capable de transformer l'énergie chimique en énergie mécanique et de produire une force. On distingue trois types de muscles : les muscles lisses qui assurent les fonctions vitales indépendantes de la volonté, le muscle strié cardiaque pompe vitale qui assure la circulation du sang et les muscles striés squelettiques. Les muscles squelettiques sont des structures hétérogènes adaptées à leur fonction : assurer la posture, la locomotion et la manipulation. La suite de cet exposé sera ciblé sur leurs propriétés.

Les muscles sont constitués d'un assemblage de fibres musculaires, lentes ou rapides, pouvant être structurellement et fonctionnellement différentes : ainsi les propriétés de chaque muscle vont dépendre de la combinaison des propriétés intrinsèques de chaque fibre et de la proportion de chaque type de fibre le constituant. Cette diversité de structure permet une adéquation entre le muscle et la fonction qu'il assure, et une forte capacité d'adaptation aux changements des conditions environnantes. Cependant malgré cette diversité, le mécanisme général de la contraction reste le même dans ses éléments de base.

La contraction musculaire est basée sur l'interaction entre deux protéines contractiles, l'actine et la myosine, sous le contrôle d'un mécanisme fin de détection de la concentration calcique cytosolique mettant en jeu un complexe de protéines régulatrices, les troponines et la tropomyosine. La cohésion de cet ensemble de protéines est assurée par des protéines de structure.

Cependant ces protéines ne sont pas à l'origine de l'augmentation du calcium libre cytosolique à la base même du processus de contraction musculaire. En effet, cette augmentation du calcium libre intracellulaire met en jeu l'excitabilité du muscle et le réticulum sarcoplasmique, réservoir de calcium intracellulaire au niveau de la jonction triadique. A ce niveau, deux récepteurs clés sont impliqués dans le couplage excitation-contraction : le récepteur des dihydropyridines de la membrane du système tubule transverse et le récepteur à la ryanodine des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Nous considérerons plus particulièrement dans cette présentation certaines protéines clés de la contraction musculaire : le récepteur à la ryanodine et les protéines régulatrices de la contraction au sein du complexe des troponines qui sont l'objet des travaux de recherche présentés dans ce mémoire.

I Ultrastructure du muscle et principe de fonctionnement : données de base

I. A. Structure du muscle (figure 1)

Le muscle est un tissu constitué de cellules de grande taille, les fibres musculaires. Leur insertion sur les os se fait le plus souvent par l'intermédiaire de tendons constitués par le prolongement des gaines conjonctives : l'endomysium des fibres, le périmysium des faisceaux de fibres, l'épimysium entourant le muscle. Ces gaines de conjonctif vont assurer un maintien de la structure musculaire au repos et assurer la transmission de la force aux articulations par l'intermédiaire des tendons durant la contraction. Ce tissu confère au muscle une certaine élasticité. Par ailleurs, le muscle est irrigué par un réseau de capillaires qui lui apportent les nutriments et le débarrassent de ses déchets.

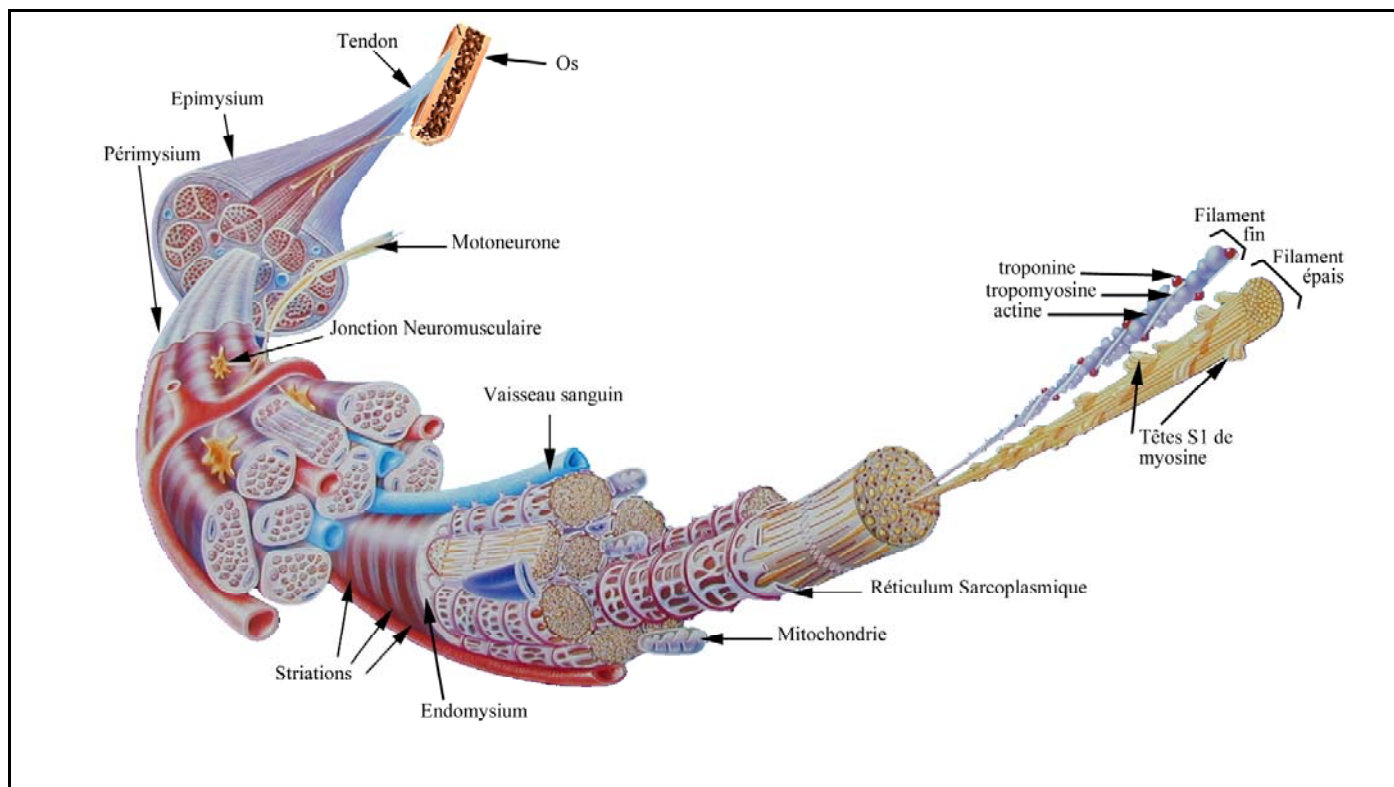


Figure 1 : Du muscle à la biologie moléculaire de la contraction : structure du muscle strié (d'après Kischel, 2000)

I. B. Structure des fibres musculaires (figure 2)

Les fibres musculaires sont regroupées en faisceaux de fibres, une fibre musculaire étant une cellule plurinucléée pouvant mesurer plusieurs centimètres.

Une fibre musculaire présente une striation caractéristique due à la présence de myofibrilles strictement arrangées entre elles. Ces myofibrilles sont constituées de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine et sont entourées d'un réseau membranaire, le réticulum sarcoplasmique qui est un stock de calcium intracellulaire. Ce réticulum est accolé à un réseau membranaire dérivé du sarcolemme qui correspond à des invaginations profondes de la membrane plasmique formant le système tubule transverse (STT).

Ces tubules transverses présentent des zones de contact avec le réticulum sarcoplasmique et plus particulièrement les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique pour former une triade. Cette structure va jouer un rôle fondamental dans le couplage excitation-contraction de la cellule musculaire .

Le sarcoplasme de la fibre musculaire contient d'autres organites, de nombreuses mitochondries dont l'apport énergétique sera fondamental au bon fonctionnement musculaire, en particulier pour les muscles lents.

Chaque fibre est sous le contrôle d'un seul neurone moteur (innervation monosynaptique). Un même motoneurone peut innerver plusieurs fibres : on parle d'unité motrice.

I. C. Structure des myofibrilles (figures 2-3)

Le muscle squelettique et les fibres musculaires présentent une double striation, horizontale correspondant aux myofilaments et verticales provenant de l'organisation des protéines contractiles en sarcomères, unité anatomo-fonctionnelle de la myofibrille. Un sarcomère est délimité par deux bandes dites bandes Z et se compose principalement de deux types de filaments, l'actine et la myosine. Le chevauchement des filaments d'actine et de myosine correspond à une bande sombre ou bande A (anisotrope) par opposition à la bande claire (I pour isotrope) constituée uniquement de filaments fins. Au cours de la contraction, la longueur du sarcomère va varier suite à une diminution de la bande claire, la bande A restant à une longueur constante. La contraction va donc résulter du glissement des filaments fins et épais entrelacés qui va entraîner un phénomène actif (raccourcissement) et passif (la relaxation).

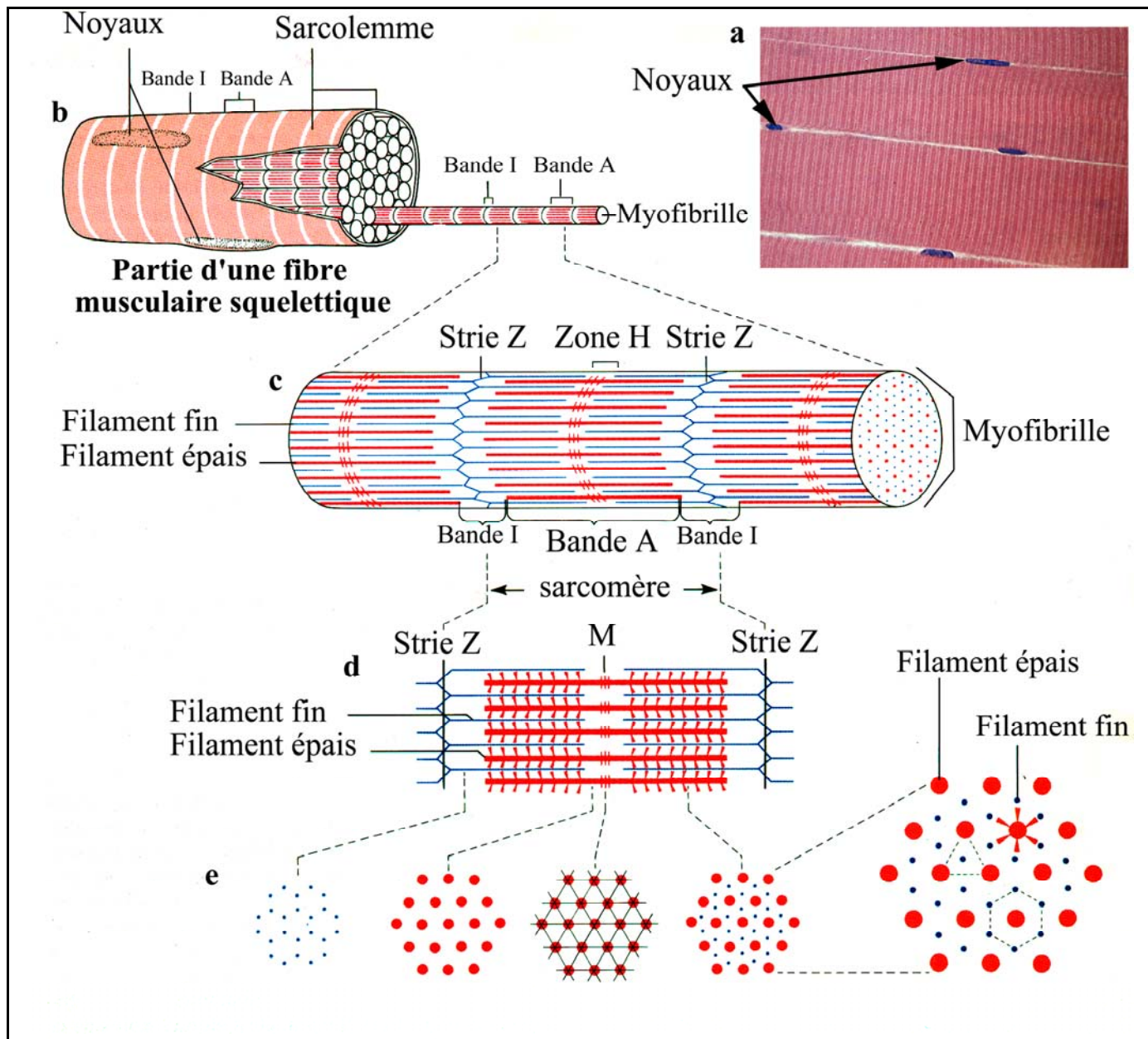


Figure 2 : Organisation d'une fibre musculaire striée.

- a - Photomicrographie d'une portion de deux fibres musculaires (x 250).
 - b - Schéma d'une portion de fibre comportant de nombreuses myofibrilles.
 - c - Schéma d'une portion de myofibrille montrant la succession de sarcomères.
 - d - Schéma de la disposition des filaments fins et épais au sein d'un sarcomère.
 - e - Coupes transversales réalisées à différents endroits d'un sarcomère.
- (d'après Kischel, 2000)

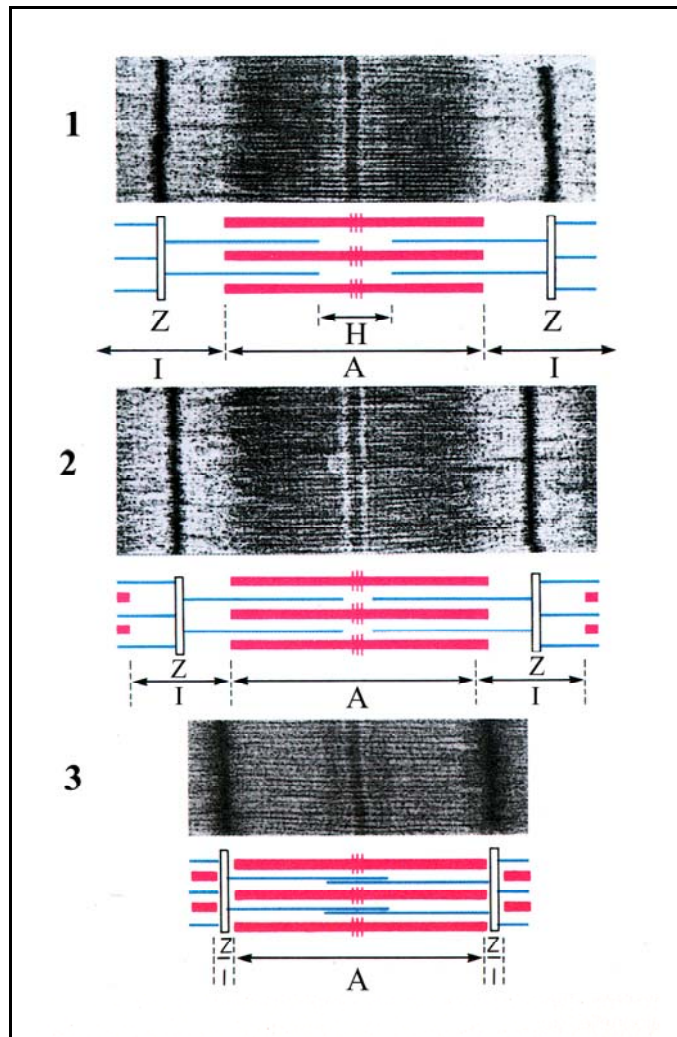


Figure 3 : Photomicrographie d'un sarcomère (x 20 000) : au repos (1), en contraction partielle (2), en contraction complète (3).

Les stries Z délimitent le sarcomère. Bande A, anisotrope dont la longueur ne varie pas au cours de la contraction. Bande I, isotrope dont la longueur varie en fonction du degré de contraction (d'après Marieb, 1993)

I. D. Les protéines contractiles motrices (figures 4-5)

I. D. 1. L'actine

α - Structure

L'actine monomérique est une protéine globulaire (G) de 43 kDa qui possède quatre sous domaines. L'actine a la propriété de polymériser en milieu salin. Les globules d'actine forme alors un filament polaire (actine F). Dans le sarcomère l'actine G va former des filaments d'un diamètre de 8 nm qui forment une hélice serrée. Il en résulte une structure en

double hélice , les deux brins d'actine tournant l'un autour de l'autre tous les 37 nm (Figure 4a).

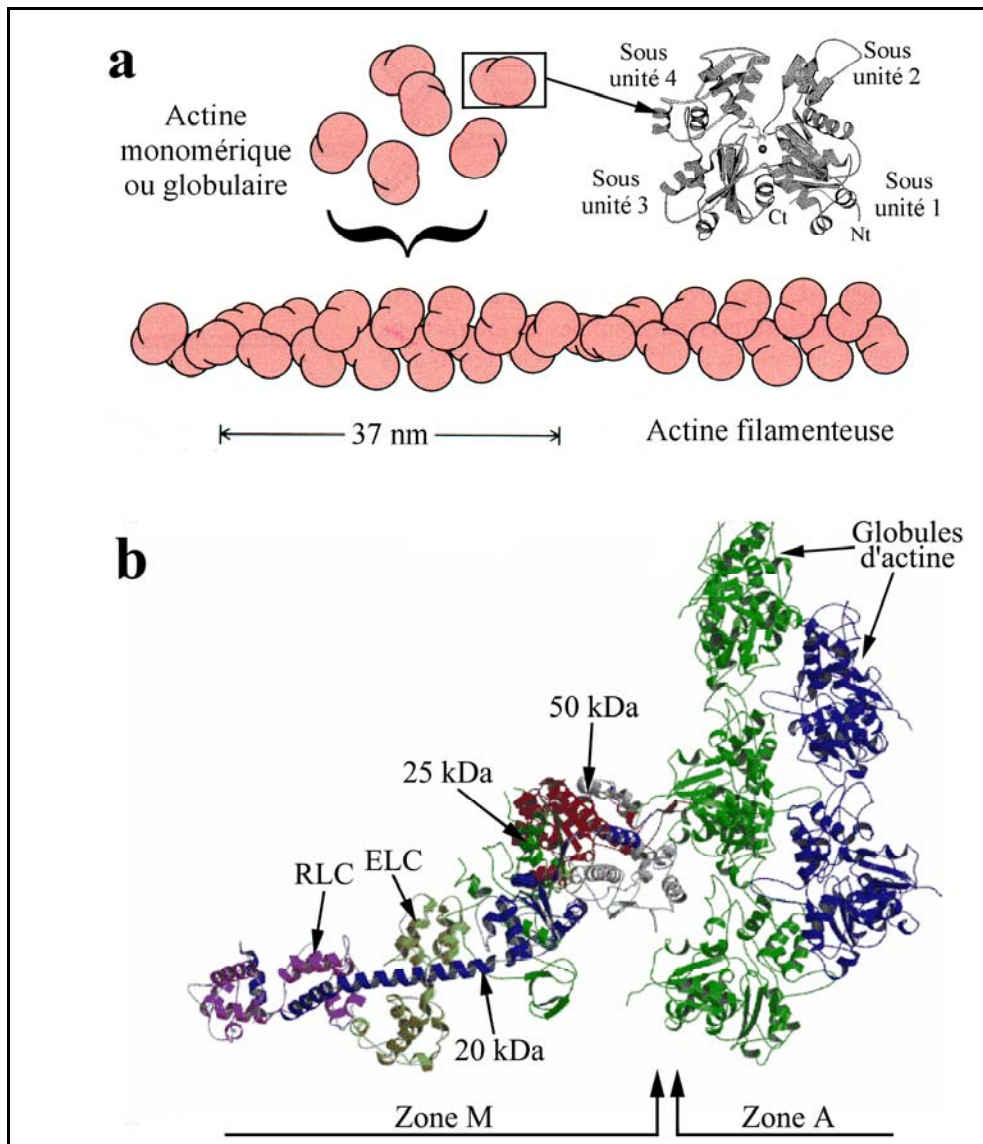


Figure 4 : Structure et organisation de l'actine.

a. Arrangement des globules d'actine dans le filament d'actine.

L'assemblage des globules d'actine forme une hélice hélicoïdale (d'après Alberts et coll., 1993).

L'agrandissement montre la structure d'un globule d'actine composé de 4 sous-unités.

b. Assemblage des molécules d'actine (Zone A) et de myosine (Zone M). ELC, chaîne légère essentielle ; RLC, chaîne légère régulatrice.

β - Polymorphisme

Deux isoformes d'actine ont été décrites dans le tissu musculaire : l'actine α squelettique et l'actine α cardiaque (Whalen et coll., 1976). Ces deux isoformes ne diffèrent que de quatre acide aminés sur 374 et sont exprimées simultanément au cours du

développement (Vandekerckhove et coll., 1986). Dans les muscles adultes ces isoformes sont exprimées spécifiquement dans les muscles squelettique et cardiaque (Vandekerckhove et coll., 1986).

γ - Fonction

L'actine F forme le filament fin. Chaque globule d'actine possède un site d'interaction pour les têtes de myosine (Holmes et coll., 1990), interaction moléculaire qui sera à la base de la contraction musculaire (figures 5-6).

I. D.2. La myosine

α - structure (figure 5)

La myosine est une protéine hexamérique en forme de club de golf. Elle est constituée de deux chaînes lourdes de myosine (MHC, Myosin heavy chains) de 200 kDa environ, auxquelles sont associées deux paires de chaînes légères de myosine (MLC, Myosin light chains), d'un poids moléculaire de 18-22 kDa (Warrick et Spudich, 1987). Deux chaînes lourdes sont associées par leurs extrémités carboxy-terminales, les deux têtes de myosine étant dirigées vers l'extérieur du filament. 300 molécules de myosines forment un filament épais de 15 nm de diamètre et de 1.5 μ m de longueur (Huxley, 1975).

Les chaînes lourdes de myosine ou MHC (figure 5) : un clivage enzymatique par la trypsine (Lowey et coll., 1969) sépare la myosine en une queue (LMM, light méromyosine) et une partie globulaire (HMM, heavy méromyosine). Cette partie globulaire peut être clivée en une tête S1 globulaire et une portion fibrillaire S2. La tête S1 correspondant en fait à l'association de 3 sous unités de 25, 50 et 20 kDa, le domaine moteur correspondant aux sous unités de 50 et 20 kDa. C'est cette partie de la molécule de myosine, qui possède un site d'interaction pour l'ATP, qui pourra interagir avec l'actine. La sous unité de 20 kDa sert de point d'ancrage des chaînes légères de myosine à la partie moteur.

Les chaînes légères de myosine ou MLC : Il existe deux types de MLC, les MLC essentielles (Alkali light chains ou DNTB-LC, car clivée par le dithiobis-2-nitrobenzoicacid) qui correspondent aux MLC1 et MLC3 et les MLC régulatrices correspondant aux MLC2. Ces protéines sont phosphorylables et peuvent moduler la contraction (Sweeney et coll., 1993, pour revue).

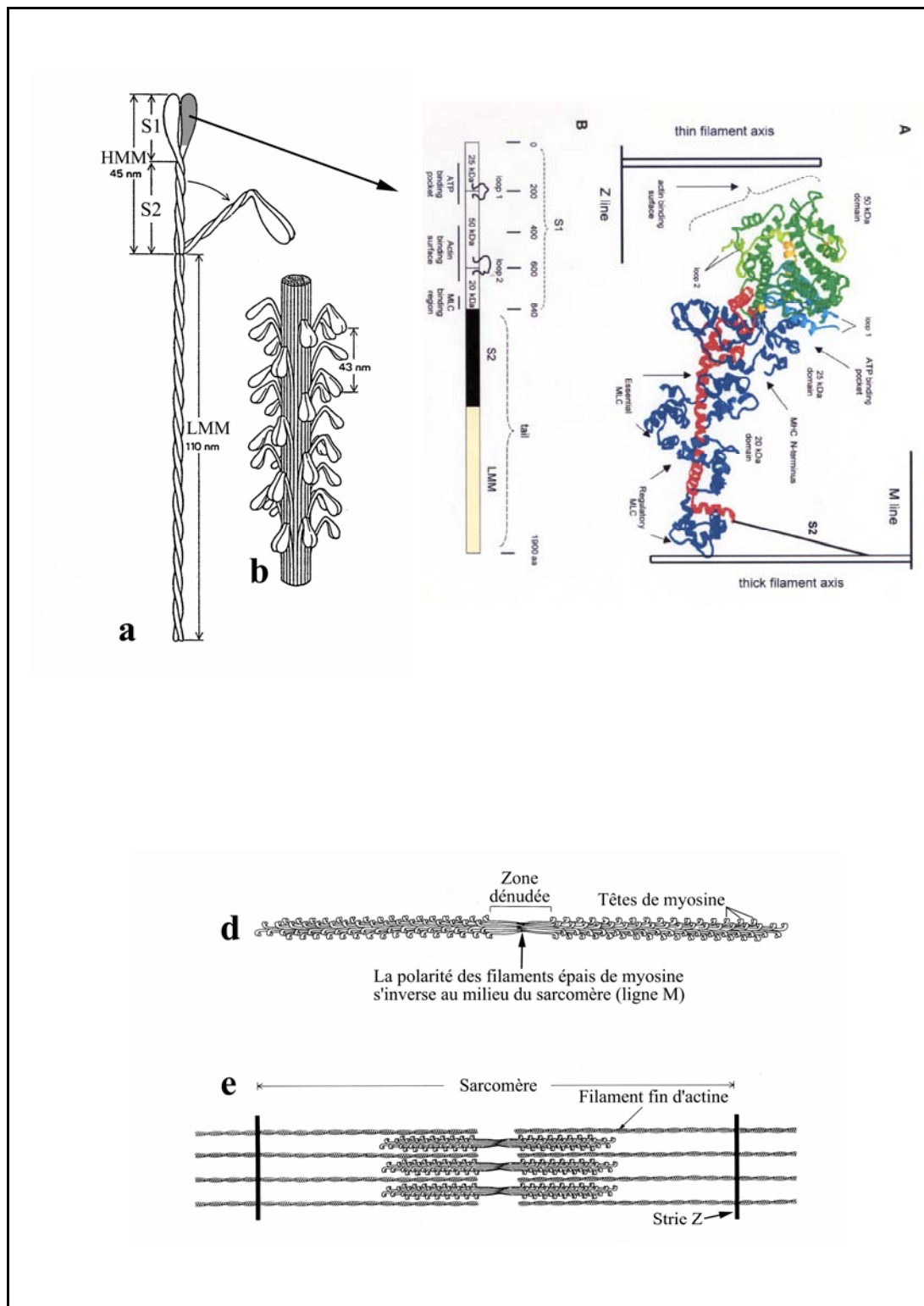


Figure 5 : Structure de la myosine.

a. Un clivage protéolytique à la trypsine sépare HMM (Heavy Meromyosin) et LMM (Light Meromyosin). b. Le fragment HMM est constitué de deux parties, une tête globulaire S1 et un fragment élastique S2 qui relie S1 à LMM. c. Détail de la tête de myosine et de ses trois sous-unités de 25, 50 et 20 kDa (d'après Libert et Cohen, 1988). d. Arrangement antiparallèle des molécules de myosine .e. Arrangement spatial des molécules de myosine dans le sarcomère.

β- Famille multigénique.

MHC et MLC comportent plusieurs isoformes codées par une famille multigénique : ainsi, 10 isoformes de myosine ont été dénombrées. Dans les fibres squelettiques de mammifères adultes, 4 isoformes sont classiquement décrites (voir pour revue, Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996) :

- la MHC de type I caractéristiques des fibres lentes,
- les MHC de type II, IIa, IIc/IIx, IIb caractéristiques des fibres rapides.

La technique histochimique utilisée par Guth et Samaha (1969) et Brooke et Kaiser (1970) pour distinguer les différents types de fibres musculaires présentes dans un muscle, repose sur la stabilité de l'activité ATPasique des différentes isoformes de MHC après préincubation des coupes de muscle avec des solutions de pH acide et basique. Les coupes de muscle sont ensuite incubées dans une solution d'adénosine triphosphate (ATP) de pH 9.4. L'utilisation d'une gamme de solution de préincubation de pH compris entre 4.3 et 10.4 a permis de différencier trois grands types de fibres : les fibres lentes de type I (qui apparaissent noires à pH 4.3 et blanches à pH 10.4) et les fibres rapides de type IIA (blanches à pH 10.4 et noires à pH 4.3) et IIB (blanches à pH 4.3 et gris clairs à pH 10.4). Les fibres exprimant à la fois des formes lentes et rapides de MHC sont dites fibres hybrides. On distingue ainsi des fibres hybrides de type IC, IIC, IIAB. L'expression des MHC répond globalement à un schéma préférentiel d'expression de transformation des MHC suivant la séquence MHC I ↔ MHC IIA ↔ MHC II d/c ↔ MHC IIB (Pette et Staron, 1990 ; Stevens et coll., 1999b).

Il existe également un polymorphisme des chaînes légères de myosine: on distingue pour la MLC1 comme pour la MLC2 une isoforme lente et rapide. L'isoforme MLC3 exprimée dans les muscles rapides est codée par le gène de MLC1f dont les transcripts subissent un épissage différent (Barton et Buckingham, 1985). La combinaison des différentes isoformes de MHC et MLC donne des isomyosines.

γ- Fonction

Des observations aux rayons X ont permis de démontrer l'existence de deux types de ponts actine-myosine : une configuration à 90° (correspondant à un état de repos, configuration A) dans un muscle relâché et une configuration à 45° dans un muscle contracté en absence d'ATP (configuration rigor like, R).

Suivant la théorie des filaments glissants (Huxley, 1969 ; Huxley et Simmons, 1971), la rotation rapide des têtes de myosine induirait un changement de l'angle des ponts qui passerait de 90 ° au repos à 45 ° faisant ainsi coulisser le filament fin entre les filaments épais.

I. D. 3. Principe général du mécanisme de la contraction musculaire – Le cycle ATPasique de la myosine (figure 6)

La théorie des filaments glissants (Huxley, 1975) est basée sur le coulisement des filaments fins et épais par des interactions cycliques entre actine et myosine. L'énergie nécessaire au basculement de la tête de myosine est fournie par l'activité ATPasique de la myosine qui libère l'énergie contenue dans la liaison du phosphate inorganique en position gamma. Le cycle attachement-détachement de la myosine sur l'actine comprend plusieurs étapes :

- 1) la liaison de l'ATP sur la tête de myosine induit une dissociation du complexe actine-myosine ($AM \leftrightarrow A + M.ATP$).
- 2) le clivage de l'ATP permet à la myosine de revenir à un angle de 90° ($M.ATP \leftrightarrow M.ADP.P_i$).
- 3) le complexe $M.ADP.P_i$ s'associe à l'actine (état A des têtes de myosine, liaison de faible affinité : $A + M.ADP.P_i \leftrightarrow A-M.ADP.P_i$).
- 4) le complexe actine – $M.ADP.P_i$ subit une isomérisation et l'interaction A-M devient très forte ($A-M.ADP.P_i \leftrightarrow AM.ADP.P_i$). Le P_i est libéré et le pont passe dans la configuration R (à 90°) ($AM.ADP.P_i \leftrightarrow AM.ADP + P_i$), générant la force par coulisement des myofilaments.

Cette dernière étape regroupe l'isomérisation $A \rightarrow R$, le relargage du P_i et la génération de force (Pate et Cooke, 1989 ; Rayment et Holden, 1994 ; Holmes, 1996).

Des étapes intermédiaires sont suggérées à travers d'autres travaux (Kawai et coll., 1987 ; Millar et Homsher, 1992 ; Geeves et Conibear, 1995) :

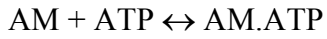
- 4-a – isomérisation $A-M.ADP.P_i \leftrightarrow AM.ADP.P_i$ régulée par le taux de calcium environnant (Ma et coll., 1994) ;
- 4-b – production de force
- 4-c – libération du P_i stabilisant la conformation génératrice de force (Dantzig et coll., 1992).
- 5 – isomérisation du complexe $AM.ADP$ et libération de l'ADP.

L'ensemble de ces étapes sont récapitulées par le schéma de Gordon et coll. (2000)

4a

4c

5



1 ↓↑ 2

3 ↑↓

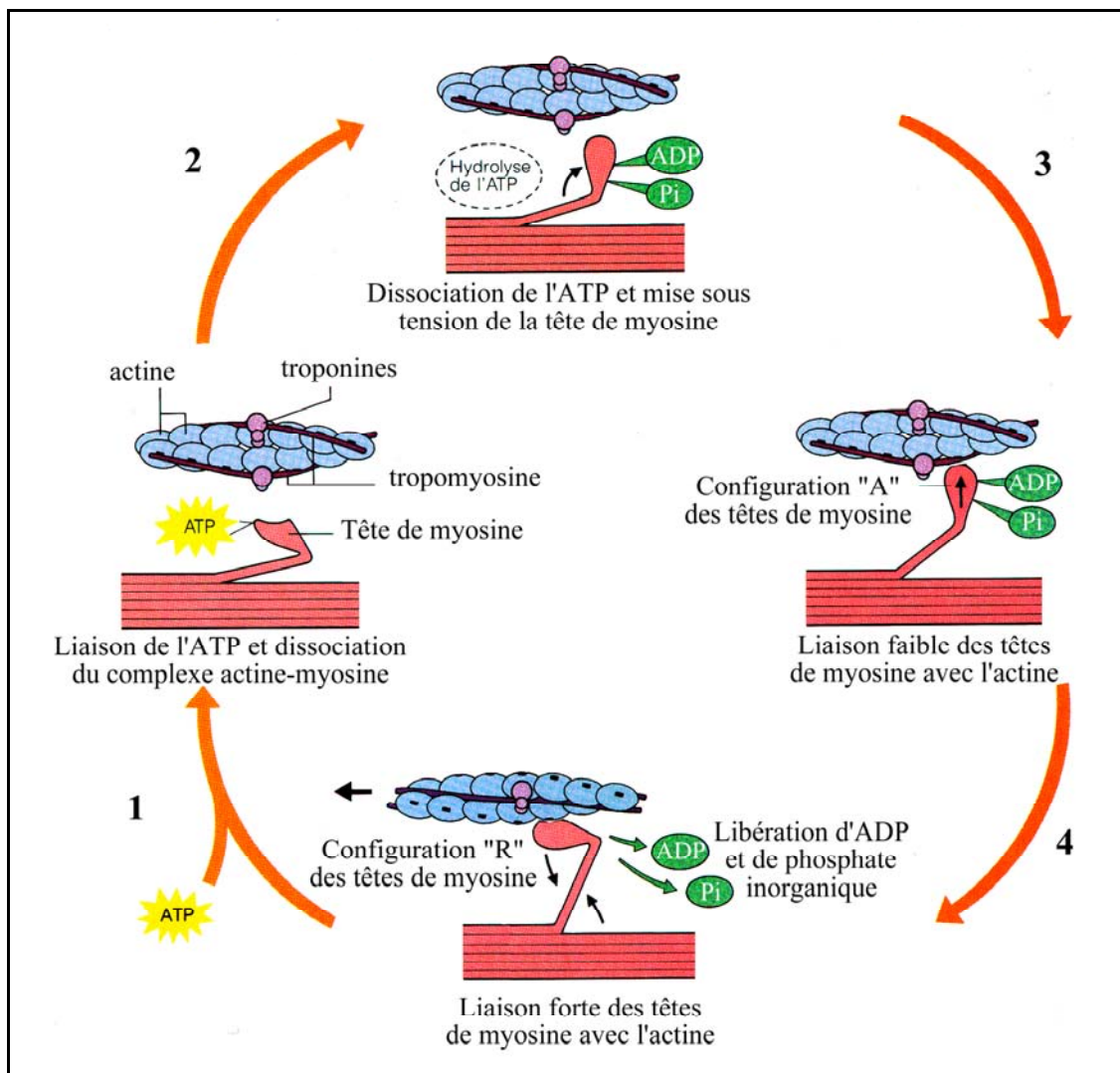


Figure 6: Interactions actine-myosine conduisant à la production de force . Les grandes étapes de 1-4 sont explicitées et correspondent à des intersections séquentielles (modifié d'après Marieb, 1993).

I. E. Régulation calcique de la contraction musculaire (figure 7)

Le calcium va jouer un rôle fondamental dans la régulation de l'interaction actine-myosine et dans le processus contractile. Cependant de nombreuses protéines et interactions protéiques jouent un rôle fondamental dans la régulation calcique de la contraction et dans le couplage excitation contraction (Voir chapitre II) ou ECC. Ces protéines existent souvent sous la forme d'isoformes multiples aux propriétés spécifiques, que l'on peut distinguer et identifier à l'aide de techniques électrophorétiques et immunohistochimiques.

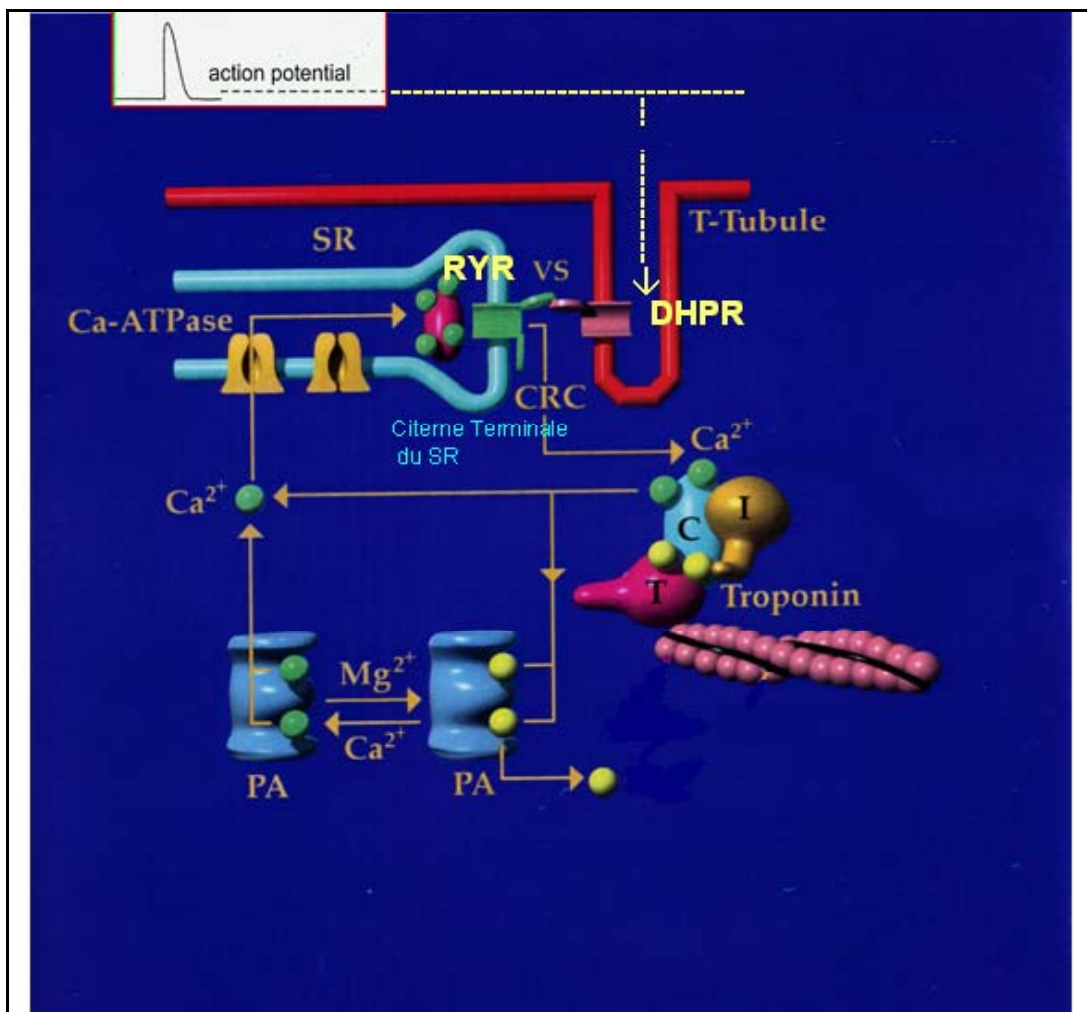


Figure 7 : Résumé des principaux événements et protéines intervenant dans le processus contractile de la fibre musculaire.

Ces principales protéines clés, polymorphiques, du muscle squelettique qui sont impliquées dans le ECC comprennent : la sous-unité α du récepteur aux déhydropyridines (DHPR), le

récepteur à la ryanodine ou canal calcique du réticulum sarcoplasmique (RyR), les protéines régulatrices de la contraction musculaire ou troponine (Tn) qui correspond à trois sous unités, la TnC, la TnI, la TnT, la tropomyosine (Tm), les chaînes lourdes (MHC) ainsi que les chaînes légères de myosine (MLC), la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique (SERCA), et la calsequestrine qui lie le Ca^{2+} dans la lumière du RS (figure 7).

La liste des isoformes de ces protéines du muscle squelettique a augmenté au fil de ces dernières années grâce au développement de techniques de plus en plus fines de séparation et d'identification des protéines.

Cette diversité d'isoformes diffère énormément entre les différentes protéines : ainsi 10 isoformes de MHC sont dénombrées alors que seulement deux isoformes de TnC sont actuellement décrites, l'une, fTnC (f pour fast) étant caractéristique et prédominante dans le muscle rapide, l'autre sTnC (s pour slow) dans le muscle lent.

La variabilité et le polymorphisme protéiques sont à la base de la diversité du muscle squelettique, de la spécialisation des fibres musculaires à leur fonction physiologique et de leur plasticité à la demande physiologique dans des conditions normales ou pathologiques.

Au cours de ce travail nous concentrons notre attention à la plasticité de certaines protéines clés du couplage excitation-contraction, plus particulièrement le RyR et les Tn.

1. E. 1 Les protéines régulatrices (figures 7 - 12)

L'utilisation de techniques biochimiques et de l'étude des caractéristiques d'activation calcique des fibres musculaires sont les principales méthodes d'investigation du rôle des protéines musculaires contractiles dans l'activité des fibres musculaires. Les caractéristiques d'activation calcique des fibres pelées sont classiquement étudiées via la tension développée par une fibre en fonction de la concentration calcique (relation Tension/pCa avec $\text{pCa} = -\log [\text{Ca}^{2+}]$) (figure 8). Les relations T/pCa ont une allure sigmoïde. Trois paramètres sont nécessaires pour décrire les caractéristiques d'activation calcique :

- le seuil d'activation, concentration en Ca^{2+} minimale nécessaire pour induire une tension, est indicateur de la sensibilité calcique du système contractile ;

- la valeur de la pCa_{50} , concentration nécessaire pour induire 50 % de la tension maximale P_0 , est un indicateur de l'affinité calcique.

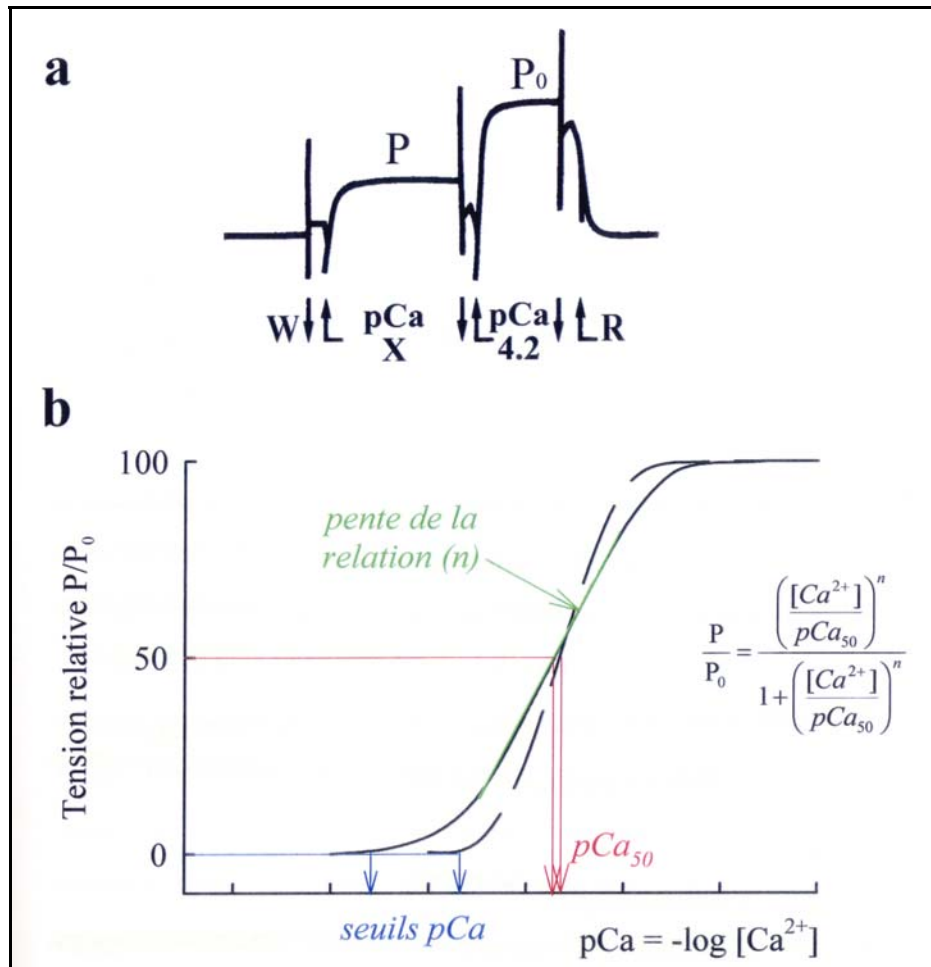


Figure 8 : Détermination des caractéristiques d'activation calcique avec la relation Tension/pCa.

a/ tracé d'enregistrement de tensions isométriques développées par une fibre. L'application d'une solution de concentration pCaX est suivie par l'application d'une solution saturante en calcium (pCa 4.2) permettant de déterminer le niveau maximal de tension de la fibre. L'ajout (flèches pointées vers le haut) ou le retrait des solutions W (solution de lavage) R (solution relaxante) sont indiquées.

b/ relation Tension/pCa d'une fibre lente (trait plein) et rapide (trait discontinu). La pente de la relation (vert) est ajustée à l'aide de l'équation de Hill (insert) (d'après Kischel , 2000)

- la pente de la sigmoïde, donnée par l'équation de Hill, traduit le degré de coopérativité entre les sites régulateurs de la TnC et les protéines régulatrices du filament fin.

Fibres lentes et rapides possèdent des relations Tension/pCa distinctes et caractéristiques, les paramètres de seuil et de pente des relations étant particulièrement représentatifs du type de fibre étudié. Les fibres lentes ont un seuil d'activation inférieur (meilleure sensibilité) par rapport aux fibres rapides, tandis que ces dernières présentent une coopérativité supérieure (coefficient de Hill plus élevé).

I. E. 1. a – la tropomyosine (figure 9)

α - Structure

La tropomyosine est un dimère de protéines de 35 kDa (Woods, 1967) formant une torsade. Plusieurs dimères s'assemblent par liaison à leurs extrémités carboxy- et amino-terminales avec chevauchement de 8-9 acides aminés, et forment ainsi le long filament de tropomyosine (Flicker et coll., 1982). La structure cristalline du domaine carboxyterminal de la tropomyosine montre que cette région (263-284) ne forme pas une double hélice comme le reste de la molécule : les deux hélices sont séparées et stabilisées par l'association avec une autre molécule de tropomyosine (Li et coll., 2002). Chaque dimère comporte sept séquences répétitives qui correspondent à des sites d'interaction avec les monomères d'actine (Cummins et Perry, 1973) ce qui stabilise le filament d'actine (Lees-Miller et Helfman, 1991). Les parties intermédiaires sont importantes pour l'activation de l'actine par la myosine (Hitchcock-De Gregori et coll., 2002). La partie carboxy-terminale est un site d'accrochage du complexe de la troponine T (Hammel et Hitchcock-De Gregori, 1996), qui est donc l'interaction permettant la liaison de la troponine au filament fin (Hinkle et coll., 1999). Dans le muscle strié, la TnT chevauche et consolide la liaison entre deux tropomyosines (Maytum et coll., 1999 ; Li et coll., 2002).

β – Polymorphisme

Les tropomyosines sont codées par quatre gènes : Tm α , Tm β , Tmp3, Tmp4. Ces gènes peuvent générer une multitude d'isoformes, spécifiques des tissus et des stades de développement. Dans le muscle squelettique, on distingue trois isoformes de sous-unité de tropomyosine : α , β , Tmp3. α et β présentent près de 86 % d'homologies de séquence. Cependant leur expression est caractéristique d'un type de muscle ce qui semble indiquer qu'elles ont des propriétés fonctionnelles spécifiques (Muthuchamy et coll., 1995). Ainsi, l'isoforme α est plus spécifiquement exprimée dans les fibres rapides tandis que l'isoforme β est plus spécifique des fibres lentes (Muthuchamy et coll., 1997).

La Tmp3 (Pieples et Wieczorek, 2000) présente de nombreuses homologies avec la Tm α du muscle lent de poulet. La Tmp3 de souris présente 99% d'homologie avec la Tmp3 humaine, 91 % d'homologie avec la Tm α de souris et près de 81 % avec la Tm β de souris. Cette isoforme ne serait réellement exprimée que dans le muscle solaire et est absente des autres muscles striés (Pieples et Wieczorek, 2000). Ainsi le dimère de

tropomyosine se présentera (sauf pour le soleus) sous une forme homomérique (α , α) ou hétéromérique (α , β).

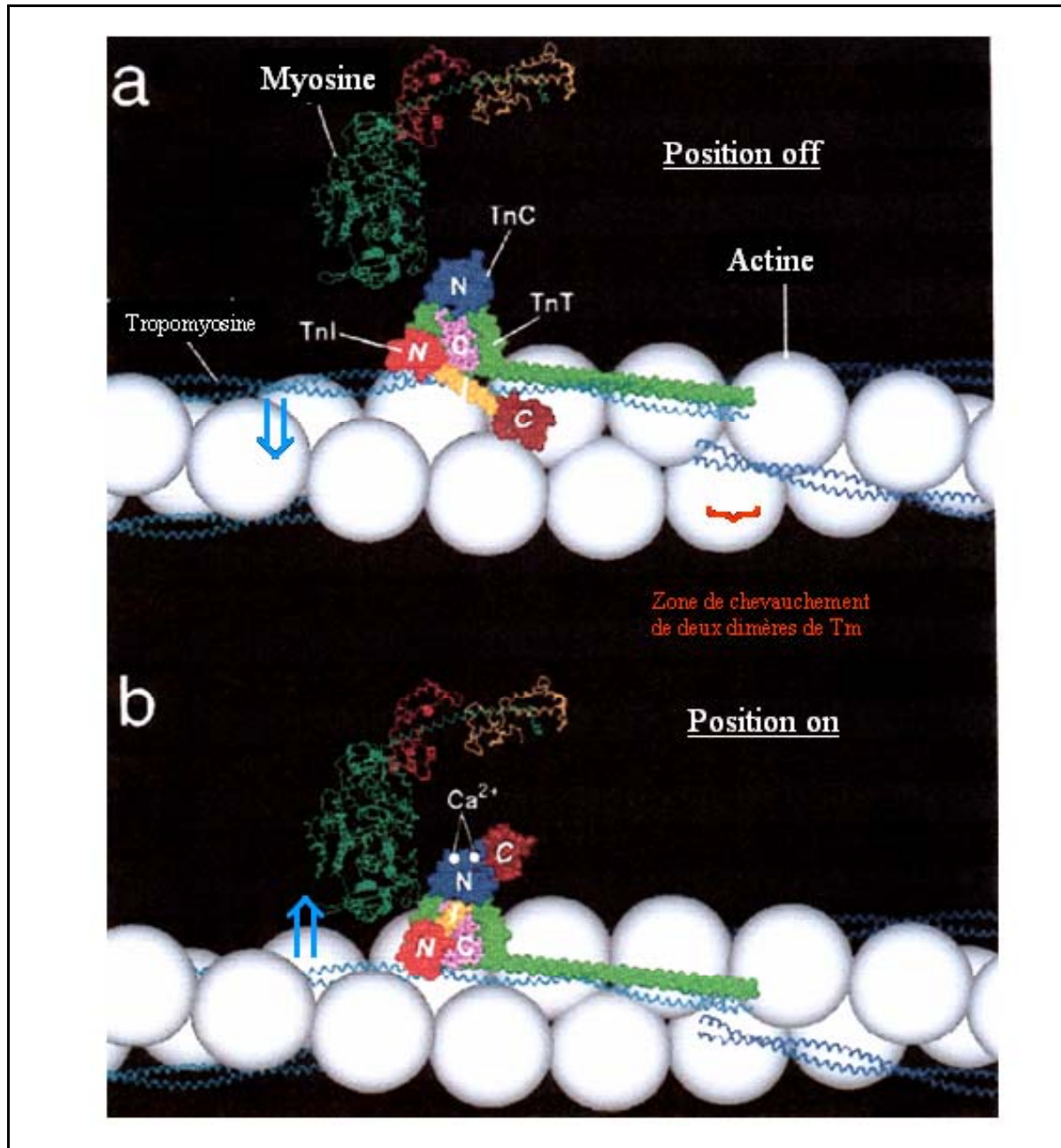


Figure 9 : Localisation de la tropomyosine et du complexe des troponines sur le filament d'actine.

La tropomyosine s'insère dans le sillon formé par la structure hélicoïdale d'actine. Les dimères de tropomyosine se chevauchent par recouvrement de leurs extrémités amino et carboxy-terminales. Les flèches indiquent le sens de déplacement de la tropomyosine sur l'actine dans ses positions « off » et « on ». La région amino-terminale de la TnT vient s'ancrer sur la partie carboxy-terminale de la Tm.

La terminaison amino-terminale de la TnC est indiquée en bleu alors que la terminaison carboxy-terminale est indiquée en rose. La TnI est indiquée en rouge, la partie inhibitrice étant en jaune. La TnT est représentée en vert.

La myosine S1 (vert), la chaîne légère essentielle (rouge) et la chaîne légère régulatrice (jaune) sont également représentées. Seules les structures de molécules de TnC, de myosine et de tropomyosine sont représentées. Une simple modélisation correspondant à la TnI et à la TnT est présentée.

a - Etat de relaxation. La partie amino-terminale de la TnC est liée à du Mg^{2+} . La partie amino-terminale de la TnI est accrochée à la partie carboxy-terminale de la TnC alors que la partie inhibitrice de la protéine interagit avec l'actine et la tropomyosine.

b - Après liaison de 2 molécules de Ca^{2+} sur la partie amino-terminale de la TnC, le domaine inhibiteur de la TnI se désolidarise de l'actine, permettant la formation d'un complexe acto-myosine.

(modifié d'après Gordon et coll., 2000)

γ - Etat on et off de la Tm (figure 9)

Une corrélation entre la vitesse de contraction et l'isoforme de Tm a été suggérée par de nombreux travaux (Bronson et Schachat, 1982 ; Schachat et coll., 1987 ; Schachat et coll., 1995).

La tropomyosine peut adopter deux états sur l'actine, on et off, qui déterminent l'état d'activation du filament fin (Lehman et coll., 1994). En position off, la Tm qui se trouve au bord du sillon de l'actine permet l'interaction faible de l'actine et de la myosine (état A_a sur la figure 9) mais empêche l'isomérisation A → R (Geeves et Halsall, 1987). En position on (b de la figure 9) la Tm est éloignée de 30° de sa position off (Vibert et coll., 1997 ; Xu et coll., 1999) et l'inhibition est levée permettant l'interaction forte actine-myosine.

L'isomérisation A → R et le passage off → on sont couplés puisque les têtes S₁ ne peuvent pas s'isomériser tant que le filament n'est pas dans un état on.

La relation ATPasique du complexe A-S₁-Tm en fonction du nombre de têtes S₁ est sigmoïde ce qui démontre que la Tm est nécessaire et suffisante pour provoquer un phénomène de coopérativité basique au sein du filament fin (Lehrer et Moris, 1982), conséquence de l'interaction du dimère de Tm avec sept monomères d'actine et du chevauchement des dimères de Tm pouvant provoquer le signal (Lehrer, 1994). Les différentes isoformes de Tm peuvent affecter la performance du sarcomère, en diminuant la sensibilité calcique et en modulant l'activation calcique en relation avec sa longueur (Pieples et coll., 2002).

Le positionnement de la Tm est régulé par le complexe des troponines (Tn), présent tous les 7 monomères d'actine et composé de trois sous-unités protéiques, la troponine C, la troponine T et la troponine I. L'étude de la structure cristallisée d'un fragment de la région carboxy-terminale de la Tm révèle un site de reconnaissance de la tropomyosine α pour la TnT (Li et coll., 2002).

I. E. 1. b – la troponine I (figures 9-11)

La troponine I (I pour inhibitrice de la contraction) est liée à l'actine et maintient le complexe (Tn – Tm) dans la position off.

α - Structure

La TnI est une protéine globulaire de 21 kDa (Perry, 1999 pour revue) qui possède des interactions permanentes avec la TnC (Sheng et coll., 1992) et la TnT (Chong et Hodges, 1982).

β - Polymorphisme

Trois types de TnI ont été décrites : lente, rapide et cardiaque (Hartner et Pette, 1990). Ces trois isoformes présentent une forte homologie dans le domaine carboxy-terminal, alors que le domaine amino-terminal présente une plus grande variabilité. L'isoforme cardiaque présente une extension amino-terminale phosphorylable par la protéine kinase A. Il n'existe actuellement aucune donnée concernant la structure tridimensionnelle de la TnI.

γ - Fonction (figures 9-11)

L'activité ATPasique du complexe acto-myosine est inhibée par la TnI (Greaser et Gergely, 1973). Cette activité inhibitrice est potentialisée par la Tm (Perry et coll., 1972). La TnI présente également un effet inhibiteur de l'activité ATPasique du complexe actine-S₁ (Syska et coll., 1976 ; Levine et coll., 1988). Le fragment 96-115 contient la séquence fondamentale nécessaire à cette inhibition (Talbot et Hodges, 1981), le fragment 104-115 ou Ip pour « inhibitory peptide ». L'Ip possède en effet une activité inhibitrice et se lie à l'actine de façon Ca²⁺ dépendante (Syska et coll., 1976 ; Talbot et Hodges, 1981).

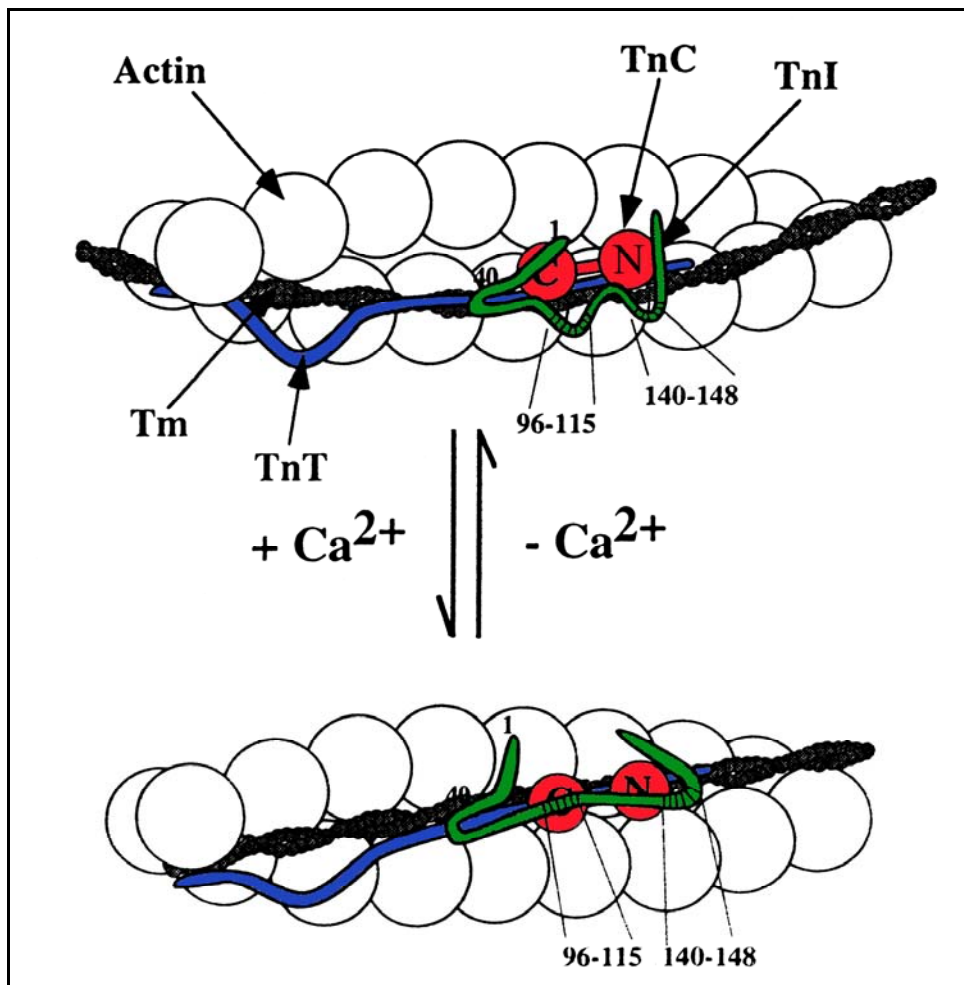


Figure 10 : Localisation de la troponine I en vert au sein du filament fin, en absence et présence de calcium. Les segments 96-115 (contenant la région Ip 104-115) et 140-148 interagissent avec l'actine. La TnI interagit également avec la TnC en rouge et la TnT (en bleu). Un changement conformationnel survient dans le complexe des troponines en présence de calcium. Le domaine amino-terminal de la TnC s'ouvre (voir figure 9) et expose des résidus hydrophobes qui vont interagir avec la TnI (116-131) ce qui supprime l'interaction entre le domaine Ip (104-115) de la TnI et l'actine, provoquant une interaction Ip- TnC (d'après Tripet et coll., 1997).

La séquence 135-181 est également impliquée dans l'interaction actine – Tm (Takeda et coll., 1997).

La séquence 96-148 présente une activité inhibitrice similaire à la TnI intacte (Tripet et coll., 1997). De plus, la séquence 140-148 correspondrait à un site de liaison au complexe actine-Tm. En l'absence de Ca^{2+} , la TnI exercerait donc un effet inhibiteur grâce aux séquences 140-148 et 104-115 par accrochage au filament d'actine bloquant le complexe Tm-Tn en état off.

La région amino-terminale possède également des fonctions importantes. La séquence 1-40 (peptide Rp) peut se lier à la TnC en absence de Ca^{2+} et est responsable de l'accrochage de la TnC dans la structure ternaire (Sheng et coll., 1992 ; Farah et coll., 1994 ; Potter et coll., 1995). Des séquences tronquées de Rp (1-30 ; 1-28 ; 1-26) montre que la séquence 1-30 de la TnI ne peut s'accrocher au filament d'acto-tropomyosine, ni avoir aucun effet inhibiteur de l'activité ATPasique de l'acto-myosine. La liaison de cette séquence de la TnI sur la TnC prévient la levée de l'inhibition de Ip sur l'ATPase acto-myosine par la TnC en présence de calcium. Une liaison forte s'établit entre ce peptide et le domaine carboxy-terminal de la TnC (Ngai et coll., 2001a et b). Une hélice centrale D/E intacte de la TnC est nécessaire pour que la TnC puisse libérer l'inhibition de la TnI sur l'activité ATPasique du complexe actine-S1 de myosine (Ngai et coll., 2001a et b). Ces études confirment également que la partie amino-terminale de la TnI interagit avec la partie carboxy-terminale de la TnC et inversement pour la terminaison carboxy-terminale de la TnI (Farah et coll., 1994 ; Ngai et coll., 2001b). La formation d'un complexe TnI-TnC modifie les interactions TnI-filament fin, de sorte que la TnI se dissocie de l'actine (Tao et coll., 1990). D'autre part, la liaison de la TnI 1-30 à la TnC augmente l'affinité calcique des sites à haute affinité de la TnC d'un facteur de 3 (Ngai et coll., 2001a).

La séquence 104-131 serait impliquée dans la liaison avec l'actine et plus précisément la séquence 104-115 (peptide Ip) et la séquence 116-131. La TnI tronquée (1-159) comme la TnI normale présente la même interaction vis-à-vis de la TnC, lorsque les 4 sites sont occupés par le calcium. Quand les sites régulateurs (I et II) sont libres et que les sites structuraux (III et IV) sont occupés par le Mg^{2+} , des différences notables sont mesurées entre la TnI tronquée et la TnI normale ce qui semble indiquer que la partie carboxy-terminale de la TnI pourrait jouer un rôle dans la régulation de la contraction du muscle strié suivant une interaction dépendante du calcium avec le domaine régulateur de la TnC (Digel et coll., 2001).

L'utilisation de mutants a permis de préciser les interactions existantes entre TnI, TnC et TnT (voir figure 11a et 11b). Le model proposé (Luo et coll., 2000 ; Li et coll., 2001) décrit qu'en présence de calcium, la séquence 1-33 de la TnI interagit avec le domain carboxy-terminal de la TnC, alors que la séquence 48-89 interagit avec la TnT, la séquence 90-113 avec l'hélice centrale de la TnC et la séquence 114-125 avec le domaine amino-terminal de la TnC. En absence de calcium, la séquence 114-125 s'éloigne de la terminaison amino-terminale de la TnC et entraine le déplacement des séquences 89-113 et 130-150 de la TnC vers l'actine.

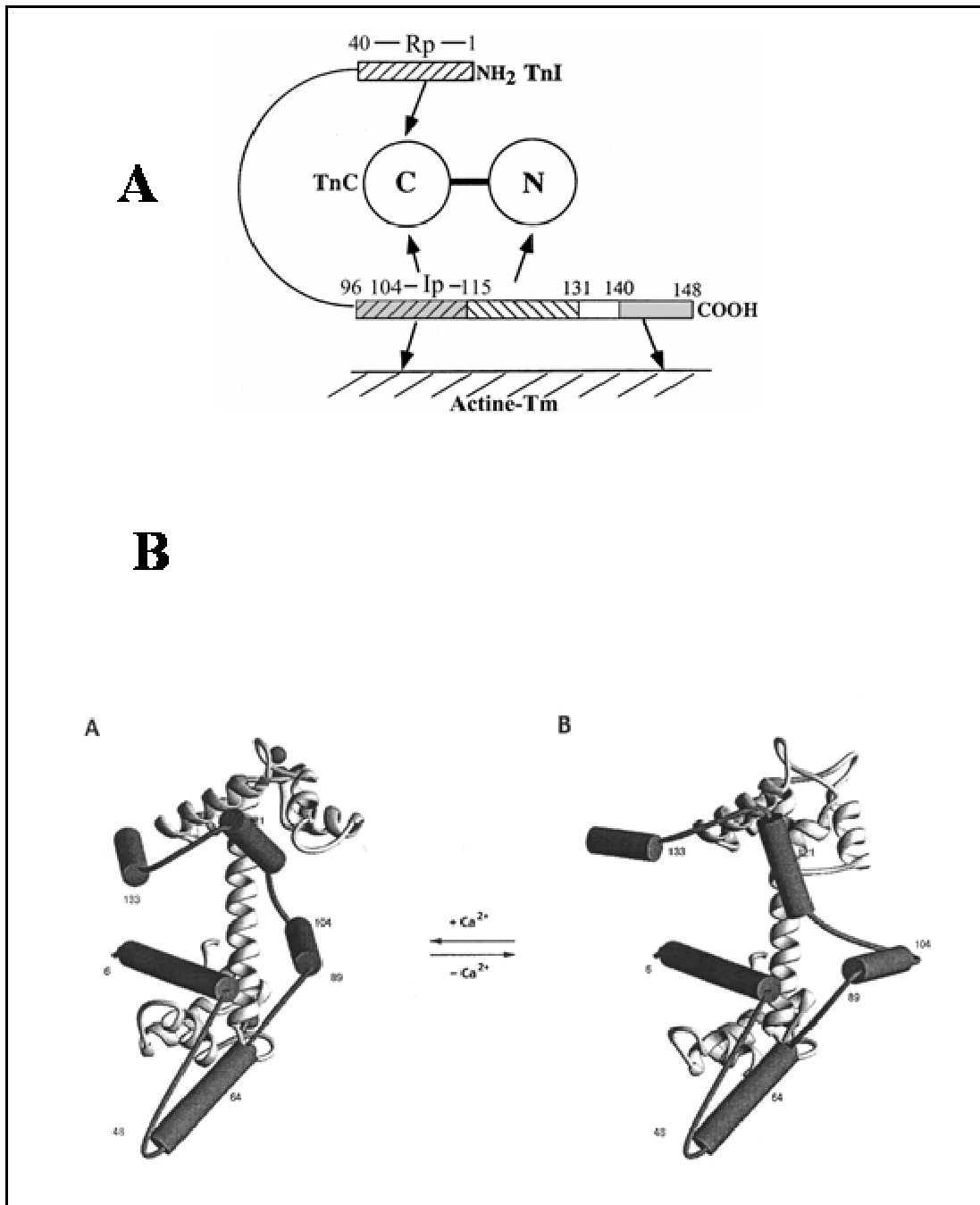


Figure 11 : Interactions TnI-TnC. Représentation schématique des interactions entre TnI et TnC et entre TnI et actine.

A- Le premier modèle présente les sites hachurés de liaison avec le TnC alors que les sites d'interactions avec l'actine sont grisés (d'après Tripet et coll., 1997).

B - Représentation schématique des interactions TnI-TnC-TnT. En présence de calcium (A), la séquence 1-33 interagit avec le domaine carboxyterminal de la TnC, la séquence 48-89 avec la TnT, la séquence 90-113 avec l'hélice centrale de la TnC, la séquence 114-125 avec le domaine carboxyterminal de la TnC et la séquence 130-150 avec l'hélice A de la TnC. En absence de calcium (B), la séquence 114-125 s'éloigne de la région aminoterminal entrainant un déplacement des séquences 89-113 et 130-150 de la TnC vers l'actine (Luo et coll., 2000).

Des études ont précisé la localisation du résidu 117 de la région carboxy-terminale de la TnI vis à vis de la TnC et de l'actine en présence de calcium. En présence de calcium cet acide aminé 117 est proche des hélices B et C (voir figure 11) de la partie amino-terminale de la TnC alors qu'en absence de calcium, il y a un déplacement de ce site de 8 Å. Ainsi, en absence de calcium, la région de la TnI (114-125) entraîne le mouvement des séquences 89-113 et 130-150 vers l'actine, sans réagir directement avec l'actine (Li et coll., 2001). Les domaines amino- et carboxy-terminaux de la TnI qui encadrent la région inhibitrice de la molécule (104-115) jouent un rôle important pour moduler la libération de la région inhibitrice de la TnI de la TnC, dépendante du calcium (Ngai et coll., 2001a). La TnI pourrait de plus interagir spécifiquement avec la Tm suivant une distribution périodique de 38 nm (Ohtsuki et Shiraishi, 2002).

I. E. 1. c - la troponine T (figure 12)

α - Structure

La troponine T est la troponine qui lie la tropomyosine aux autres sous-unités du complexe des troponines et joue donc un rôle central dans la régulation du filament fin par le calcium. C'est une protéine assymétrique de 31-36 kDa qui comporte une tête globulaire carboxy-terminale et une partie allongée amino-terminale.

Trois gènes codant respectivement pour la TnT cardiaque (Cooper et Ordahl, 1984), l'isoforme lente (Gahlman et coll., 1987) et rapide (Breitbart et Nadal-Ginard, 1986) du muscle squelettique ont été découverts. La structure primaire des isoformes de TnT cardiaque et squelettiques, lente et rapide, montre une très grande conservation de séquence. On distingue trois régions d'épissages alternatifs sur la chaîne polypeptidique de la TnT :

- un segment carboxy-terminal caractéristique de la TnT du muscle rapide codé par une paire d'exons mutuellement exclusifs,
- un segment central caractéristique de la TnT cardiaque,
- une région variable amino-terminale que l'on trouve pour les trois types de TnT.

β - Polymorphisme

De multiples isoformes de TnT sont présentes dans le muscle squelettique dont l'expression pourrait être corrélée aux propriétés physiologiques de chaque type de fibre (Wu et coll., 1994).

Toutes les expériences de séquençage réalisées jusqu'à aujourd'hui montrent que la taille des TnT varie de 223 à 305 acides aminés. Cette variation est principalement due à la région amino-terminale. Ainsi, la région amino-terminale est codée par des combinaisons diverses de multiples exons alternatifs et présente une séquence très diversifiée. A l'extrémité de cette région les 10-15 premiers acides aminés sont très acides (glutamate en majorité) et assez conservés entre les différentes isoformes (Breitbar et coll., 1985). Si trois isoformes de TnT lentes (sTnT) ont été mises en évidence chez la souris résultant d'un épissage alternatif des exons 5 et 6 dans la région amino-terminale (Jin et coll., 1998), seules deux isoformes, voire une seule, étaient jusque là considérées dans le muscle adulte de rat et de lapin (Härtner et Pette 1989 ; Sabry et coll., 1991a ; Krishan et coll., 2000). L'analyse par la technique de RNase protection assay semble indiquer que le gène humain codant pour la sTnT lente pourrait générer 3-4 transcripts qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence d'un insert court (33-48 nucléotides) dans les régions 3' et 5' (Gahlmann et coll., 1987 ; Samson et coll., 1994).

Cependant, 6 transcripts de sTnT chez le poulet ont récemment été décrites (Yonemura et coll., 2000) suggérant une hétérogénéité des sTnT plus grandes que celle rapportée jusqu'à présent. Ainsi, cinq isoformes de sTnT ont été mises en évidence : 2 isoformes prédominantes et trois isoformes mineures. L'expression des isoformes mineures varie d'un muscle à l'autre et durant le développement du muscle (Yonemura et coll., 2002)

La situation est plus complexe en ce qui concerne l'isoforme rapide de la TnT (fTnT) impliquant un épissage alternatif d'une paire d'exons de la terminaison carboxylique et de plus de 7 exons codant la région amino-terminale (Jin et coll., 2000). A partir de ces multiples combinaisons d'épissage, un nombre important de fTnT peut être généré. L'organisation moléculaire du gène de rat codant pour la fTnT montre sa capacité à produire 64 voire 128 transcripts différents par épissage alternatif (Breitbart et coll., 1985 ; Breitbart et Nadal-Ginard, 1987 ; Morgan et coll., 1993). 4-16 variants de fTnT de poulet ont pu être mis en évidence (Schachat et coll., 1995 ; Smillie et coll., 1988). 13 isoformes de protéines ont été identifiées chez la souris (Wang et Jin, 1998) et 11 isoformes l'ont été chez le poulet (Ogut et Jin, 1998). Cependant, seules 5 isoformes de fTnT ont pu être détectées puis séparées plus

finement en 18 isoformes par électrophorèse bidimensionnelle en gradient de pH non équilibré chez le lapin (Härtner et coll., 1989 ; Sabry et Dhoot, 1991b).

La finalité de cette hétérogénéité est encore très mal connue. Un rôle de ces différentes isoformes de TnT dans les conditions physiologiques normales et pathologiques est suspecté. Ainsi, il a été démontré qu'il existait un remplacement des isoformes de TnT acides par des isoformes de TnT basiques durant le développement des muscles cardiaque et squelettique (Jin et coll., 2000). L'inclusion ou l'exclusion d'exons codant pour la partie amino-terminale est responsable de cette transition pour le muscle squelettique (Wang et Jin, 1997). L'épissage alternatif génère des variants de terminaison amino- terminale présentant trois spécificités : la séquence, la taille et la charge.

Aucun pattern n'a pu être déterminé concernant les isoformes embryonnaires et adultes de fTnT. Ainsi les tailles des régions amino-terminales se recouvrent entre les TnT adultes et embryonnaires. Par contre, il existe un pattern clair d'expression des isoformes de TnT si l'on considère le pI. Il n'y a pas de superposition entre le pI des TnT embryonnaires et adultes. Les formes acides ont un pI de l'ordre de 5.04 à 6.11 quand les formes basiques présentent un pI de 8.85 à 10.06.

Les formes acides ne sont trouvées que dans le muscle néonatal et toutes les formes adultes sont basiques. Ce résultat semble indiquer que la charge de la région amino-terminale est un paramètre important intervenant dans les propriétés régulatrices de la TnT (Jin et coll., 2000).

Le pattern d'expression des isoformes de sTnT ne semble pas corrélé au développement musculaire (Jin et coll., 2000). L'expression des isoformes lentes de TnT est plus importante chez les gros mammifères puisque l'on observe de la sTnT dans des muscles rapides tels le diaphragme et le masseter chez le mouton. Par contre, la sTnT est exprimée exclusivement dans le soleus chez la souris (Jin et coll., 1998).

γ- Fonction (figure 12).

Des études de relation structure-fonction à l'aide de fragments de TnT ont permis d'identifier deux fragments fondamentaux dans l'activité fonctionnelle de la molécule. Le fragment T1 (1-158) de la région amino-terminale interagit avec la partie carboxy-terminale de la Tm, incluant la partie amino-terminale de la molécule de Tm adjointe dans la conformation tête-queue de l'assemblage du filament fin (Pato et coll., 1981 ; White et coll., 1987). En outre, la séquence TnT (160-193) se lie au domaine carboxy-terminal de la TnC en

présence ou absence de la séquence de la TnI (56-115) ou 96-139 contenant chacune la région inhibitrice primaire de la TnI. (Blumenschein et coll., 2001).

Un fragment T2 de la région carboxy-terminale (159-259) se lie à la région centrale de la Tm et interagit (Mak et Smilie, 1981; Morris et Lehrer, 1984) avec la troponine I et la troponine C et l'actine (Heeley et coll., 1987 ; Pearlstrone et Smillie, 1982 ; Perry, 1998). Cependant la TnT n'a pas qu'un simple rôle structural : elle semble également avoir un rôle modulateur ce qui expliquerait le pourquoi d'une telle diversité d'isoformes (Maytum et coll., 2002).

La TnT joue un rôle dans la régulation calcique de la contraction : il existe ainsi une corrélation entre la composition en isoformes de TnT et la sensibilité calcique des fibres squelettiques et cardiaques (Schachat et coll., 1987 ; Reiser et coll., 1992). Elle module les interactions TnI-TnC (Cheung et coll., 1987), en réduisant l'affinité de la TnC pour la TnI. La TnT peut augmenter l'activité ATPasique de la myosine en présence de Ca^{2+} (Greaser et Gergely, 1971, Farah et coll., 1994, Malnic et Reinach, 1994). Malnic et coll (1998) ont montré que la région amino-terminale de la TnT (1-191) pouvait reconstituer l'activation de l'ATPase en présence de calcium. Le fragment T1 est alors seul à interagir avec le filament d'actine : la dissociation du domaine globulaire libérerait la fonction activatrice du fragment 1-191. Cependant ces travaux semblent contredits par ceux montrant que la partie amino-terminale de la TnT inhibait l'activation du filament actine-tropomyosine-tête de myosine (Maytum et coll., 2002 ; Tobacman et coll., 2002). En absence de calcium, le domaine carboxy-terminal de la TnT est lié au domaine amino-terminal de la TnI et est responsable de l'ancrage du dimère TnC-TnI à la Tm (Jha et coll., 1996 ; Malnic et coll., 1998).

Le complexe des troponines est disposé tous les 7 monomères d'actine soit tous les 38.5 nm. Pourtant la liaison du Ca^{2+} sur le filament fin s'effectue de manière coopérative (Grabarek et coll, 1983). La tropomyosine peut propager l'information le long du filament fin et assurer une coopération basique. La présence de la région T1 est indispensable dans la propagation de la coopérativité (Schaertl et coll., 1995). Sa position au niveau de la zone de chevauchement des Tm, région hautement flexible (Phillips et coll, 1986) permet le contrôle de la flexibilité de la Tm (Gordon et coll., 2000). Des mesures effectuées sur fibres pelées ont permis de montrer que le degré de coopérativité dépendait des isoforms de TnT (Greaser coll., 1988, Nassar et coll., 1991). Ainsi, Schachat et coll (1987) ont démontré que les fibres exprimant de la TnT2f associée à de l' α - Tm possédaient la plus grande coopérativité..

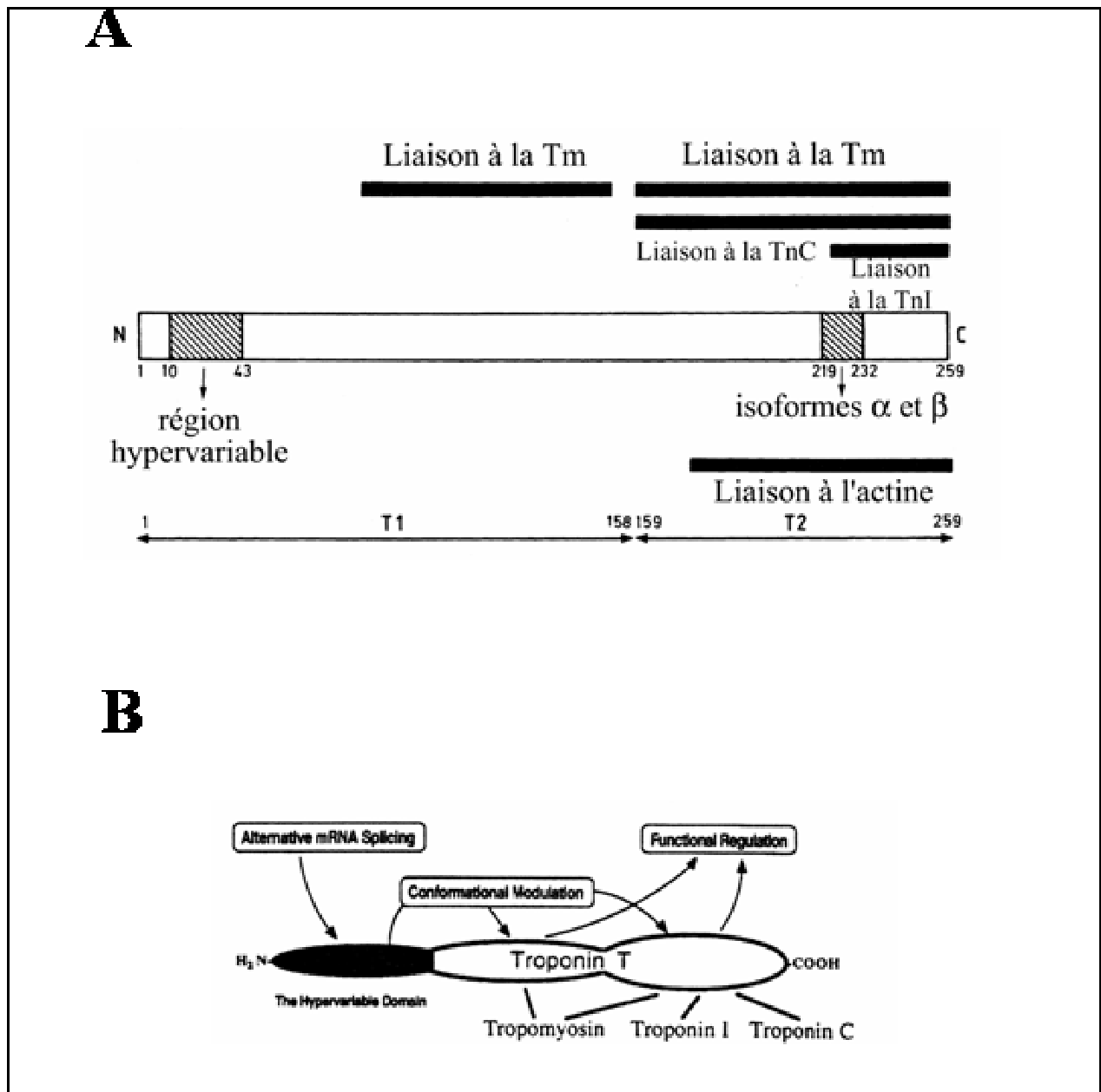


Figure 12 : Représentation schématique de la TnT squelettique rapide.

A - La TnT de lapin. Les régions hachurées correspondent aux régions variables entre les isoformes de TnT. Les lignes épaisses indiquent les régions d'interactions de la TnT et des protéines indiquées (d'après Perry, 1998).
 B - Rôles fonctionnels des différents domaines de la troponine suivant le modèle proposé par Jin et al. (2000). Les domaines d'interactions avec les autres protéines sont indiqués par des traits épais.

En absence de la partie globulaire de la TnT, la séquence amino-terminale (1-53) peut inhiber l'interaction actine-myosine (Tobacman et coll., 2002), ce qui semble indiquer que la partie amino-terminale de la TnT contribuent au positionnement de la Tm dans le domaine externe de l'actine, inhibant ainsi la contraction en absence de calcium. Ainsi, en utilisant des systèmes reconstitués, il a été montré que la partie amino-terminale de la TnT augmenterait

l'activité ATPasique de l'acto-myosine en présence de Tm (Malnic et coll., 1998). Cependant, le fragment 1-158 de la région amino-terminale peut inhiber l'activité ATPasique de l'acto-myosine (Maytum et coll., 2002). Ces différences pourraient être expliquées par les différences de séquences des parties amino-terminales des TnT, respectivement de poulet et de lapin, considérées dans ces études (Maytum et coll., 2002).

Des mutants ont été construits pour comprendre l'arrangement spatial de la TnT sur le filament fin en réponse à la liaison du calcium à la TnC (Kimura et coll., 2002). Ces résultats de fluorescence ont permis de démontrer que la TnT change sa position sur le filament fin au même titre que la TnI et donne lieu à trois états du filament fin: un état de relaxation, un état induit par le calcium ou état fermé, un état ouvert ou induit par la sous unité S1 de myosine (Kimura et coll., 2002).

La partie amino-terminale présentant des épissages alternatifs ne se lie à aucune autre protéine connue du filament fin. Des molécules de TnT avec délétion de la région variable amino-terminale garde leur activité dans l'activation calcium dépendante de l'ATPase acto-myosine (Fujita et coll., 1992; Pan et coll., 1991).

Cette région variable n'apparaîtrait donc pas essentielle à l'activité de la TnT dans la régulation de la contraction par le calcium. Pourtant des études ont montré des différences fonctionnelles entre des isoformes de TnT qui diffèrent dans la région amino-terminale variable. Ainsi les isoformes de TnT cardiaque les plus acides contribuent à une meilleure tolérance de la performance des myofibrilles à l'acidité (Solaro et coll., 1988). Des expériences testant l'effet du pH sur l'interaction des TnT avec la TnI et la Tm montrent que cette interaction est moins altérée en ce qui concerne les TnT acides que pour les TnT basiques (Ogut et Jin, 1998). L'essentiel des fTnT du muscle adulte étant de type basique, le changement d'expression des fTnT au cours du développement d'isoformes acides néonatales à des isoformes basiques pourrait jouer un rôle important d'adaptation de la machinerie contractile de la fibre musculaire à son environnement physiologique comme l'acidose (Ogut et Jin, 1998). D'autres part, des fTnT différant entre elles de part la charge de leur région amino-terminale confèrent à des fibres squelettiques de poulet des sensibilités calciques différentes (Ogut et coll., 1999 ; Wang et Jin, 1998). Ainsi, l'expression d'isoformes de TnT dans les fibres musculaires lente ou cardiaque plus acides que les isoformes de fTnT, conférerait à ces fibres leur plus grande résistance à l'acidité, ce qui semblerait indiquer que la région amino-terminale a un réel rôle fonctionnel (Jin et coll., 2000).

D'autres études vont également dans le sens d'un rôle structural et fonctionnel de cette région variable. L'implication de la région amino-terminale variable dans la conformation et

la flexibilité de la TnT a également été démontrée (Wang et Jin, 1998). L'ensemble de ces données concernant le rôle de la région variable amino-terminale peut être schématisée par le modèle proposé par Jin (2000, voir figure 12B).

I. E. 1. d - la troponine C (figure 13)

La troponine C (C pour calcium) joue un rôle majeur dans la régulation de la contraction par le calcium : cette protéine est une protéine calcium sensor capable de détecter les variations de calcium cytosolique et de lever l'inhibition causée par la TnI.

α - Structure (figure 13)

La TnC est une protéine de 18 kDa (Parmacek et Leiden, 1991 pour revue) appartenant à la famille des calcium binding protéines (CaBP, Kretzinger, 1980). Elle se présente sous la forme de deux têtes globulaires correspondant aux régions amino- et carboxy-terminales reliées par une hélice centrale (Hertzberg et coll., 1987; Satyshur et coll., 1988). Chaque domaine globulaire comporte deux sites de liaison pour le calcium de type EF-Hand. Chaque motif EF-Hand est constitué de deux hélices α (voir figure 13) orientées à 90°, reliées par une boucle de 12 acides aminés. Six acides aminés sont impliqués dans la coordination d'un ion calcium : leurs positions sont dénommées X, Y, Z, -X, -Y, -Z (voir figure 13C). Cinq d'entre eux font partie de la boucle centrale, et ont chacun une chaîne oxygénée libre. Le modèle de la TnC semble différent in situ par rapport au modèle proposé après cristallisation de la protéine, puisque les hélices D et E ne seraient pas colinéaires et que la région amino-terminale semblerait moins proche du domaine carboxy-terminal en absence de calcium que ce qui a été décrit précédemment (Ferguson et coll., 2003).

Aucune relation simple n'a pu être établie entre la séquence d'acides aminés de la boucle et l'affinité du domaine pour le Ca^{2+} , la séquence déterminerait seulement partiellement l'affinité et la spécificité (Marsden et coll., 1990). Au sein de la TnC, les 4 motifs EF-Hand ne sont pas identiques. La tête globulaire, carboxy-terminale possède 2 sites (III et IV) à haute affinité ($K_d : 2.10^{-2}\text{M}$) mais de basse spécificité qui sont occupés par le Mg^{2+} dans le muscle relâché (Zot et Potter, 1987). La tête amino-terminale possède deux sites à basse affinité ($K_d : 3.10^{-5}\text{M}$) mais à haute spécificité (Potter et Gergely, 1975). La liaison du Ca^{2+} sur le site I est énergétiquement moins favorable que sur le site II (Li et coll., 1997). La

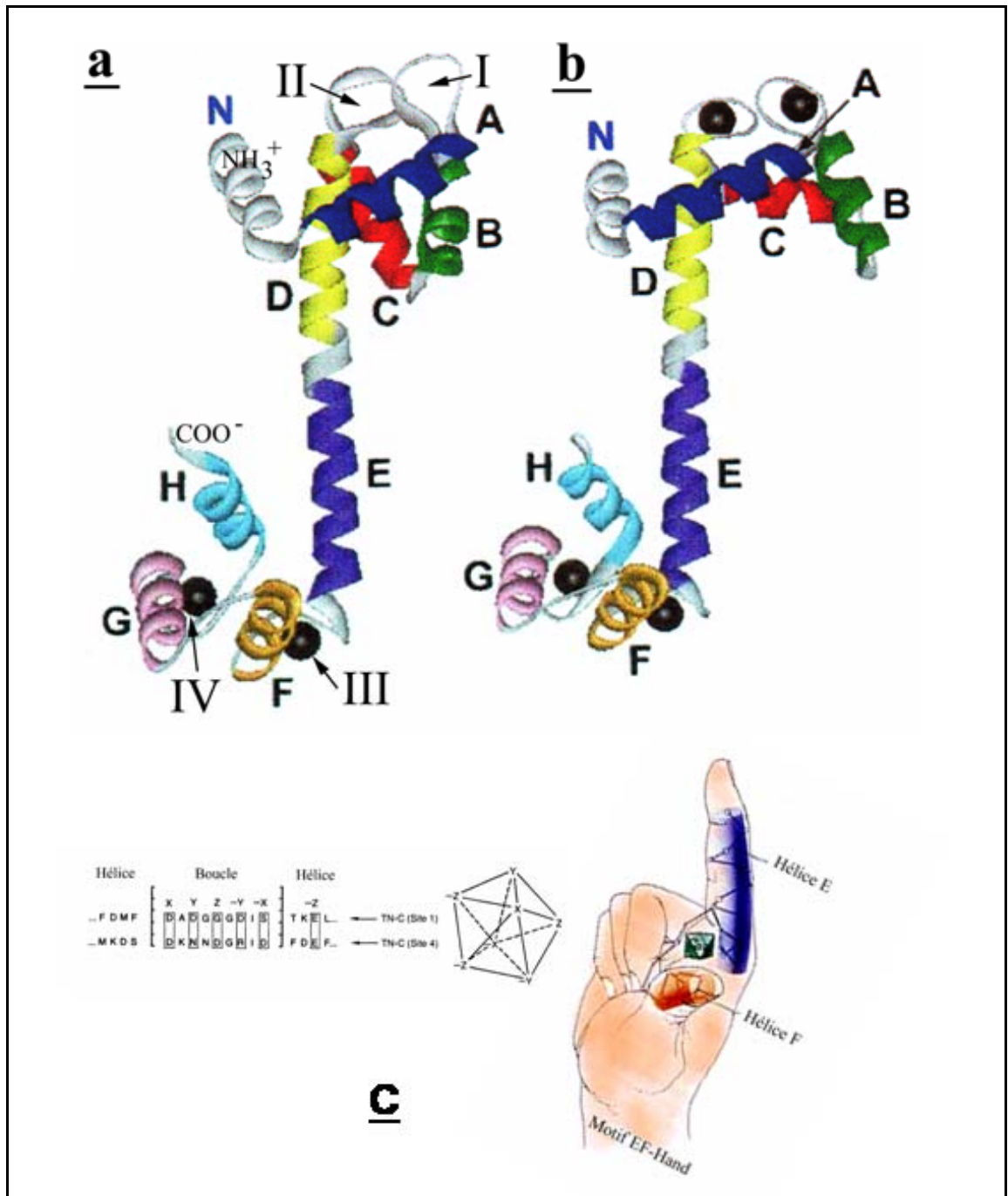


Figure 13 : Représentation de la structure cristalline de la TnC. A-H = hélices α . I-IV sites de fixation du Ca^{2+} (EF-Hand).

a - TnC squelettique de dindon avec 2 ions calcium liés sur les sites III et IV, le domaine amino-terminal étant en position fermée.

b - TnC squelettique de lapin. Tous les sites sont occupés. Noter la réorientation des hélices B et C par rapport aux hélices A et D correspondant à une conformation ouverte de la partie amino-terminale.

c - Description des motifs EF-Hand. L'index et le pouce représentent les hélices E et F, le majeur replié la boucle. L'ion Ca^{2+} est piégé au sein d'une structure polyédrique (bipyramide pentagonale). Le fragment de la

séquence d'acides aminés de la TnC impliqué dans la coordination du calcium dans les sites I et IV est représenté à gauche du modèle EF-Hand (modifié après Da Silva et Reinach, 1991).

stabilité de la TnC et son affinité pour le calcium sont modulées par l'hydratation de la protéine (Suarez et coll., 2003).

β- Polymorphisme

Trois isoformes de TnC ont pu être mises en évidence.

L'isoforme rapide du muscle squelettique ou fTnC est exprimée exclusivement dans les muscles rapides (Dhoot et Perry, 1979). Les isoformes lentes de TnC (sTnC) et cardiaques (cTnC), respectivement plus spécifiques du muscle squelettique et du cœur, sont identiques (Wilkinson, 1980).

Cette protéine est particulièrement bien conservée (95 % d'homologie de séquence entre souris et poulet, Parmacek et Leiden, 1991; Gahlman et Kedes, 1990) entre les espèces ce qui semble signifier que son rôle est fondamental. Il y a près de 70 % d'homologie entre la fTnC et la sTnC, les différences étant localisées dans les 40 premiers acides aminés. Ainsi, une insertion en position 28 et une double substitution d'acides aminés (Leu 29 – Asp 30 ; Ala 31 – Asp 32) rendent le site I non fonctionnel pour la sTnC (Van Eerd et Takahashi, 1975 ; Burtnick et Kay, 1977 ; Leavis et Kraft, 1978).

γ- Fonctions

La TnC est une protéine « Ca^{2+} -sensor » qui va détecter les variations cytosoliques de Ca^{2+} . Les mécanismes qui contrôlent la liaison du calcium ne sont pas clairement déterminés. En substituant individuellement 27 acides aminés avec un acide aminé polaire, la glutamine, afin d'examiner le rôle des séquences hydrophobes dans la liaison du calcium au niveau du domaine amino-terminal, on a pu démontrer que les résidus hydrophobes qui n'ont pas un rôle direct dans la liaison du Ca^{2+} peuvent jouer un rôle crucial dans le contrôle de la liaison et de l'échange du Ca^{2+} dans un système EF Hand. (Tikunova et coll., 2002).

En présence de concentrations physiologiques de calcium les sites III et IV de la TnC sont occupés par le Mg^{2+} . Le déplacement du Mg^{2+} de ces sites par le Ca^{2+} est un phénomène trop lent pour rendre compte du déclenchement de la contraction rapide (Iio et Kondo, 1980 ; Johnson et coll., 1979 ; Robertson et coll., 1981). Ces deux sites ont par contre un rôle structural important puisqu'ils permettent la cohésion du domaine carboxy-terminal de la TnC avec la TnI et la TnT (Potter et Gergely, 1975 ; Zot et Potter, 1982). Le site III est également déterminant dans le maintien de la stabilité structurale de la TnC au sein du

filament fin (Szczesna et coll., 1996), alors que le site IV n'apparaît pas essentiel bien que contribuant également à cette stabilité (François et coll., 1995 ; Szczesna et coll., 1996). Les sites I et II sont les sites régulateurs de la contraction. Ainsi des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de démontrer que les sites I et II étaient nécessaires pour l'activité complète de la fTnC (Sheng et coll., 1990).

La sTnC ne possédant pas de site I, la mutation du site II abolit la contraction (Putkey et coll., 1989). L'activation du site I favoriserait le processus de coopérativité ce qui semble indiquer que ce site ne fait que moduler le fonctionnement du site II. Les travaux présentés dans la partie Résultats précisent cette modulation (Kischel et coll., 2001).

Il n'y a cependant pas indépendance entre les sites régulateurs et structuraux. Ainsi l'inactivation des sites III et IV affecte la sensibilité des sites I et II vis-à-vis du Ca^{2+} tandis que la mutation des sites I et II diminue l'affinité de la TnC pour le filament fin (Szczesna et coll., 1996). La fixation du Ca^{2+} sur les sites régulateurs entraînerait un changement de conformation de la TnC (Herzberg et coll., 1986) (figure 13a et b). Le mouvement des hélices N, A et D par rapport aux hélices B et C permettrait une ouverture du domaine amino-terminal avec exposition d'une séquence hydrophobe, jusqu'alors non accessible au sein de la conformation fermée. Cette conformation du domaine amino-terminal saturé en Ca^{2+} présente une affinité pour la TnI (figure 11B).

Les données obtenues en résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de confirmer et de préciser ce modèle. Le site I jouerait un rôle important dans le changement conformationnel de la TnC (Li et coll., 1997). Le Ca^{2+} se fixerait d'abord sur le site II à l'affinité la plus forte. Cette liaison serait à l'origine des réarrangements structuraux permettant la liaison du Ca^{2+} au site I. Le site 29 de la TnC, proche du site I de liaison du calcium, modulerait de façon importante l'affinité du site I pour le calcium (Pearlstone et coll., 1992 ; Chandra et coll., 1994 ; Valencia et coll., 2003). L'influence de cet acide aminé n'est pas surprenante, puisque celui-ci est impliqué dans la formation de la séquence hydrophobe qui se trouve exposée lorsque la TnC passe de l'état fermé à l'état ouvert suite à la liaison du calcium sur le domaine amino-terminal (Valencia et coll., 2003).

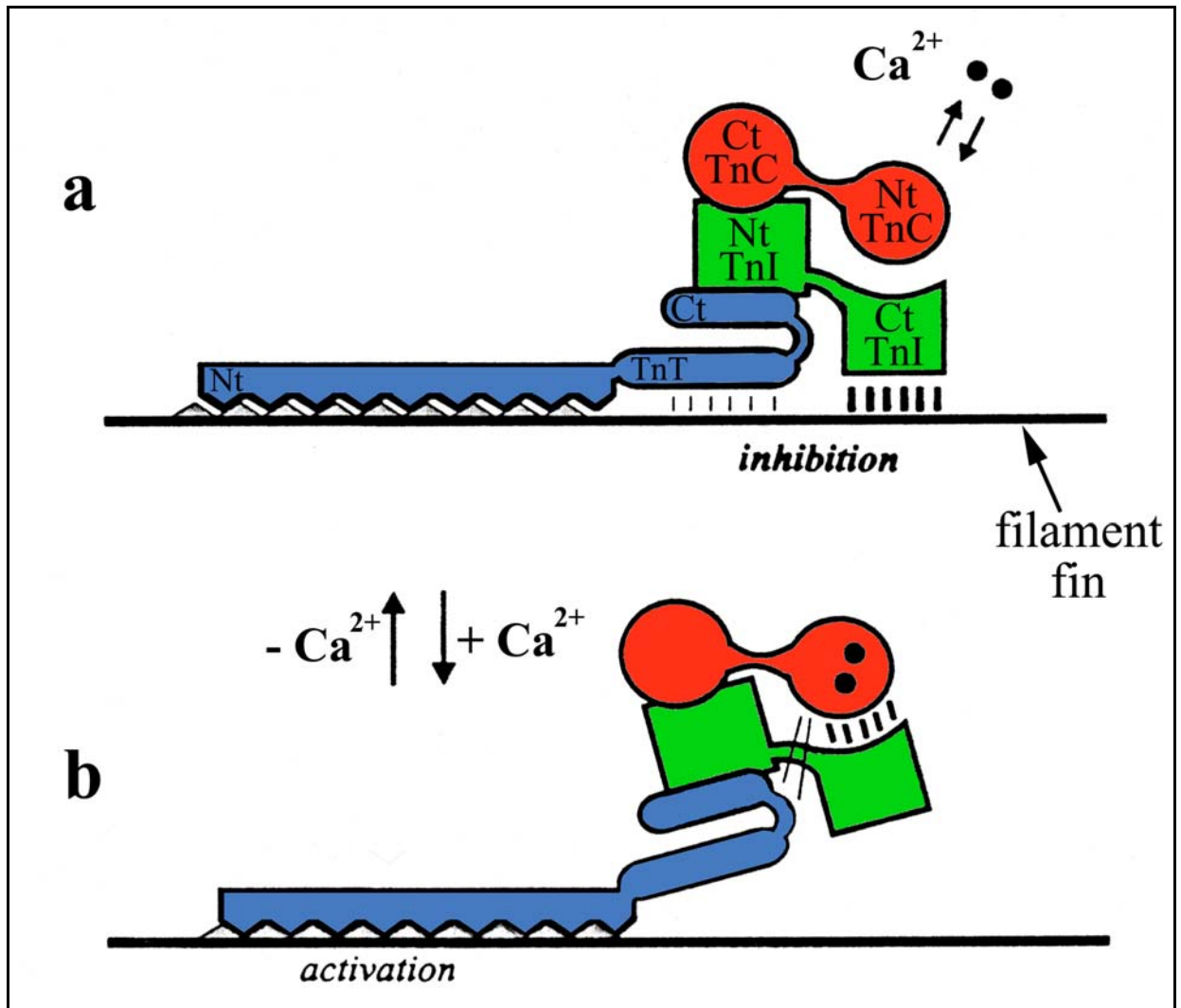


Figure 14 : Représentation schématique des interactions existantes entre la TnT (bleue), la TnI (verte), la TnC (rouge) et le filament fin d'actine-tropomyosine. La région amino-terminale de la TnI (1-58) interagit avec le domaine carboxy-terminal de la TnT (16-263) et le domaine carboxy-terminal de la TnC. Le fragment amino-terminal de la TnT interagit avec le filament fin. Ces interactions sont indépendantes du calcium et maintiennent la cohésion de l'ensemble du complexe. Les interactions dépendantes du calcium sont indiquées en noir (d'après Malnic et coll., 1998).

Le Ca^{2+} est fixé par les 5 chaînes oxygénées des acides aminés en position X, Y, Z, -X, -Y du site I. Lorsque le sixième acide aminé (Glut 41) vient coordonner le Ca^{2+} à l'aide de ses deux chaînes latérales, il induit un changement conformationnel et la protéine passe de l'état apo (sans Ca^{2+} lié) à l'état saturé. Ce changement de conformation démasque une séquence hydrophobe et induit l'interaction TnC-TnI. Ce rôle du site I implique que la sTnC pour laquelle ce site est non opérationnel va rester dans une configuration proche de la structure

fermée suite à la fixation du calcium sur le site II (Sia et coll., 1997). L'interaction TnC-TnI sera donc différente de celle existant dans le muscle rapide.

La TnC et la TnI sont deux protéines aux nombreux sites d'interactions (voir chapitre TnI). Le calcium induit une augmentation d'affinité entre les deux protéines (Wang et Cheung, 1985 ; Cheung et coll., 1987), mais les interactions peuvent dépendre ou non du Ca^{2+} . Une interaction indépendante du Ca^{2+} a été démontrée entre la région amino-terminale de la TnI et la région carboxy-terminale de la TnC (Farah et Reinach, 1995). En absence de Ca^{2+} le fragment 1-40 de la TnI serait lié à la région carboxy-terminale de la TnC. En présence de Ca^{2+} les fragments 104-115 (Ip) et 115-121 de la TnI (voir figure 11) se lient respectivement aux régions carboxy et amino-terminales de la TnC (McKay et coll., 1998 ; Tripet et coll., 1997, 2003, Ngai et coll., 2001a).

Un autre modèle proposé correspondrait à l'interaction de Ip et Rp sur un même site (Ngai et Hodges, 1992). Dans ce modèle, le fragment Ip déplacerait le fragment Rp (Olah et coll., 1994 ; Tripet et coll., 1997 ; Mercier et coll., 2000).

L'analyse des interactions entre TnC et diverses séquences de la TnI (séquence amino-terminale (1-40) et carboxy-terminales 96-115, 96-131, 96-139) permet de montrer, en présence de calcium ou de Mg^{2+} , que la région amino-terminale de la TnI interagit avec la TnC avec une haute affinité. Les autres séquences de la TnI peuvent se lier à la TnC et former un complexe ternaire stable avec la structure TnC-TnI(1-40). La liaison de Rp TnI à la TnC dépend de la présence du Ca^{2+} et des sites de liaison de la TnC pour 96-139 et 116-131. Ces résultats sont donc en accord avec le modèle proposé figure 9b où la partie amino-terminale de la TnI reste liée à la partie carboxy-terminale de la TnC en présence de forte ou basse concentrations de Ca^{2+} , alors que la partie régulatrice (96-139) module sa position entre le filament fin et les domaines de liaison carboxy- et amino-terminaux de la TnC jouant un rôle majeur dans la régulation de la contraction (Tripet et coll., 2003).

L'importance des sites régulateurs de la TnC dans la régulation de la contraction a pu être mise en évidence à l'aide d'expériences d'extractions de la TnC et de son remplacement, sur fibres musculaires isolées. Il a pu ainsi être établi que l'isoforme de TnC influait sur les caractéristiques d'activation calcique. Les caractéristiques d'activation calcique des fibres rapides reconstituées avec une TnC lente ou cardiaque deviennent typiques de celles des fibres lentes (Moss et coll., 1986), tandis que la TnC rapide confère aux fibres lentes des caractéristiques d'activation similaires à celles des fibres rapides (Babu et coll., 1987 ; Gulati et coll., 1988).

Dans les fibres lentes, la mutation de l'unique site fonctionnel II abolit la contraction (Putkey et coll., 1989). La restauration du site I confère des propriétés d'activation calcique similaires à celles des fibres rapides (Sweeney et coll., 1990), mais la contraction ne peut se faire si seul le site I est fonctionnel (Putkey et coll., 1989 ; Sweeney et coll., 1990).

Dans les fibres rapides, l'activation par le site I uniquement est possible, mais la tension que la fibre peut générer n'est plus que de 50 % voire en deçà (Sheng et coll., 1990 ; Putkey et coll., 1991). Si la fonction du site I est abolie, une tension est partiellement obtenue (Sheng et coll., 1990). Chaque site peut donc faire fonctionner la protéine mais les deux sites sont nécessaires à son fonctionnement optimal.

L'activation du muscle s'effectue par la fixation de Ca^{2+} sur la TnC. Néanmoins, d'autres cations divalents peuvent activer la machinerie contractile : Sr^{2+} (Kasai et Oosawa, 1968 ; Donaldson, 1975), Ba^{2+} (Saito et coll., 1992) et Cd^{2+} (Stephenson et Thieleczek, 1986). Les pX_{50} sont cependant spécifiques de l'ion (X) considéré. Sur fibres pelées, la comparaison de la sensibilité au Ca^{2+} et au Sr^{2+} permet de différencier les fibres lentes et rapides: ainsi, les fibres lentes ou cardiaques sont plus sensibles au Sr^{2+} que les fibres rapides (Kitazawa, 1976 ; Kerrick et coll., 1980), ce qui permet d'identifier rapidement le typage d'une fibre musculaire (Takagi et coll., 1978 ; Hoar et Kerrick, 1979 ; Fink et coll., 1986 ; Stevens et coll., 1993). La TnC est à l'origine de cette sensibilité différente des fibres lentes et rapides au Sr^{2+} , comme l'ont démontré de nombreuses expériences d'extraction-remplacement (Morimoto et Ohtsuki, 1988 ; Babu et coll., 1987, 1989 ; Sweeney et coll., 1990).

I. E. 2. Modélisation de la régulation de la contraction

- Le modèle de l'inhibition stérique et ses limitations

Il a été suggéré que le Ca^{2+} était nécessaire au mouvement de la Tm, celui-ci permettant le dégagement des sites de liaison de l'actine pour la myosine (Hitchcock et coll., 1973). Cependant ce modèle présente des limites. Ainsi, les têtes S1 de la myosine peuvent se lier à l'actine en absence de calcium, ceci à faible force ionique (Brenner et coll., 1984) comme à force ionique normale (El-Saleh et Potter, 1985). D'autres auteurs (Wagner et Giniger, 1981 ; Chalovich et Eisenberg, 1982) ont également rapporté que l'HMM et sa LC2 intacte se liaient à l'actine en absence de calcium. Ces expériences biochimiques indiquent donc que l'actine et la myosine peuvent interagir malgré le blocage stérique. Ainsi le complexe Tm-Tn ferait intervenir des contraintes de liaison et de cinétique (El-Saleh et coll., 1986).

- *Le modèle schématique de Lehrer.*

Geeves et coll (1987) ont proposé un modèle amélioré et modifié par la communauté scientifique (Mc Killop et Geeves, 1991 , 1993 ; Geeves et Lehrer, 1994). Ce modèle est de type coopératif/allostérique et se base sur un système à trois doubles états : les états « A » et « R » de la myosine, les états « off » et « on » de la tropomyosine, et les états +/- Ca^{2+} de la TnC. Dans ce modèle, la position de la Tm contrôle la régulation de la contraction : la balance « off-on » contrôle la transition de l'état faiblement lié (configuration A) vers l'état fortement lié des têtes de myosine sur l'actine (configuration R, figure 15). En absence de Ca^{2+} , la Tm inhibe l'isomérisation « A » \Rightarrow « R » mais n'empêche pas la fixation des têtes S1 en configuration « A » sur l'actine . Le nombre de ces liaisons faibles est cependant limité en absence de Ca^{2+} (McKillop et Geeves, 1993).

En présence de Ca^{2+} , l'état blocked n'existe plus (Head et coll., 1995). La TnI se détache de l'actine , débloquant ainsi les sites de liaison actine-myosine et permettant un grand nombre de configuration « A » . Dans le même temps la tropomyosine passe de l'état off à l'état on.

Cependant, en absence de S1, un système actine-Tm-Tn est en état off même en présence de Ca^{2+} , ce qui suggère que la liaison d'une faible proportion de S1 permet le mouvement de la tropomyosine. (Geeves et Halsall, 1987). Lorsque la tropomyosine est dans l'état on, les têtes S1 de myosine peuvent s'isomériser (de « A » vers « R »). Les ponts générateurs de force ainsi créés font coulisser les filaments fins et épais et permettent le raccourcissement du sarcomère. A concentrations élevées de têtes S1, le Ca^{2+} peut induire la contraction en facilitant la transition off \Rightarrow on induite par la liaison des têtes de myosines. Ce système est coopératif : si l'on définit par « n » le paramètre de l'unité coopérative, soit le nombre de sous unités d'actine sous le contrôle d'une tête S1, pour une tête S1 en configuration « R » liée, (n-1) têtes de S1 en configuration « A » peuvent s'isomériser. n étant égal à 11-12, l'unité coopérative est plus grande que l'unité structurale composée de 7 monomères d'actine, un complexe de Tn, un dimère de Tm (Geeves et Lehrer, 1994 ; Maytum et coll., 1999).

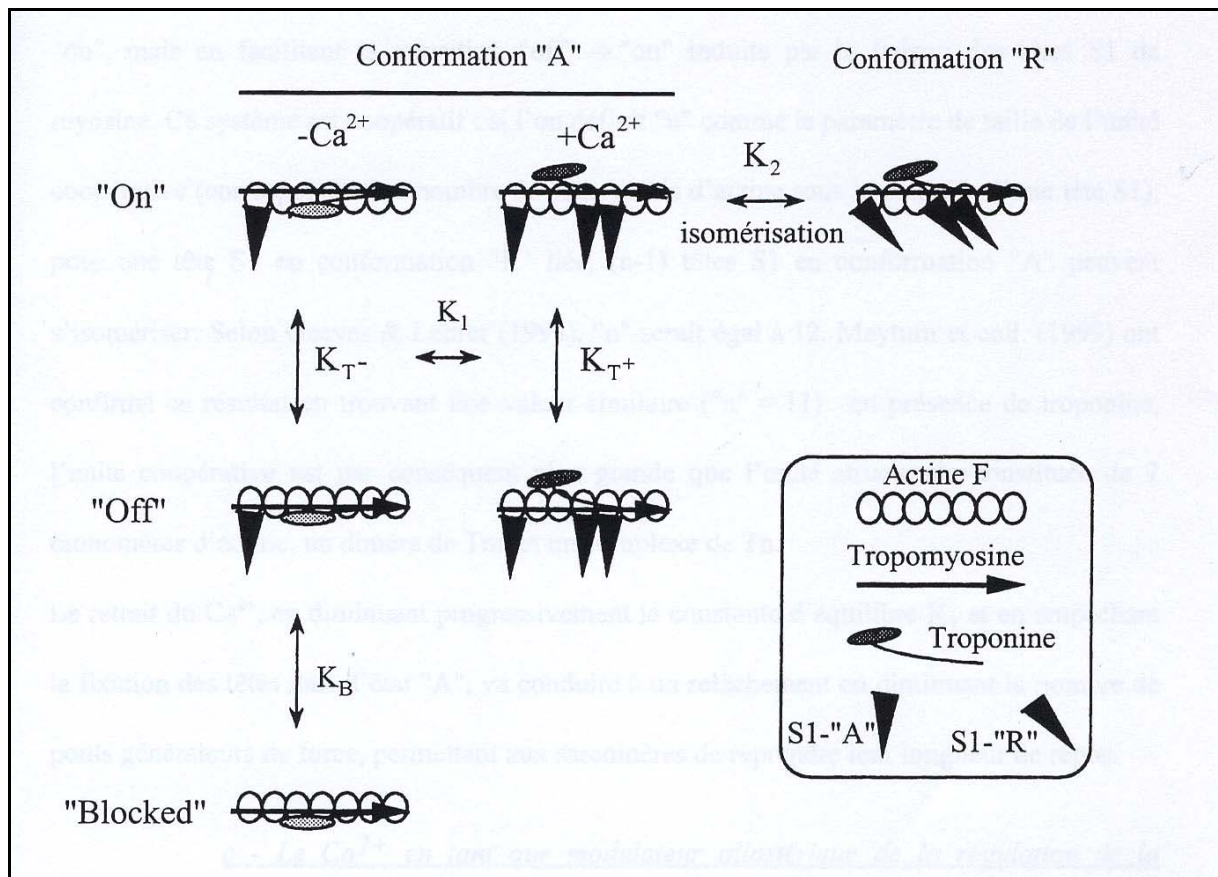


Figure 15 : Modèle schématique représentant les trois états (« on » / « off », +Ca²⁺/ - Ca²⁺, « A »/«R ») et leurs constantes d'équilibre. L'état blocked est un sous état de l'état « off ». K_B représente la constante d'équilibre « off » / « block ». La tropomyosine peut passer de l'état « off » / « on » suivant les constantes d'équilibres K_T en présence (+) ou absence (-) de calcium. Les conformations « A » et « R » des têtes S1 sont schématisées par des angles différents. K₁ représente la constante initiale de liaison des têtes S1 de myosine, K₂ la constante d'isomérisation « A » ↔ « R » des têtes S1 de myosine. En absence de Ca²⁺, le système est principalement dans l'état bloqué (K_T= 0.002). En présence de Ca²⁺, K_T est multiplié par 10 et K₁ augmente d'un facteur 3 (absence de l'état bloqué). Schéma modifié d'après Lehrer, 1994.

Le retrait du Ca²⁺, en diminuant la constante d'équilibre K_T et en empêchant la fixation des têtes dans l'état « A » va conduire à un relâchement, permettant aux sarcomères de reprendre leur longueur de repos.

- Le Ca²⁺ en tant que modulateur allostérique de la régulation de la contraction.

En solution, avec des systèmes reconstitués, le calcium n'est ni suffisant, ni nécessaire pour activer les filaments fins (Lehrer et Geeves, 1998). Les têtes S1, comme on l'a vu, sont nécessaires pour déclencher l'activation de la contraction (Gordon et coll., 1988 ; Millar et Homsher, 1990 ; Swartz et Moss, 1992). Ainsi, les têtes S1 peuvent déclencher leur propre

activité et le calcium facilitant ce processus. Ce mécanisme peut se comprendre si l'on considère le filament fin comme un système coopératif/allostérique (Hill et coll., 1980 ; Geeves et Halsall, 1987), acceptant les têtes S1 comme ligand. Ainsi, les têtes de myosine se fixent difficilement sur le filament fin dans l'état off et se fixe de manière coopérative au filament fin dans l'état on. L'actine peut être considérée comme une enzyme et le complexe S1-nucléotide (ATP ou ADP-Pi) comme le substrat. En absence de tropomyosine, l'actine se comporte comme une enzyme non-coopérative, et le système devient coopératif en présence de Tm (Mills et coll, 1976). Le Ca^{2+} représente alors l'activateur allostérique de notre système enzymatique (Lehrer et Geeves, 1998) qui change la constante d'équilibre K_T , et détermine le degré de facilité avec lequel la myosine peut activer le filament fin. La liaison du Ca^{2+} sur la TnC et la formation de ponts actine-myosine agissent donc en synergie pour activer le filament fin (Williams et coll., 1988 ; Popp et Maeda, 1993).

- Le couplage TnC-têtes S1 de myosine.

La TnC change de structure suite à la liaison du Ca^{2+} ce qui va entraîner une cascade d'événements provoquant la formation de ponts cycliques entre l'actine et la myosine. Les changements structuraux de la TnC sont associés à l'interaction actine-myosine. Il existe également une relation entre l'interaction actine-myosine et l'affinité calcique de la TnC. Ainsi en absence de calcium, la création de ponts de rigor entre l'actine et la myosine augmenterait l'affinité calcique de la TnC (Bremel et Weber, 1972 ; Güth et Potter, 1987 ; Hofmann et Fuchs, 1987). La liaison forte des têtes de myosine sur l'actine peut entraîner des changements dans la structure amino-terminale de la TnC (Zot et Potter, 1989). La TnC détecterait les changements structuraux de la myosine durant la génération de la force (Li et Fajer, 1998).

I. E. 3. Le canal de largage calcique du réticulum sarcoplasmique (figures 16-19)

Des mesures électrophysiologiques et l'utilisation du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et de techniques autoradiographiques ont permis de démontrer que le calcium était libéré des stocks internes du réticulum sarcoplasmique suite à une dépolarisation de la membrane du système tubulaire transverse. C'est ainsi que fut démontré (voir chapitre couplage excitation-contraction) l'existence d'un couplage direct entre le changement de conformation du DHPR et un canal calcique localisé au niveau des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique encore appelé récepteur à la ryanodine (RyR).

I. E. 3. a - Structure-fonction des RyR (figures 16-17)

α - Structure

Le RyR correspond à une protéine constituée de 4 sous-unités identiques de masse moléculaire de l'ordre de 560 kDa. La protéine fut clonée et séquencée en 1989 par Takeshima et coll.

Il existe trois isoformes de RyR présentant près de 70 % d'homologie (Hakamata et coll., 1992 ; Nakai et coll., 1990; Takeshima, 1993). L'analyse de la séquence primaire en acides aminés montre que la partie carboxy-terminale ainsi que la partie amino-terminale sont cytoplasmiques et que les domaines transmembranaires sont groupés près de la région carboxy-terminale (figure 16) (Shah et Sowdhamini, 2001 ; Takeshima, 1993 ; Zhao et coll., 1999). La structure tridimensionnelle du canal a pu être étudiée et reconstituée (figure 16). Le canal RyR₁ a ainsi une symétrie à quatre plans reflétant la conformation des 4 monomères (Radermacher et coll., 1994; Serysheva et coll., 1995; Wagenknecht et coll., 1989 ; figure16). Le canal présente un large domaine cytoplasmique qui forme le « foot » ou pied observé en microscopie électronique à la jonction STT-RS (Franzini-Armstrong, 1970) et un domaine transmembranaire qui refait saillie (Serysheva et coll., 1995 ; Wagenknecht et coll., 1989). Le domaine transmembranaire présente un orifice central qui peut être obturé par une structure ressemblant à une prise (Orlova et coll., 1996). Le nombre de segments transmembranaires est encore discuté de 4 (Hakamata et coll., 1992 ; Otsu et coll., 1990) à 10-12 segments (Takeshima, 1993 ; Zorzato et coll., 1990) qui correspond au modèle le plus couramment admis (figure 16). Cependant, l'utilisation d'anticorps dirigés contre différents épitopes du RyR serait plus en faveur du modèle à 4 domaines transmembranaires (Grunwald et Meissner, 1995).

Cette structure de RyR₁ est très voisine de celle de RyR₂ malgré l'existence d'hétérogénéités sans doute à l'origine de la spécificité des isoformes (Sharma et coll., 1998).

Des études en microscopie électronique ont également permis de localiser les sites d'interactions entre RyR et certains peptides comme la calmoduline, la FK binding protéine et l'imperatoxine (Wagenknecht et coll., 1997; Samsó et coll., 1999; figure 16).

Les segments transmembranaires suffisent pour obtenir un canal fonctionnel réincorporé dans une bicouche lipidique (Bhat et coll., 1997a et b). C'est au niveau des segments transmembranaires que se trouve le filtre de sélectivité du canal (Bhat et coll., 1997 ; Gao et coll., 2000 ; Zhao et coll., 1999).

Des sites de liaison pour certains ligands tels l'ATP, la caféine, le calcium et la calmoduline ainsi que des motifs de phosphorylations ont été définis au niveau de la partie amino-terminale qui correspond au pied du RyR ou foot (figures 16 et 17). Ainsi, la substitution de l'alanine 3882 par un glutamate modifie la sensibilité de RyR₃ vis-à-vis du calcium (Chen et coll., 1998) ce qui semble indiquer que cette région de la protéine est le calcium sensor. L'utilisation de chimères de RyR a permis de démontrer que la séquence 3720-5000 de RyR₁ était impliquée dans l'inactivation du canal dépendante du calcium (Nakai et coll., 1999). D'autres travaux semblent indiquer que les sites de modulation du canal par le calcium se trouvent au niveau de la région du foot (Bhat et coll., 1997a) et dans la région 1641-2437 (Bhat et coll., 1997b). La séquence 183-4006 serait également impliquée dans la liaison de la caféine (Bhat et coll., 1997a). D'autre part, l'échange de la séquence 4187-4628 de l'isoforme RyR₂ par la séquence spécifique de l'isoforme RyR₁ modifie la sensibilité du canal calcique RyR₂ à la caféine et au calcium (Du et coll., 1999 ; 2000). L'implication de RyR₁ dans certaines pathologies neuromusculaires (hyperthermie maligne, maladie du central core) a permis de démontrer que les mutations, principalement localisées dans la région amino-terminale (35-614) et une région centrale (2163-2458), étaient associées à des dysfonctionnements de la modulation du canal vis-à-vis de certains agonistes comme la caféine (Fill et Copello pour revue, 2002 , figures 16 et 17).

L'exploration de la relation structure-fonction du RyR par mutagenèse dirigée n'en est qu'à ses débuts. Elle est rendue difficile d'une part parce qu'il s'agit d'un canal intracellulaire, non accessible par les techniques de patch-clamp classique et nécessitant par conséquent d'isoler la protéine, et d'autre part à cause de la taille importante de la protéine qui rend sa manipulation génétique et la sélection des sites à muter plus compliquées que pour une protéine classique.

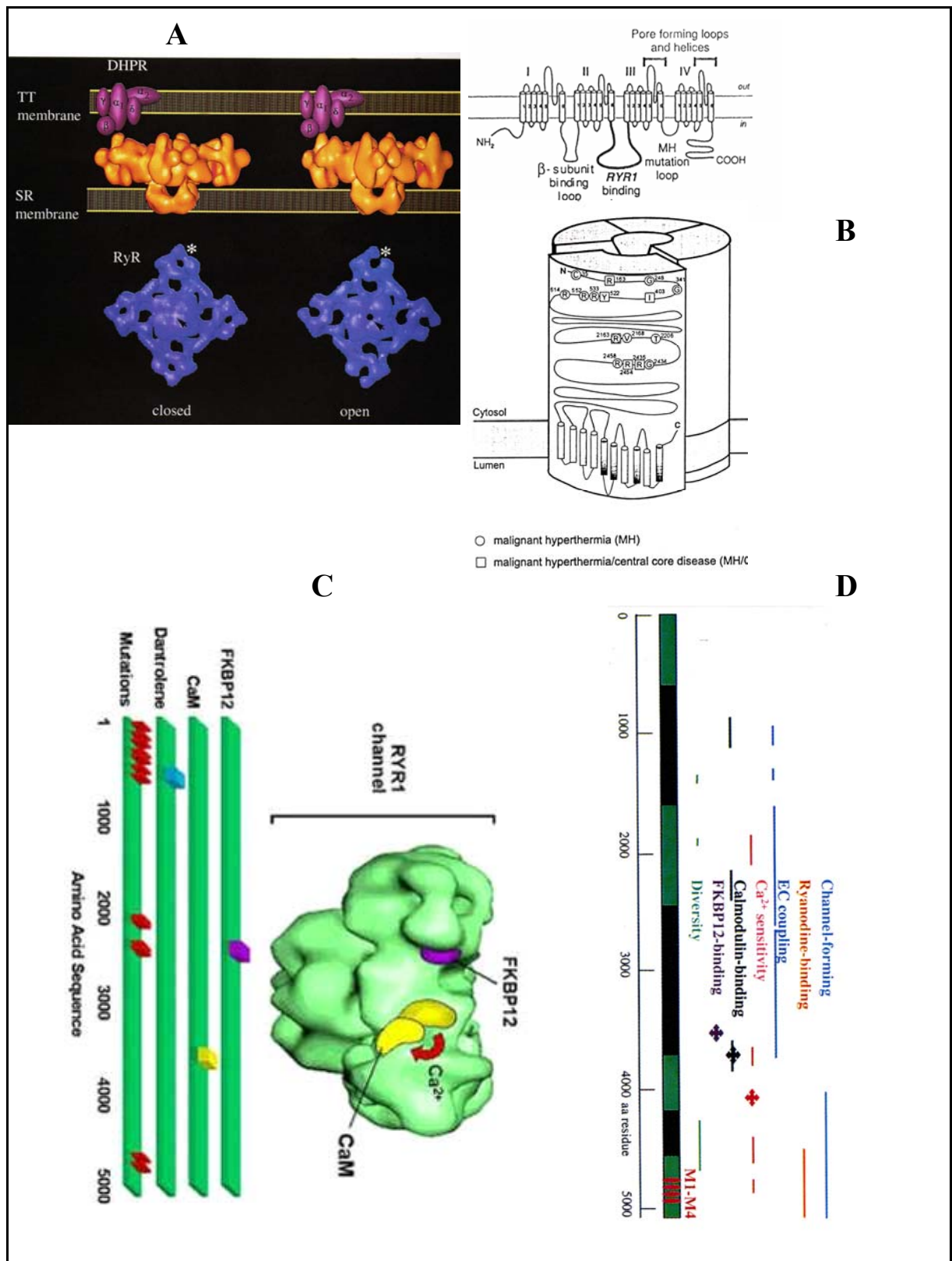


Figure 16 : Structure moléculaire du récepteur à la ryanodine.

A - Structure cristalline du récepteur à la ryanodine qui se présente sous forme d'un tétramère avec une importante région amino- terminale cytoplasmique correspondant au « pied » du canal, en association étroite avec le récepteur aux dihydropyridines (DHPR) composé de cinq sous-unités (α_1 , α_2 , β , γ , δ) qui se trouve localisé au niveau de la membrane du tubule transverse (TT membrane)

B - L'association DHPR et RyR₁ met en jeu plus particulièrement la boucle reliant les domaines II et III du DHPR (RyR₁ binding loop). Le RyR présente dix segments transmembranaires. De nombreux sites de mutation impliqués dans des pathologies neuromusculaires (hyperthermie maligne et maladie du central core) ont été décrits au niveau de la partie amino-terminale cytosolique.

C - De nombreux sites de régulation du canal se trouvent localisés au niveau du domaine amino-terminal cytosolique comme le montre cette association entre la structure tridimensionnelle et la séquence linéaire en acides aminés du canal RyR₁.

D - Localisation des principaux sites d'interaction et de régulation du canal RyR₁ sur la séquence linéaire d'acides aminés correspondant à RyR₁. Les séquences divergentes entre les différentes isoformes de RyR sont indiquées en vert. Les astérisques indiquent des mutations ponctuelles impliquées dans une modulation.

(Modifié d'après Wagenknecht et coll., 1989, Orlova et coll., 1996, Leong et McLennan, 1998).

β- Polymorphisme

Le clonage a permis de déterminer l'existence de trois isoformes de RyR chez le poisson, l'amphibien, les oiseaux ou les mammifères (Airey et coll., 1993 ; Coronado et coll., pour revue 1994 ; Mikami et coll., 1989 ; Nakai et coll., 1990 ; Sorentino et Volpe, 1993 ; Sutko et Airey, 1996).

Chez les mammifères, les 3 isoformes de RyR (RyR₁, RyR₂, RyR₃) sont codées par trois gènes différents localisés sur des chromosomes différents (Marks et coll., 1989 ; Mikami et coll., 1989 ; Takeskima et coll., 1989 ; Zorzato et coll., 1990). Trois régions particulièrement divergentes peuvent être discernées entre les différentes isoformes de RyR et être impliquée dans des différences physiologiques et pharmacologiques entre ces isoformes (Gianini et Sorentino, 1995). Le domaine D1 correspond à la séquence 4254-4631 contenant un domaine sensible au calcium (Chen et coll., 1998), le domaine D2 à la séquence 1342-1403 et le domaine D3 à la séquence 1872-1923 (figure 16). Ces protéines sont observées dans de très nombreux tissus bien que leur expression soit surtout très forte dans les muscles striés. Dans les muscles striés des mammifères, l'expression des isoformes de RyR est spécifique du tissu, RyR₁ étant le RyR prédominant dans le muscle squelettique, alors que RyR₂ est l'isoforme exprimée dans le muscle cardiaque.

L'isoforme RyR₃ fortement exprimée dans le tissu nerveux est également présente dans le muscle strié, plus particulièrement dans certains muscles squelettiques comme le diaphragme où elle représente moins de 5 % de l'expression de RyR et dans le muscle soleus (Froeming et coll., 2000 ; Gianini et coll., 1995 ; Murayama et Ogawa, 1992 ; Tarroni et coll., 1997). Peu de données dans la littérature concernent le rôle physiologique de RyR₃ ainsi que la modulation de son expression.

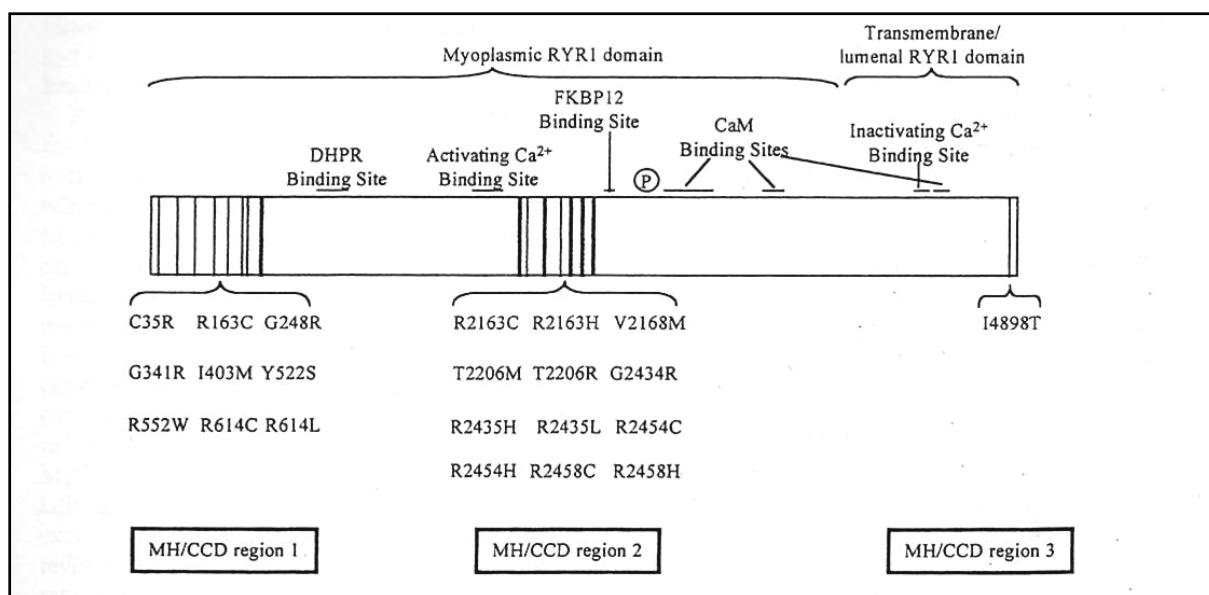


Figure 17 : structure de RyR₁ et sites de liaisons de certaines molécules régulatrices du canal. Les barres verticales représentent des sites de mutation pour deux pathologies neuromusculaires , l'hyperthermie maligne (MH) et la maladie du central core (CCD) (d'après McCarthy et coll., 2000).

Ainsi, des souris knock-out RyR₁ meurent pendant le développement embryonnaire (Takeshima et coll., 1995) alors que les souris knock-out RyR₃ survivent et présentent des muscles squelettiques normaux (Clancy et coll., 1999). Pourtant le couplage excitation contraction de fibre squelettique de souris nouveau née knock-out pour RyR₃ est modifié (Yang et coll., 2001). Il a été démontré dans les muscles exprimant uniquement RyR₁ que les foci correspondant à la région amino-terminale du RyR sont exclusivement localisés au niveau précis de la surface jonctionnelle du réticulum sarcoplasmique faisant face à la membrane du système tubule transverse.

Dans les muscles coexprimant RyR₁ et RyR₃, d'autres foci sont observés dans les régions latérales adjacentes au réticulum sarcoplasmique jonctionnel (Felder et Franzini-Armstrong, 2002). Une forte concentration de RyR₃ y est observée, suggérant que leur activation est indirecte au cours du couplage excitation-contraction (Felder et Franzini-Armstrong, 2002).

La nomenclature des RyR et la distribution des isoformes sont différentes dans les muscles striés des non-mammifères (grenouille, poulet, poisson). Ces muscles expriment en effet dans un rapport à peu près équivalent deux isoformes de RyR, l' α -RyR et le β -RyR, qui sont des homologues de RyR₁ et de RyR₃ respectivement (Airey et coll., 1993 ; Lai et coll., 1992 ; Murayama et Ogawa, 1992 ; O'Brien et coll., 1993; Sutko et Airey, 1996). La non

expression de l' α -RyR ne permet pas un développement normal du couplage excitation-contraction du muscle embryonnaire de poulet (Ivanenko et coll., 1995). L'isoforme β semblerait également jouer un rôle dans le couplage excitation-contraction (Sutko et Airey, 1996).

γ - Fonction

- Propriété de conductance du RyR

L'activité moléculaire de la protéine RyR peut être étudiée par la technique électrophysiologique de patch clamp après réincorporation du canal dans une bicouche lipidique artificielle. Le canal peut être réincorporé à partir de vésicules isolées par des techniques de centrifugations différentielles ou après purification de la protéine canal. Il est à noter que les conditions expérimentales les plus souvent utilisées sont différentes des conditions physiologiques qui existent de part et d'autre du canal. Ainsi, le fonctionnement du RyR dans une bicouche lipidique n'est pas forcément exactement le reflet de ce qui se passe *in vivo*.

Le canal RyR est perméable à différents ions monovalents et divalents (pour revue, Coronado et coll., 1994). La conductance du canal est couramment > 500 ps pour un courant d'un ion monovalent avec une courbe courant-potentiel linéaire (Smith et coll., 1986).

Dans des conditions expérimentales assymétriques et lorsque le courant est porté par un ion divalent (50 mM Ca^{2+} par exemple), la conductance du canal est de l'ordre de 100 pS (Tinker et Williams, 1992). Cette grande conductance permet dans les conditions physiologiques un passage rapide et important d'ions Ca^{2+} . Le canal présente peu de sélectivité entre les ions monovalents ainsi qu'entre les ions divalents. Par contre, le canal est plus spécifique des cations que des ions monovalents ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{K}} \approx 6$). Dans les conditions physiologiques, la conductance du canal pour le calcium sera inférieure à celle mesurée en bicouche du fait de la compétition entre le calcium, le potassium et le sodium (Rousseau et coll., 1987, Tinker et Williams, 1992).

- Vue générale des régulations du RyR (Figures 16-18)

De nombreux facteurs peuvent moduler le RyR : des agents physiologiques et de nombreux processus cellulaires voire des agents pharmacologiques.

- Agents physiologiques

- *le calcium* : l'action du calcium sur le canal RyR est complexe. Le calcium peut à la fois activer et inhiber le canal en fonction de sa concentration et de l'isoforme de RyR. Cette modulation de l'activité de RyR₁ répond à une courbe en cloche, le canal étant activé à des concentrations micromolaires et inhibé pour des concentrations millimolaires, bien qu'une certaine hétérogénéité de la réponse de RyR₁ en fonction de la concentration calcique a par ailleurs été reportée (Copello et coll., 1997 ; Ma, 1995). Cette régulation par le calcium met en jeu des sites de haute affinité et des sites de basse affinité, responsables respectivement de l'activation et de l'inhibition du canal.

L'inhibition de l'activité des isoformes de RyR par le calcium présente également une hétérogénéité, RyR₁ étant inhibé pour 1 mM Ca²⁺ (Liu et coll., 1989) alors que des concentrations supérieures (2 à 10 mM) sont nécessaires pour inhiber RyR₂ et RyR₃ (Chen et coll., 1997; Schiefer et coll., 1995), concentrations calciques qui ne sont pas forcément atteintes dans les cellules.

Une régulation de l'activité de RyR par le calcium de la lumière du réticulum sarcoplasmique (RS) a également été démontrée (Ching et coll., 2000 ; Herrmann-Frank et Lehmann-Horn, 1996; Sitsapesan et Williams, 1995b ; Tripathy et Meissner, 1996). Cette régulation pourrait mettre en jeu des protéines associées au canal comme la calsequestrine (Beard et coll., 2002) ou la junctine (Zhang et coll., 2001) ou des sites cytoplasmiques (Tripathy et Meissner, 1996).

- *l'ATP et le Mg²⁺* :

L'ATP cytosolique est un activateur direct du canal RyR (Copello et coll., 2002 ; Smith et coll., 1985 ; Xu et coll., 1996) alors que le Mg²⁺ est un inhibiteur du canal (Coronado et coll., pour revue, 1994 ; Laver et coll., 1997). Cette inhibition du Mg²⁺ impliquerait deux mécanismes indépendants : le Mg²⁺ entrerait en compétition avec le calcium pour le site d'activation calcique, puis diminuerait la sensibilité du canal au calcium, au niveau du site d'inhibition (Copello et coll., 2002 ; Laver et coll., 1997).

- *Etat Redox* :

De nombreux processus redox peuvent moduler l'activité du canal et mettent en jeu les nombreuses cystéines de la molécule. Ainsi les molécules oxydantes ou réductrices modifient l'activité du canal unitaire (Feng et coll., 1997; Marengo et coll., 1998; Oba et coll., 2002 ;

Xia et coll., 2000). Il a été suggéré que le NO peut moduler la régulation redox de RyR (Hart et Dulhunty, 2000).

- *ADP-ribose cyclique* :

l'ADP-ribose (ADPr) cyclique joue un rôle fondamental dans les tissus non-musculaires (Lee, 1997). l'ADPr cyclique (cADPr), un métabolite du NADP peut libérer le calcium intracellulaire sans doute par l'intermédiaire d'un RyR (Sitsapesan et Williams, 1995a; Lee, 1997). Cependant, l'activation directe de RyR₁ par le cADPr et ses métabolites est très controversée, certaines études démontrant un effet activateur du seul cADPr (Morrissette et coll., 1993) quand d'autres études semblent indiquer que le cADPr et ses métabolites peut activer RyR₁ à des concentrations millimolaires de calcium (Sitsapesan et Williams, 1995) ou bien être sans aucun effet (Copello et coll, 2001; Fruen et coll., 1994).

Ces résultats pourraient résulter des conditions expérimentales et/ou de la présence de certaines protéines associées au RyR (calmoduline, FK 506 binding protéin).

- *Phosphorylation/déphosphorylation du canal* :

Plusieurs sites du RyR sont des sites potentiels de phosphorylation (Takeshima et coll., 1993 ; 1989 ; Coronado et coll., 1994). La PKA est capable d'activer RyR₁ (Sonnleitner et coll., 1997) bien que des expériences réalisées sur des fibres isolées ne confirment pas ce résultat (Blazev et coll., 2001). De même des résultats contradictoires concernant l'effet de la calmoduline kinase ont été rapportés (Hermann-Frank et Varsanyi, 1993 ; Fill et Copello, 2002 pour revue ; Wang et Best, 1992).

• Agents pharmacologiques

Des substances comme la caféine, le 4 chloro-m-crésol sont des activateurs du RyR, utilisés dans le cas d'études de dépistages de certaines pathologies comme l'hyperthermie maligne. Le rouge de ruthénium ou la procaïne inhibent l'activité du canal (Fill et Copello, 2002, pour revue).

- Régulation du canal RyR par les protéines associées (figure 16-18)

De nombreuses protéines sont associées au RyR dans le muscle squelettique : des co-protéines comme la calmoduline et la protéine FKBP12 liant la protéine FK506 (Ahern et coll., 1994 ; Timerman et coll., 1993 ; Wagenknecht et coll., 1997) et des protéines associées telles la triadine, la junctine, la calsequestrine (Beard et coll., 2002 ; Zhang et coll., 1997).

- *La calmoduline (CaM) :*

Ce fut une des premières démonstrations de la modulation de RyR par une protéine associée (Smith et coll., 1989). La calmoduline est une protéine ubiquitaire (17 kDa) liant le calcium dans ses 4 motifs de type EF-hand et modulant l'activité de RyR₁. Chaque tétramère de RyR fixe 4 molécules de CaM en présence ou absence de Ca²⁺ (Moore et coll., 1999 ; Samsó et Wagenknecht, 2002 ; Yamaguchi et coll., 2001). Les sites de liaison de l'apocalmoduline (c'est-à-dire sans calcium lié ou apo-CaM) et de la Ca²⁺-CaM sont très proches, cytoplasmiques à 10 nm de l'entrée du pore du canal au niveau de la séquence 3614-3643 pour RyR₁ (Wagenknecht et coll., 1997 ; Yamaguchi et coll., 2001 ; Samsó et Wagenknecht, 2002). Cette liaison n'est pas essentielle à l'activation de RyR₁ par le détecteur de voltage (O'Connell et coll., 2002). La CaM se lie à RyR₁ à des concentrations nanomolaires et micromolaires de calcium. L'apo-CaM est un activateur de RyR₁ alors que le complexe Ca²⁺-CaM est un inhibiteur de RyR₁. Cette conversion de la CaM d'un état activateur à un état inhibiteur met en jeu la liaison du calcium aux deux sites de la région carboxy-terminale de la calmoduline (Tang et coll., 2002). Il est possible d'inverser cet effet par la suramine qui déplace les deux formes de calmoduline et induit une inhibition de l'activité du canal à de faibles concentrations de calcium et une activation à de fortes concentrations de calcium (Papineni et coll., 2002). Seuls des effets inhibiteurs de la CaM sur RyR₂ ont été décrits.

- *La calséquestrine :*

La calséquestrine est une calcium binding protéine du RS qui présente de nombreux acides aminés acides qui permettent la liaison du calcium (Yano et Zarain – Herzberg, 1994). Chez le mammifère, deux gènes codant pour la calséquestrine cardiaque et squelettique ont été identifiés (Fliegel et coll., 1987 ; Scott et coll., 1988). La calséquestrine lie le calcium avec une grande capacité mais une affinité modérée (K_d= 1mM). Sa fonction serait de tamponner le calcium au niveau du RS jonctionnel. Des agrégats de calséquestrine ont pu être mis en évidence par microscopie électronique au niveau des citernes terminales du RS

(Franzini-Armstrong et coll., 1987). La calséquestrine serait un activateur potentiel du RyR (Kawasaki et Kasai, 1994) mais pourrait nécessiter la présence de protéines associées comme la triadine (Zhang et coll., 2001). Les changements de conformation de la calséquestrine provoqués par le calcium ou le pHi pourraient participer à la modulation de l'activité du RyR (Hidalgo et coll., 1996). Inversement, il a également été montré que la calséquestrine peut inhiber l'action du RyR (Beard et coll., 2002).

- *FK506 Binding Protein:*

Les protéines FKBP12 et FKBP12.6 récepteurs des molécules immunosuppressives FK506 et rapamycine (Ahern et coll., 1994), s'associent avec les isoformes de RyR dans des proportions stoechiométriques (Fill et Coppel, 2002 pour revue) : ainsi, 4 FKBP_s se lient à chaque canal au niveau d'une région proche de la CaM (Wagenknecht et coll., 1997). Cette liaison peut se faire dans les cellules musculaires du fait de l'abondance de FKBP12 dans le cytoplasme (Marks, 1996 ; Timmerman et coll., 1993). Il a été démontré que le fait d'enlever la FKBP12 active RyR₁ (Ahern et coll., 1994 ; Brillantes et coll., 1994) alors que cet effet est moins clair en ce qui concerne RyR₂ avec l'apparition d'états de sous conductance. Ce résultat suggère que la FKBP12 a un effet stabilisateur sur le canal. Cependant d'autres travaux semblent montrer que le canal purifié ne présente pas de niveau de sous conductance malgré l'absence de FKBP (Jeyakumar et coll., 1998). Des travaux récents suggèrent que les FKBP synchronisent l'activité de RyR adjacents (Marx et coll., 1998). Ainsi, le fait d'enlever la FKBP12 sur des fibres squelettiques pelées découple l'interaction DHPR - RyR (Lamb et Stephanson, 1996). Cette protéine pourrait jouer ainsi un rôle de coupleur entre les deux protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction. L'importance de cette protéine est évidente puisque que des animaux déficients en FKBP 12 meurent à l'état embryonnaire (Shou et coll., 1998), même si l'intégrité du muscle squelettique n'est pas altérée.

- *DHPR :*

Cette interaction est à la base du couplage excitation-contraction (voir chapitre excitation-contraction (figures 16 et 19).

- *La triadine :* La triadine est une protéine de 95 kDa qui se trouve au niveau de la membrane des citernes terminales du RS du muscle squelettique et du cœur (Guo et coll., 1996 ; Knudson et coll., 1993a, b). C'est une glycoprotéine formée d'un segment transmembranaire, d'un court domaine amino-terminal cytoplasmique et d'une importante

terminaison carboxy-terminale dans la lumière du RS. Dans le muscle squelettique, la triadine servirait de protéine d'ancrage pour la calséquestrine et permettrait l'interaction entre le RyR et la calséquestrine (Caswell et coll., 1991 ; Franzini-Armstrong et coll., 1987 ; Guo et Campbell, 1995).

Une autre protéine de 25 kDa, la junctine, qui serait liée à la calséquestrine et à la triadine a été mise en évidence dans le muscle squelettique (Kagari et coll., 1996). Cette protéine correspondrait à la protéine de 26 kDa mise en évidence dans le cœur (Jones et coll., 1995).

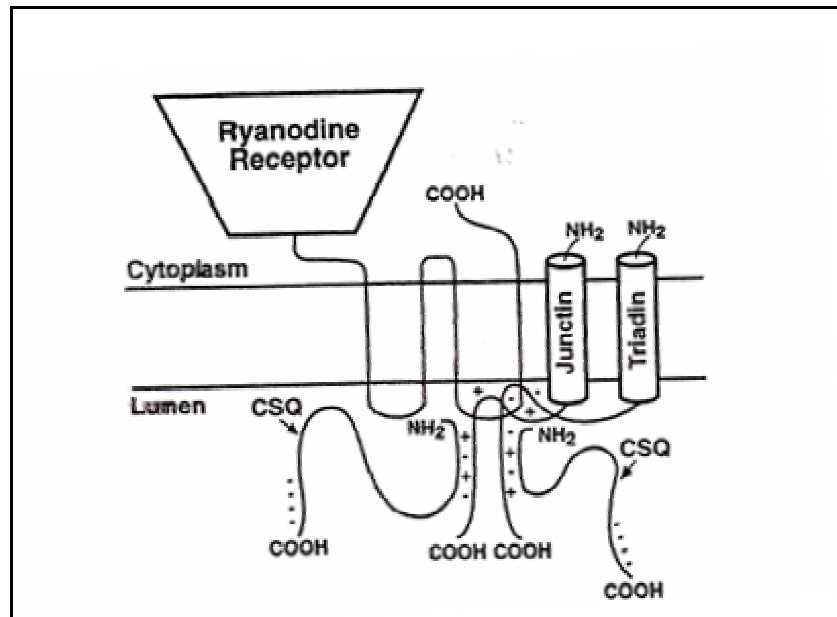


Figure 18 : Schéma représentatif des différentes protéines associées au RyR₁.

Les interactions de la région Carboxy-terminale de la junctine et de la triadine avec la boucle intraluminale du RyR sont hypothétiques.

II Couplage excitation-contraction (figures 19 et 20)

La contraction musculaire résulte d'une succession d'événements cellulaires encore appelés cycle excitation-contraction-relaxation ou ECR. Les événements majeurs dans ce cycle ECR comprennent :

- i) l'initiation et la propagation d'un potentiel d'action le long de la membrane plasmique et du système tubule transverse (STT) ;
- ii) la transmission de la dépolarisation du STT à la membrane du réticulum sarcoplasmique ou RS ;

- iii) la libération des ions calcium (Ca^{2+}) stockés dans le RS via le récepteur à la ryanodine ;
- iv) l'augmentation transitoire de la concentration en calcium myoplasmique ;
- v) la détection de cette élévation du calcium par une protéine calcium-sensor, la troponine C (TnC) ;
- vi) l'activation du système régulateur de l'appareil contractile entraînant la formation de ponts actine-myosine ;
- vii) la dissociation du Ca^{2+} de la TnC ;
- viii) le recaptage du Ca^{2+} dans le RS grâce à l'action de la pompe calcique ATPasique du RS (SERCA).

Les interactions entre un récepteur, le récepteur aux dihydropyridines (DHPR), localisés dans la membrane du système tubule transverse et le RyR sont à la base du processus de couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique et cardiaque. Le DHPR est le détecteur de voltage (voltage sensor) du couplage excitation-contraction qui va informer le RyR de l'existence d'une dépolarisation de la membrane tubulaire. Diverses expériences ont démontré que le DHPR était le détecteur de voltage du couplage excitation-contraction : ainsi, l'enregistrement d'un courant capacitif ou mouvements de charges asymétriques, correspondant au changement de conformation d'une protéine sensible au voltage, présente dans la membrane du système tubule transverse (Schneider et Chandler, 1973), fut un pas important dans la compréhension du rôle du DHPR dans le couplage ECC (Brum et Rios, 1987 ; Hui et coll., 1984 ; Lamb, 1986 ; Luttgau et coll., 1987).

Le mécanisme moléculaire du couplage excitation-contraction est fondamentalement différent entre le muscle squelettique et le muscle cardiaque. En effet, une interaction physique entre le DHPR et le RyR est nécessaire dans le cas du muscle squelettique et ne nécessite pas une entrée de calcium extracellulaire (Armstrong et coll., 1972 ; Dulhunty et Gage, 1988), sauf au cours du développement (Cognard et coll., 1993). Par contre, le largage du calcium via le RyR dans la cellule cardiaque est initié par une activation calcique ayant pour origine l'entrée de calcium via le DHPR. Cependant de récents travaux semblent indiquer qu'il existe un couplage physique direct ou indirect entre le DHPR et le RyR dans le muscle cardiaque.

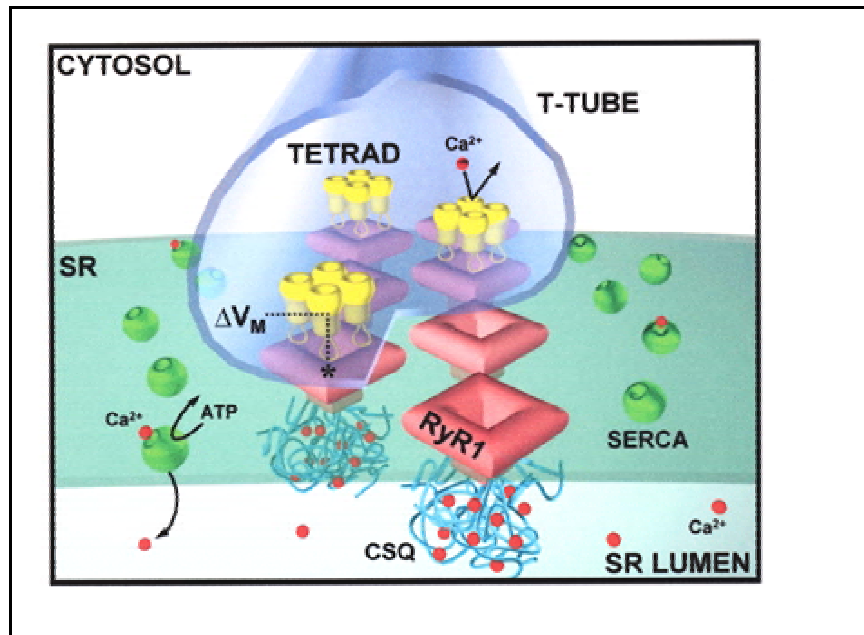


Figure 19 : Environnement du récepteur à la ryanodine (RyR1) dans le muscle squelettique.

Les tétrades de récepteurs aux dihydropyridines sont localisées au niveau de la membrane du tubule transverse (T-Tube). Chaque tétrade est associée à un RyR₁ de la membrane du réticulum sarcoplasmique (SR). La dépolarisation du tubule T (ΔV_m) va entraîner l'activation de RyR₁. La dépolarisation de la membrane du tubule T est transmise au RyR₁ par une interaction directe DHPR-RyR₁. La Calsequestrine (CSQ) est une protéine à faible affinité mais haute capacité pour tamponner le calcium dans la lumière du RS (SR-Lumen). La pompe calcique ATPasique (SERCA) permet de repomper le Ca²⁺ dans le RS (Fill et Copello, 2002).

Ainsi, le Bay K, agoniste spécifique du DHPR peut induire une libération de calcium du réticulum sarcoplasmique sans induire un influx calcique et peut augmenter la liaison de la ryanodine tritiée dans les myocytes cardiaques (Bers et coll., 1993 ; Hryshko et coll., 1989). La ryanodine elle-même peut augmenter la liaison des DHP au DHPR et modifier les caractéristiques du courant calcique de type L des myocytes (Bers et coll., 1983 ; Cohen et Lederer, 1988). Le nombre de DHPR étant très supérieur aux RyR, il est concevable qu'il existe des interactions occasionnelles protéines/protéines entre un DHPR et un RyR2 dans la cellule cardiaque (Dulhunty et coll., 2002).

Le DHPR comprend 5 sous unités (α_1 , α_2 / δ , β et γ). La sous unité α_1 forme le canal calcique, le détecteur de voltage pour l'ECC et contient les sites de liaisons aux DHPR. S'il existe 10 gènes différents codant des sous unités α_1 de DHPR chez l'humain, le gène Ca V1.1 (ou α_{1s}) correspond à la sous unité α_1 du DHPR du muscle squelettique. Le mécanisme de ECC a donné lieu à de nombreuses spéculations durant les années 70 et le début des années 80, les diverses hypothèses proposant soit une transmission chimique au niveau de la triade

faisant intervenir l'IP₃ (Donaldson, 1986 ; Vergara et coll., 1985) ou l'échangeur Na/Ca ou une interaction entre le tubule transverse et le RyR (Chandler et coll., 1976).

L'hypothèse du rôle de l'inositol triphosphate (IP₃) était soutenue par le fait que l'IP₃ pouvait activer une libération de calcium et une contraction de la fibre musculaire squelettique dans certaines circonstances (Catinot et coll., 1998 ; Donaldson, 1986 ; Vergara et coll., 1985 ; Volpe et coll., 1985). Cependant l'utilisation d'un alcaloïde végétal, la ryanodine qui est un activateur spécifique du RyR (Fleischer et coll., 1985) et la caractérisation électrophysiologique du RyR après réincorporation dans des bicouches lipidiques (Rousseau et coll., 1986 ; Smith et coll., 1986) ont permis de démontrer le rôle fondamental du RyR dans l'ECC.

II. A. Interaction morphologique entre DHPR et RyR (figures 19-20)

Une interaction protéique DHPR-RyR nécessite un arrangement géométrique strict entre ces protéines. Cet alignement peut être observé en microscopie électronique à partir de triades isolées de muscle squelettique de lapin, de myotubes (Block et coll., 1988 ; Ferguson et coll., 1984 ; Franzini-Armstrong, 1970 ; Franzini-Armstrong et Nunzi, 1983 ; Takekura et coll., 1994a), de muscles en développement (Takekura et coll., 1994b) ou de lignées de cellules dyspédiques injectées avec le cDNA codant RyR₁ (Protasi et coll., 1998). La membrane du tubule T et du RS sont juxtaposées et juste séparées par un espace de 10 nM qui est traversé par la partie cytosolique du RyR ou « foot » (Franzini-Armstrong, 1970 ; Franzini-Armstrong et coll., 1999). La microscopie électronique permet de montrer que les particules de DHPR sont groupées en tétrades au niveau de la membrane du tubule T et confinées au niveau des triades, c'est-à-dire l'association entre la membrane du système tubule transverse et la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique (Block et coll., 1988).

L'arrangement des triades et des foot ou « pieds jonctionnels » suggère que les deux structures sont couplées (Block et coll., 1988). Les pieds sont alignés sur deux rangées à la surface du RS, et les tétrades sont associées à un pied sur deux en alternance (Block et coll., 1988). Le rapport RyR/DHPR est d'environ 0.5-0.7 dans des triades ou homogénats de muscle squelettique de lapin (Margreth et coll., 1993) ce qui correspond bien à un RyR sur deux associé à une tétrade. Le rapport est plus élevé pour le rat ce qui pourrait être dû à la présence de RyRs supplémentaires en dehors des zones de couplage (Dulhunty et coll., 1992 ; Margreth et coll., 1993). La situation est différente dans le cœur où aucune relation directe DHPR-RyR ne semblerait exister, avec un rapport RyR/DHPR de l'ordre de 4-10 suivant les

espèces (Bers et Stiffel, 1993). Ainsi, dans le muscle squelettique, chaque sous-unité d'un RyR couplé est opposée à un DHPR (Block et coll, 1988 ; Franzini-Armstrong , 1970 ; Franzini-Armstrong et coll., 1996).

Le rôle des RyR qui ne sont pas associés à des tétrades n'est pas encore clairement identifié : ces récepteurs pourraient être activés par le calcium largué à partir des RyR adjacents bien que la concentration en Mg^{2+} cytoplasmique (2 mM), soit un facteur limitant pour cette activation. La levée de l'inhibition due au Mg^{2+} pourrait donc être un facteur important du couplage excitation-contraction (Lamb et Stephenson, 1991) qui mettrait en jeu une interaction entre des domaines cytoplasmiques des RyR couplés aux tétrades et des RyR, non couplés (Flucher et Franzini-Armstrong, 1996).

Les mécanismes qui sont à la base de l'adressage des DHPR et des RyR dans la formation de la jonction entre la membrane du tubule transverse et le RS ne sont pas encore identifiés mais mettraient en jeu des mécanismes indépendants et multiples (Flucher et Franzini-Armstrong, 1996 ; Takekura et coll., 2001) . Les souris dyspédiques sont des souris n'exprimant pas RyR1 et présentant une absence de pieds jonctionnels, alors que la morphologie des tubules et citernes terminales est normale (Takekura et coll., 1995). Les larges particules correspondantes aux DHPR sont présentes dans la membrane du tubule transverse mais ne sont pas associées en tétrades (Flucher et Franzini-Armstrong, 1996 ; Takekura et coll., 1995) ce qui démontre l'importance de l'expression des RyR pour l'association des DHPR en tétrades alors que le RyR n'est pas requis pour la formation de la triade au cours du développement embryonnaire. L'existence de tétrades dans des phases précoces de développement n'a pas été démontrée et il ne semble pas que leur présence soit nécessaire à l'apparition de jonctions triadiques, comme cela a été démontré chez les souris dysgéniques (Flucher et coll., 1991 ; Franzini-Armstrong et coll, 1991), mutants naturels qui n'expriment pas de sous unité $\alpha 1$ du DHPR (Beam et coll., 1986). La capacité à s'orienter correctement dans la membrane serait une propriété inhérente au RyR qui ne ne nécessite pas le DHPR (Powell et coll., 1996 ; Takekura et coll., 2001).

II. B. Interaction fonctionnelle entre DHPR et RyR (les interactions sont résumées figure 20)

Ces interactions ont pu être mises en évidence grâce à l'utilisation de techniques de mutagenèse dirigée et de modèles d'animaux présentant une déficience d'expression pour des protéines, les souris dysgéniques et dyspédiques.

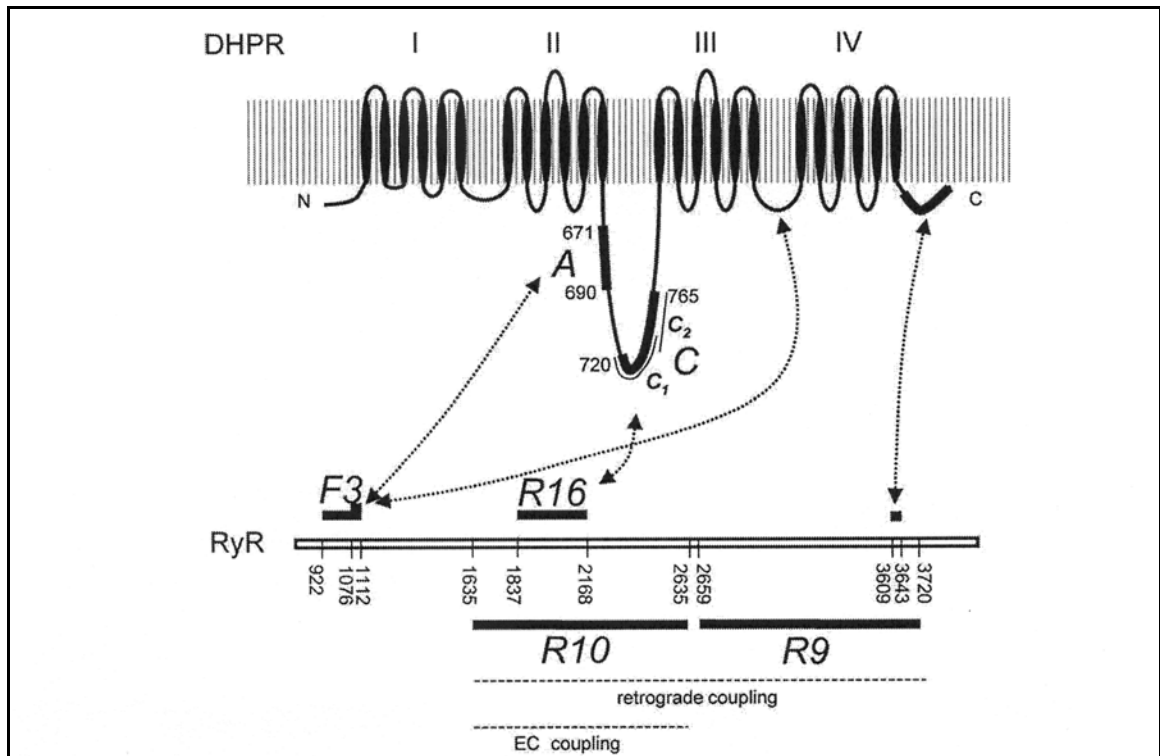


Figure 20 : Résumé des sites d'interactions entre le DHPR et le RyR. Les régions A et C de la boucle du DHPR reliant les domaines II et III ont été définies par El-Hayek et coll., (1995). La région C est nécessaire à la fois pour l'interaction orthograde et rétrograde entre les deux protéines. Les régions R₉, R₁₀ et R₁₆ du récepteur des DHPR ont été définies par Nakai et coll., (1998) et Proenza et coll., (2002). R₁₀ est une séquence indispensable au couplage excitation-contraction. R₉ et R₁₀ sont nécessaires au couplage rétrograde. Les flèches indiquent des régions du DHPR et du RyR qui peuvent interagir (d'après Dulhunty et coll., 2002).

Le rôle des différentes régions du DHPR dans l'ECC peut être étudié en mesurant l'activité électrophysiologique du RyR₁ après son incorporation dans une bicouche lipidique et sa mise en présence de peptides correspondant à des séquences définies du DHPR. Cependant, cette activation du RyR₁ devra être considérée avec prudence compte tenu de l'effet stimulant potentiel du canal par des protéines non spécifiques comme l'albumine bovine (Catinot et coll., 1997) ou certains peptides (Lu et coll., 1994) et ne reflètent pas forcément les changements de conformation réels de ces structures lors de l'ECC.

En outre, l'activité du canal qui est alors mesurée peut être considérée comme une activité basale qui est normalement inhibée par les concentrations millimolaires de Mg²⁺.

Les souris dysgéniques sont des mutants naturels qui n'expriment pas de sous unité $\alpha 1$ du DHPR (Beam et coll., 1986). Les études doivent être menées sur des myocytes de muscles néonataux puisque les souris ne survivent pas à la naissance. Ces myocytes dysgéniques ne

présentent ni courants calciques de type L, ni couplage ECC, ni mouvements de charge asymétriques, ni tétrades. Toutes ces caractéristiques peuvent être restaurées après transfection par le cDNA codant pour la sous unité $\alpha 1$ du DHPR (Adams et coll., 1990 ; Takekura et coll., 1994a ; Tanabe et coll., 1988). Un couplage ECC de type squelettique n'est observé qu'après transfection par le cDNA codant pour la sous unité $\alpha 1S$ (Tanabe et al., 1988), ce qui démontre que des séquences spécifiques de $\alpha 1S$ sont essentielles pour l'existence d'interactions physiques entre DHPR et RyR.

Les régions nécessaires ont pu être décrites par des techniques de mutagenèse dirigée mettant en jeu des chimères d'isoformes de DHPR squelettique et cardiaque (Tanabe et coll., 1990) : ces expériences démontrent que la boucle intracellulaire reliant les domaines II et III de la sous unité $\alpha 1$ du DHPR squelettique est fondamentale pour l'établissement d'un couplage ECC de type squelettique (Tanabe et coll., 1990) avec un rôle mineur de la boucle reliant les domaines I et II. Ainsi la boucle II-III du DHPR se lie à RyR₁ et augmente la liaison de la ryanodine tritiée comme elle active RyR₁ après sa réincorporation en bicouche lipidique (Lu et coll., 1994, 1995 ; O'Reilly et coll., 2002). El-Hayek et coll (1995) ont divisé arbitrairement cette boucle II-III du DHPR en 4 segments (A-D). La région A (670-710 est la seule partie capable d'activer une libération de calcium du RS (El-Hayek et coll., 1995).

L'utilisation de chimères montre que la séquence 725-742 (C₁) de la boucle reliant le domaine II au domaine III de la sous unité $\alpha 1$ du DHPR permet de restaurer un ECC et est donc fondamentale (Nakai et coll., 1998) mais ne permet pas d'obtenir une libération de calcium aussi importante qu'avec la boucle entière (Grabner et coll., 1999 ; Proenza et coll., 2000 ; Wilkens et coll., 2001). Un court fragment correspondant à la séquence 709-766 et contenant la région C₁ essentielle au couplage ECC ne permet pas d'activer RyR₁ contrairement à la séquence 666-726. La Serine 687 est essentielle à cette activation puisque son remplacement par une alanine ou sa phosphorylation inhibe l'effet activateur du peptide (Lu et coll., 1995). Des expériences réalisées à partir de peptides synthétiques représentant des séquences du DHPR ont permis de préciser certaines interactions DHPR-RyR. Cependant, il est difficile d'extrapoler directement ces résultats à ce qui se passe *in vivo* lors du changement de conformation du DHPR. Il a été démontré qu'un peptide (peptide C) correspondant à la séquence 724-760 de la boucle II-III du DHPR (au rôle essentiel pour le couplage EC, voir ci-dessus) prévient l'activation du RyR par le peptide A (671-690) (Saiki et coll., 1999) à de fortes concentrations de calcium (> 0,1 μ M) et active le canal pour des concentrations de calcium < 0,1 μ M (Yamamoto et coll., 2002). Ce peptide C est un

activateur à haute affinité de RyR₁ après son incorporation en bicouches lipidiques (Stange et coll., 2001) et l'inhibe à de fortes concentrations (10 – 150 µM). Cet effet ne s'observe pas sur le canal purifié (Stange et coll., 2001) suggérant l'implication de protéines associées. Un site de liaison pour ce peptide C sur la région amino-terminale du RyR (150 kDa) a été démontré (Yamamoto et coll., 2002).

Une seconde région pourrait jouer un rôle dans le couplage EC de type squelettique, la séquence 671-690 (séquence A) qui présente une très forte affinité et est activatrice du RyR (El-Hayek et coll., 1995 ; Dulhunty et coll., 1999) même si le couplage ECC de type squelettique n'est pas altéré en absence ou modification de cette séquence (Proenza et coll., 2000 ; Ahern et coll., 2001). Ainsi, il a été montré que cette séquence 671-690 était impliquée dans l'interaction de la séquence 720-765 avec le RyR permettant le couplage ECC (Ahern et coll., 2001).

La séquence peptidique 671-690 du DHPR (peptide A) active le RyR en présence de la protéine FKBP12 (Dulhunty et coll., 1999 ; O'Reilly et coll., 2002). Le peptide perd toute activité après délétion de sa partie carboxy-terminale ou si l'on réalise des substitutions par des acides aminés moins chargés dans cette séquence essentielle à son activité (Casarotto et coll., 2001 ; El Hayek et Ikemoto, 1998). Un site de liaison pour le peptide A a pu être mis en évidence sur le fragment carboxy-terminal (400 kDa) du RyR (Yamamoto et Ikemoto, 2002). Cette activité peut être mimée par des toxines de scorpion comme l'imperatoxine A ou la maurocalcine, toxines présentant une homologie de structure avec le peptide A (Fajloun et coll., 2000).

Si comme décrit ci-dessus la séquence 720-765 semble fondamentale au couplage EC, trois autres régions du DHPR peuvent interréagir avec le RyR :

- la partie carboxy- terminale (Slavik et coll., 1997) de $\alpha 1$ qui inhibe RyR₁ en se liant aux sites de liaison de la CaM au niveau de la séquence 3609-3643 de RyR1 (Sencer et coll., 2001).
- la boucle reliant les domaines III et IV (Jurkat-Rott et coll., 2000 ; Leong et Mac Lennan, 1998b).
- la boucle reliant les domaines I et II (Tanabe et coll., 1990 ; Beurg et coll., 1999 a et b).

Le rôle des différentes séquences de RyR₁ dans le couplage EC a pu être appréhendé grâce aux *souris dyspédiques qui n'expriment pas de RyR1*, après expression de chimères.

Ainsi la région 1635-2635 du RyR (R10) est essentielle à un couplage ECC. De plus, cette séquence R10 et la séquence R9 (2659-3720) participent à la régulation rétrograde du DHPR (Nakai et coll., 1998).

La séquence R16 (1837-2168) de la région R10 est impliquée dans l'interaction RyR et boucle II-III du DHPR dans la région C (Proenza et coll., 2002), mais elle ne permet pas à elle seule d'assurer un couplage squelettique normal, ce qui implique que d'autres régions du RyR sont nécessaires à ce mécanisme. Cette séquence n'est pas suffisante pour une régulation rétrograde (Proenza et coll., 2002).

D'autres protéines peuvent être nécessaires à ces interactions comme la protéine FKPB12 (O'Reilly et coll., 2002).

Cependant, les interactions in situ entre la boucle II-III et le RyR natif sont sans doute différentes des interactions avec le RyR purifié (Stange et coll., 2001 ; Dulhunty et coll., 2002).

Le *couplage rétrograde* entre RyR et DHPR a été mis en évidence très récemment. Le RyR dicte la caractéristique du courant calcique via le DHPR (Nakai et coll., 1996 ; Avila et coll., 2001). La boucle reliant le domaine II au domaine III du DHPR et plus précisément la séquence 720-765 (qui inclue la région C) est nécessaire à ce couplage rétrograde (Grabner et coll., 1999). Ainsi le courant calcique de type L est réduit ou absent après délétion de la séquence 720-765 (Grabner et coll., 1999) ou la séquence 724-743 même si le DHPR mutant présente une incorporation normale dans la membrane (Ahern et coll., 2001).

La séquence 671-690 (région A) du DHPR est également impliquée dans cette régulation rétrograde (Ahern et coll., 2001).

De nombreux fragments peptidiques du RyR peuvent se lier à la boucle II – III du DHPR. Ainsi la séquence 922-1112 peut se lier à la fois à la boucle II –III et à la boucle III – IV (Leong et Mc Lennan, 1998) du DHPR. Plus précisément, la séquence 1076-1112 du RyR qui se lie à la boucle II –III du DHPR, au niveau de la région 670-691 est également impliquée dans le couplage rétrograde.

Le mécanisme mettant en jeu le couplage EC pourrait être de 2 types :

- le changement de conformation de la boucle II-III pourrait activer le RyR (Dulhunty et al., 1999 ; El Hayek et Ikemoto, 1998). La région C serait essentielle pour l'ECC et la région A serait impliquée dans l'interaction protéine-protéine avec le RyR. La région C1 pourrait être directement impliquée dans l'interaction moléculaire permettant l'ECC et le couplage rétrograde, mais elle pourrait également simplement stabiliser une conformation de la boucle

II-III du DHPR, permettant l'ECC (Ahern et coll., 2001). Cette séquence C1 pourrait également jouer un rôle dans la formation des tétrades et l'adressage des DHPR (Dulhunty et coll., 2002 ; Takekura et coll., 2001).

- une levée de l'inhibition de l'activité du canal RyR telle l'inhibition due au Mg^{2+} (Lamb et Stephenson, 1991).

III Plasticité musculaire

III. A. Polymorphisme des fibres squelettiques

Un muscle, comme nous l'avons vu précédemment, est constitué de nombreuses fibres musculaires qui sont l'unité élémentaire contractile. Les fibres musculaires peuvent être purement rapides, purement lentes ou hybrides selon l'hétérogénéité des protéines contractiles qu'elles expriment en particulier les MHC. Ainsi, on a longtemps distingué des fibres pures (exprimant soit de la MHC I lente, soit de la MHC II rapide), des fibres hybrides coexprimant des isoformes rapides et lentes de MHC (Pette et Staron, 1990 pour revue). Cependant, il y a maintenant de nombreuses données qui montrent que le terme initial de fibre hybride en référence aux seules MHC est inadapté car les fibres présentent des patterns d'expression moléculaire hétérogènes pour de nombreuses autres protéines que les MHC.

Ainsi il a été démontré que des fibres musculaires pouvaient exprimer exclusivement une isoforme lente de MHC, mais à la fois des isoformes lentes et rapides de MLC (Mizusawa et coll., 1982 ; Bortolotto et coll., 2000, Stevens et coll., soumis). Sur la base de leur composition en MHC, ces fibres pourraient donc être considérées comme purement lentes alors qu'elles sont hybrides et présentent une hétérogénéité pour d'autres protéines contractiles.

La complexité de l'hybridisme peut être également illustrée par les possibilités suivantes :

- les fibres qui expriment deux, voire plus d'isoformes d'une même protéine : par exemple les fibres contenant plusieurs isoformes de Tm, Tn et de MLC ;
- les fibres exprimant une isoforme d'une protéine contractile mais plusieurs isoformes ou une autre isoforme sous la forme du transcript.

De plus, le set d'isoformes de protéines détecté dans des fibres exprimant des isoformes de deux, voire plus de protéines, peut être du même type (matched, lent ou rapide) ou de types non appariés (mismatched). Ainsi, un set de même type correspond à l'association d'isoformes rapides de MHC (IIa et IIb) et d'isoformes rapides de MLC (MLC1f, MLC2f, MLC3), un set non apparié correspondant à l'expression d'isoformes d'un même type de MHC (lent ou rapide) à une coexpression d'isoformes lentes et rapides de MLC.

Ainsi, il serait plus approprié dorénavant d'indiquer pour quel type de protéine une fibre est hybride. L'hybridisme des fibres est donc multiple et présente un intérêt majeur pour les physiologistes pour comprendre :

- le rôle physiologique des diverses isoformes de protéines musculaires,
- la régulation de l'expression des gènes dans une cellule multinuclée.

III. B. Le muscle, une structure plastique

Le muscle est une structure capable de s'adapter à des changements de l'environnement physiologique ou physique grâce à une plasticité qui peut affecter l'ensemble de ses composantes. Ainsi, les fibres musculaires sont des structures dynamiques et leurs composition moléculaire et propriétés contractiles se modifient sous l'influence de différents facteurs comme l'âge (développement et vieillesse), l'innervation, les facteurs de croissance, les hormones, l'activité neuromusculaire et la charge mécanique imposée. Les chaînes lourdes de myosine sont classiquement considérées comme les protéines typiques permettant de caractériser la plasticité musculaire.

Il existe différents modèles animaux permettant d'étudier la plasticité musculaire : des modèles de dénervation ou de section de la moelle pour lesquels la commande nerveuse est altérée ou supprimée, des modèles d'immobilisation plâtrée ou d'hypodynamie-hypokinésie permettant de réduire l'activité neuromusculaire en gardant l'intégrité du système neuromusculaire, des modèles permettant d'augmenter l'activité neuromusculaire (hypergravité). Nous ne développerons dans ce chapitre que quelques éléments de la plasticité musculaire dans des modèles où la commande nerveuse est la principale commande altérée et à l'origine de la plasticité musculaire.

Les propriétés musculaires dépendent en partie du rétrocontrôle exercé par certains récepteurs (organes de Golgi, récepteurs cutanés et articulaires, fuseaux musculaires, système vestibulaire; Bock, 1998). Les informations provenant des récepteurs sont transmises au

système nerveux central et entraînent des réflexes médullaires qui contribuent à la stabilisation et au maintien de la posture.

De nombreuses études ont démontré l'influence de l'innervation motrice rapide ou lente sur les propriétés des muscles squelettiques adultes (Buller et Poppe, 1977 ; Burke et coll., 1971 ; Lomo, 1989 ; Lomo et coll., 1985). Ces auteurs ont également montré notamment qu'une cross-innervation modulait des propriétés de la fibre musculaire.

La caractérisation de la plasticité musculaire a pu se développer avec la mise au point de techniques analytiques de plus en plus pointues. Ces études ont ainsi permis de montrer que des changements moléculaires étaient à l'origine des changements de propriétés musculaire et que des changements de vitesse de contraction ou d'activité ATPasique de myosine étaient liés à des changements d'expression de MHC (Pette pour revue, 2001).

III. B. 1. Modification de l'activité neuromusculaire par des stimulations électriques chroniques

Des travaux pionniers démontrèrent que des stimulations électriques chroniques à basse fréquence mimant le pattern d'activité d'un motoneurone lent provoquent une modification de la vitesse de contraction du muscle rapide (Salmons et Vrbova, 1969). De multiples programmes de recherche ont étudié l'effet d'une stimulation chronique à basse fréquence (CLFS) sur la transformation d'un muscle de phénotype rapide vers un phénotype lent (voir pour revue, Pette et Vrbova, 1992; Pette et Staron, 1997). En outre, diverses expériences de stimulations de muscles dénervés ont permis de démontrer que le pattern du stimulus délivré au motoneurone conditionnait le phénotype de la fibre musculaire (Ausoni et coll., 1990; Gundersen et coll., 1988).

CLFS induit une conversion des muscles rapides fatigables en muscles plus lents moins fatigables avec l'association de changement de propriétés fonctionnelles, métaboliques et moléculaires. Ainsi, le ralentissement des cinétiques de contraction et de relaxation est induit par l'échange d'isoformes rapides de protéines myofibrillaires en isoformes plus lentes (Härtner et coll, 1989 ; Leeuw et Petter, 1993), et de modification de l'expression de protéines du réticulum sarcoplasmique comme les Ca^{2+} ATPases, la calséquestrine et le récepteur à la ryanodine, d'isoformes rapides vers des isoformes lentes (Ohlendiek et coll., 1999).

L'acquisition d'une résistance à la fatigue résulte principalement de l'augmentation des capacités de métabolisme aérobie – oxydatif des fibres (Etgen et coll., 1993), avec un changement dans l'expression du transporteur Glut 4, de l'activité de la citrate syntase, de l'hexokinase II (Hoffmann et Pette, 1994) et du transporteur du lactate (Mc Cullagh et coll., 1997), l'augmentation du glycogène, et une augmentation de la capillarisation et de la perfusion du muscle (Hudlicka et coll., 1977; Skorjanc et coll., 1998).

III. B. 2. Diminution de l'activité neuromusculaire

La découverte d'une transformation du muscle soleus lent en un muscle rapide après ténotomie (section du tendon) a permis le développement de nombreuses études sur la plasticité musculaire (Buller et Lewis, 1965). Ce fut le premier modèle montrant une plasticité musculaire lors d'une diminution de l'activité neuromusculaire. Après ténotomie, la jonction nerf-muscle reste intacte mais une baisse de l'activité des motoneurones est observée (Jozsa et coll., 1988 ; Vrbova, 1963). La section du tendon entraîne le raccourcissement du muscle et une atrophie musculaire, plus importante pour le muscle lent (soleus) que pour le muscle rapide (Jakubieck-Puka et coll., 1992 ; Jamali et coll., 2000 pour revue). Les effets de la ténotonie sont moins importants après interruption des influx sensoriels ce qui montre que les afférences jouent un rôle important dans le développement de l'atrophie (Mc Lachlan, 1981). Au niveau moléculaire, on observe des modifications dans l'expression des MHC (Jamali et coll., 2000 ; Mc Lachlan, 1981 ; Vrbova, 1963) avec une diminution de la MHCI dans le soleus (Jakubieck-Puka et coll., 1992).

III. B. 2. a - Blocage pharmacologique de l'influx nerveux par le tétrodoxtine.

L'application locale de TTX sur un nerf périphérique, en inhibant la genèse des potentiels d'action, permet de différencier le rôle joué par le message nerveux, du rôle joué par les substances trophiques transportées par le flux axonal (Betz et coll., 1980). Après 2-4 semaines de perfusion du nerf sciatique par de la TTX, les propriétés morphologiques, contractiles et histologiques du muscle soleus sont altérées: une atrophie sévère (Dunn et Michel, 1999) avec une chute de 50 % de la masse et de la force musculaires, des modifications de l'expression des différentes isoformes de protéines contractiles, avec apparition de l'expression de MHC IID/X et embryonnaire (Dunn et Michel, 1999 ; Midrio et coll., 1998 ; Schiaffino et coll., 1988) et une augmentation des vitesses de contraction sont

ainsi observées (Dunn et Michel, 1999 ; Spector, 1985). Il existe des similitudes entre la réponse d'une soleus suite à l'administration de TTX ou des résultats obtenus après dénervation ou suspension (Fodili, Thèse 1995). L'ensemble de ces travaux souligne l'importance du message nerveux dans le maintien des propriétés du muscle.

III. B. 2. b - L'immobilisation.

La longueur du muscle à laquelle se fait l'immobilisation va fortement influencer les transformations musculaires . L'immobilisation en position raccourcie est responsable du développement d'une atrophie musculaire (Goldspink, 1977 ; Nonaka et coll., 1997 ; Spector et coll., 1982). Le soleus semble le plus affecté (Booth, 1982 ; Fitts et coll., 1986). Après une immobilisation en position étirée, une atrophie musculaire et des pertes de force sont également observées, même si les transformations sont alors moins développées (Herbert et Balnave, 1993 ; Jarvinen et coll., 1992).

D'une manière générale, l'immobilisation en position raccourcie d'un muscle lent comme le soleus provoque la surexpression des ARNm codant pour les MHC de type rapide et une diminution des ARNm codant pour la MHCI. Pour les muscles rapides, l'immobilisation en position raccourcie induit la diminution de l'expression des ARNm codant pour la MHCIIA (Jänkälä et coll., 1997 ; Nonaka et coll., 1997). L'étirement permanent du muscle entraîne également des changements d'expression des isoformes de MHC, en particulier une augmentation de la MHC IIA dans le soleus de rat (Loughna et coll., 1990 ; Zador et coll., 1999).

Le facteur déterminant dans cette transformation du muscle soleus d'un phénotype lent à un phénotype rapide semble être la diminution de la charge. Il existe cependant également une diminution de l'activité électrique du muscle (Fournier et coll., 1983 ; Booth, 1982). Mais celle-ci n'est pas complètement supprimée contrairement à ce qui se passe en microgravité. Le rôle de l'innervation dans ces transformations est fondamental : ainsi, l'immobilisation du soleus en position raccourcie sur des animaux nouveau-nés retarde la maturation post natale de ce muscle encore sous innervation de type polyneural, alors qu'une immobilisation du muscle ayant acquis son innervation monosynaptique induit sa transformation vers un type rapide (Picquet et coll., 1998).

III. B. 2. c - La dénervation

Les propriétés des fibres musculaires dépendent de l'activité électrique délivrée par les motoneurones.

La dénervation induit une atrophie musculaire et altère les caractéristiques phénotypiques des muscles concernés. Bien que les effets de la dénervation soient fonction de l'âge et de l'espèce (Gutmann et coll., 1972), celle-ci altère les propriétés contractiles aussi bien des muscles de type rapide que des muscles de type lent : l'EDL acquiert ainsi des caractéristiques de muscle lent et le soleus devient rapide (Gutmann et coll., 1972 ; Syrový et coll., 1972). Des changements d'expression des MHC correspondent à ces transformations (Ansved et Larsson, 1990 ; D'Albis et coll., 1994 ; Schiaffino et coll., 1988). La MHCIIA joue un rôle pivot dans ces transformations puisque son expression augmente aux dépens de la MHCI dans le soleus de rat dénervé (Jakubiec-Puka et coll., 1990, 1999).

Cependant, dans un grand nombre d'études les protocoles expérimentaux ne permettent pas de discerner les isoformes MHCIIA et MHCII D/X. Il est donc possible que l'isoforme MHCII D/X joue un rôle important dans ces schémas de transformation comme cela a été montré après dénervation pour le soleus de rat (Huey et Bodine, 1998 ; Jakubiec-Puka et coll., 1999).

L'expression d'isoformes particulières de MHC est également observée après dénervation : MHC embryonnaire et néonatale (Bacou et coll., 1996 ; Haddad et coll., 1997) et MHC α cardiaque pour l'EDL de lapin (Hämäläinen et Pette, 1997). L'étude du transcript de ces protéines indique une adaptation des mécanismes de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Huey et Bodine, 1998).

Des modifications du réticulum sarcoplasmique ont également été rapportées après dénervation chez le rat. On observe ainsi un changement d'expression des isoformes de SERCA avec une augmentation de la SERCA1a caractéristique du muscle rapide dans le soleus (Nozais et coll., 1996 ; Hamalainen et Pette, 2001). Une augmentation de l'expression du transcript du DHPR squelettique et de RyR₁ est également rapportée dans le soleus après de long temps de dénervation (Pereon et coll., 1997) avec une surprenante apparition du transcript pour la sous-unité $\alpha 1$ du DHPR cardiaque dans l'EDL. Ces derniers travaux sont en accord avec la transformation du RS du muscle lent vers un phénotype rapide caractérisé par un développement du RS (Delbono et Chu, 1995 ; Takekura et coll., 1996 ; Zorzatto et coll., 1989). De même des changements d'expression des enzymes métaboliques glycolytiques ont été rapportés après dénervation (Nozais et coll., 1996, 1999).

Il existe peu de données sur les effets d'une déafférentation sur les propriétés morphologiques, contractiles et histochimiques du muscle. Une atrophie se développe après deux semaines de déafférentation unilatérale (section des racines dorsales L₄ et L₅) au niveau du soleus comme du plantaris chez le rat, cette atrophie étant moins importante que dans le cas d'une dénervation (Ohira, 1989) ce qui suggère que les informations afférentes jouent un rôle fondamental dans le maintien des propriétés musculaires. En outre, il est décrit chez le rat après une déafférentation unilatérale (section des racines dorsales L₃- L₆) une hyperextension du pied qui induit une hypertrophie de l'EDL associée à une atrophie du soleus (Walro et coll., 1997). De récents travaux au laboratoire ont confirmé une atrophie du soleus après déafférentation (Picquet et Falempin, 2003), moins marquée qu'après hypodynamie-hypokinésie : cette atrophie est principalement due à une diminution de la CSA des fibres rapides et hybrides. Cette atrophie est accompagnée de modifications mineures de l'expression des MHC avec l'apparition de MHC IID/X dans le soleus et une modification des propriétés contractiles du soleus vers un phénotype rapide.

III. B. 2. d - Microgravité réelle ou simulée

Les expériences décrites au cours de ce travail sont réalisées dans le cadre de l'atrophie musculaire induite par microgravité simulée. Ce chapitre rendant compte de la plasticité musculaire au cours de la microgravité sera donc plus développé que les précédents.

- *Modèles de microgravité réelle et simulée*

La microgravité encore appelée apesanteur ou micropesanteur, qu'elle soit réelle ou simulée, se caractérise par l'absence quasi-totale de la force d'attraction terrestre sur le corps. L'exposition prolongée en microgravité caractérisant un vol spatial de longue durée provoque divers changements physiologiques, notamment des modifications cardiovasculaires, des changements au niveau du squelette et des muscles. Pour faire face aux besoins des missions spatiales prolongées divers programmes d'études se sont développés afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces modifications physiologiques, et de développer des méthodes préventives, ou des protocoles de contre-mesures.

Il existe différents moyens d'obtention de la microgravité. La microgravité réelle est obtenue lors des vols spatiaux et lors des vols paraboliques, vols au cours desquels un avion

va effectuer une série d'arcs paraboliques (20-40) ce qui produit des périodes d'apesanteur à 0G de 20-25 secondes.

Il existe également différents moyens de reproduire les effets de la microgravité réelle correspondant à la microgravité simulée. Le Bed Rest consiste à coucher un sujet sur un lit incliné à -6° par rapport à l'horizontale ce qui provoque un transfert liquidien des membres inférieurs vers les parties supérieures de l'organisme. Cette position réduit l'effet de la gravité sur l'organisme et reproduit de nombreux facteurs environnementaux de l'espace (Booth, 1994 ; Droppert, 1993).

L'immersion sèche est principalement utilisée par les équipes russes qui travaillent dans le cadre de la physiologie spatiale. Les sujets sont allongés sur une bache imperméable qui repose sur la surface de l'eau dans une piscine, ce qui provoque à la fois une absence de la motricité et de la charge imposée sur les muscles posturaux.

Divers modèles animaux ont également été développés afin d'étudier les effets de la microgravité simulée comme les expériences d'immobilisation d'animaux jeunes (Picquet et coll., 1998) et adultes (Heslinga et Huijing, 1992 ; Jankala et coll., 1997 ; Spector et coll., 1982). Cependant les résultats obtenus sont fortement associés à la longueur à laquelle le muscle est étiré (voir chapitre immobilisation). Le modèle de microgravité simulée le plus utilisé correspond au modèle de Morey (Morey et coll., 1979 ; Musacchia et coll., 1980) où le train arrière du rat est soulevé par suspension du rat par la queue. L'animal peut se déplacer grâce à ses membres inférieurs et avoir accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. Dans ces conditions, le système musculosquelettique des membres inférieurs se trouve en hypodynamie (absence de charge corporelle) et en hypokinésie (réduction des activités motrices) d'où la dénomination de HH. D'autres appellations font références à ce modèle : HU (Hindlimb Unloading) et HS (Hindlimb Suspension). Ces conditions permettent de reproduire de nombreuses modifications observées après microgravité réelle (Thomason et Booth, 1990).

- *Diminution de la commande motrice*

Les facteurs impliqués dans la plasticité musculaire en microgravité sont principalement une diminution de l'activité neuromusculaire et de la charge corporelle. Diverses études ont démontré que l'activité neuromusculaire était fortement réduite dans les muscles plus particulièrement touchés par l'épisode de microgravité. Une réduction de l'activité électromyographique (EMG), qui correspond à l'activité motrice de nombreuses unités motrices du muscle, a pu être mesurée dans le soleus comme dans le gastrocnemius medialis

après suspension. Cette activité chute à 9 et 46 % respectivement dans les premiers jours de suspension pour revenir à près de 81 et 98 % de la normale après 7 jours (Alford et coll., 1987, figure 21 A) alors que l'atrophie musculaire continue à se développer. L'activité du tibialis anterior est quant à elle augmentée après 3 jours de suspension. D'autres auteurs ont montré que la diminution d'activité observée après 4 jours de suspension était maintenue même après 28 jours de suspension, le pattern d'activité tonique s'étant transformé en un pattern phasique (Blewett et Elder, 1993 ; Riley et coll., 1990 figure 21 B).

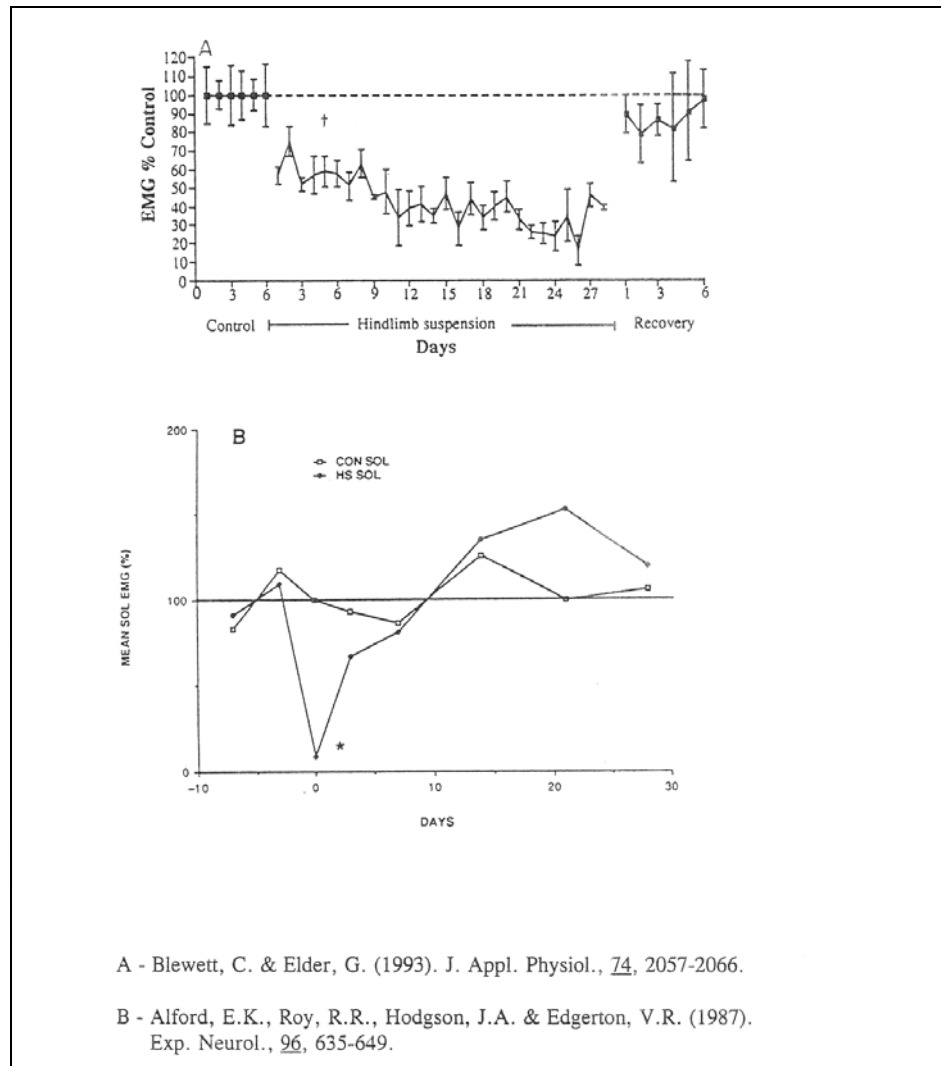


Figure 21 : Evolution de l'EMG du soleus de rat au cours de la suspension.

Une diminution de l'EMG moyen a également été mesurée dans le soleus, compensée par une activation accrue de la partie blanche du gastrocnemius (Canu et Falempin, 1996 , 1998). La période de non utilisation des membres postérieurs n'empêche pas la genèse d'une activité motrice organisée par les centres médullaires. Il existe une augmentation de l'activité

du réseau neuronal médullaire impliqué dans la commande locomotrice après une période d'HU (Canu et Falempin, 2001). Ainsi une réorganisation des unités motrices du soleus apparaît après 14 jours, la proportion d'unités motrices rapides étant doublée (Leterme et Falempin, 1996), toutes les unités motrices devenant hétérogènes (Picquet et coll., 2000).

L'augmentation de l'activité des muscles fléchisseurs et la diminution pour les muscles extenseurs pourraient être dues à la position adoptée par les muscles inférieurs du rat pendant l'HU. En effet un raccourcissement pendant l'HU chronique des muscles extenseurs et un étirement chronique des muscles fléchisseurs de la cheville est observé (Riley et coll., 1990).

Une modification des messages afférents pourrait être impliquée dans les transformations musculaires observées aussi bien en microgravité réelle que simulée (Money et Cheung, 1991 ; De-Doncker et coll., 2000 ; De-Doncker, Thèse 2000). Ainsi, une modification de l'activité des propriocepteurs a été démontrée après HU, avec une augmentation de l'activité des fuseaux neuromusculaires (De-Doncker et coll., 2002). Cependant, des études comparées démontrent que les modifications d'expression des MHC ainsi que l'atrophie musculaire observée après HU sont principalement dues à une altération de la commande nerveuse et l'absence de charge corporelle, et non exclusivement à l'absence de messages afférents (Picquet et Falempin, 2003).

Leterme et Falempin (1998) ont observé, sur le rat adulte, en situation de vol parabolique, une inversion instantanée de l'activité EMG des muscles extenseurs et fléchisseurs de la jambe pendant la phase de microgravité, le soleus et le gastrocnemius devenant silencieux alors que le tibialis anterior est fortement activé comme cela a été démontré chez l'homme (Clément et coll., 1984). Chez l'homme, durant un vol spatial, l'activité EMG du muscle soleus (fléchisseur plantaire) est réduite alors que celle du tibialis anterior (fléchisseur dorsal) est augmentée durant les ajustements posturaux (Clément et André-Deshays, 1987 ; Clément et coll., 1985 ; Lestienne et Gurfinkel, 1988). Ces changements d'activités entre muscles extenseurs et fléchisseurs sont également observés lors de vols paraboliques chez l'homme (Clément et André-Deshays, 1987), le rat (Leterme et Falempin, 1998), et le singe pour de courts vols spatiaux (Hodgson et coll., 1991).

Les transformations structurales et fonctionnelles observées après une période de microgravité ont donné lieu à de nombreuses études et sont relativement bien connues pour certaines protéines contractiles en particulier les MHC.

- *Effets de la microgravité réelle sur les propriétés morphologiques, contractiles et électrophorétiques du tissu musculaire*

La microgravité réelle entraîne le développement rapide d'une atrophie musculaire et plus particulièrement des muscles posturaux comme le soleus, le vastus intermedius ou le gastrocnemius, les muscles rapides (Tibialis Anterior, EDL, Plantaris) étant peu affectés (Baldwin et coll., 1990 ; Caiozzo et coll., 1994 ; Ilyina-Kakueva et coll., 1976 ; Ohira et coll., 1992, 2000, Riley et coll., 1990 ; Roy et coll., 1991 ; Kischel et coll., 2001). Cette atrophie touche les fibres lentes comme les fibres rapides (Martin et coll., 1988 ; Miu et coll., 1990 ; Ohira et coll., 1992), les fibres lentes de type I étant plus altérées que les fibres rapides de type IIA (Ohira et coll, 1992 ; Fitts et coll., 2000 ; Riley et coll., 1990).

Cependant, chez l'homme, la surface des fibres lentes est plus fortement diminuée pour les fibres IIA que pour les fibres I (Edgerton et coll., 1995 ; Widrick et coll., 1999). Cette apparente contradiction pourrait être due à la taille initiale des fibres, les fibres I étant plus grosses que les IIA chez le rat à l'inverse de l'homme. En effet, il a été montré que plus la fibre est initialement de grande taille, plus l'atrophie sera marquée (Edgerton et Roy, 1996). Cette atrophie musculaire est accompagnée d'une diminution du contenu des fibres en protéines myofibrillaires, particulièrement forte dans le soleus (Gayevskaya et coll., 1979a, b ; Steffen et Musacchia, 1986) ainsi qu'une prolifération du tissu conjonctif (Ilyina-Kakueva et coll., 1976). Une diminution de l'actine sans variation du taux de myosine a été mesurée en HU et après un vol spatial, ce qui semble indiquer que les deux protéines présentent deux régulations différentes et indépendantes. (Babij et Booth , 1988 ; Thomason et coll., 1989 ; 1992). Riley et coll (2000) démontrent que la quantité d'actine diminue également dans le soleus humain sans variation en ce qui concerne la myosine ce qui entrainerait une augmentation de l'espace entre les filaments fins et épais et un détachement plus rapide des ponts actine/myosine (Babij et Booth, 1988 ; Riley et coll, 2000 ; Widrick et coll., 1999). Une diminution de la synthèse protéique précédant une augmentation de la dégradation protéique serait à l'origine de cette perte de protéine myofibrillaire (Thomason et coll., 1989). Chez l'humain, le facteur principal à l'origine de la perte en protéine contractile serait la diminution de la synthèse protéique (Stein et coll., 1999). L'atrophie musculaire s'accompagne de pertes de forces musculaires dans le soleus qui affectent la force maximale et la tension tétonique maximale des fibres musculaires de rat (Edgerton et Roy, 1996 ; Caiozzo et coll., 1994, 1996 ; Holy et Mounier, 1991 ; Stevens et coll., 1993). La perte de force est peu marquée voir absente dans le cas de muscles rapides (Holy et Mounier, 1991 ;

Stevens et coll., 1993 ; Kischel et coll., 2001). La perte de force serait en rapport direct avec la perte en protéines myofibrillaires (Riley et coll., 2000 ; Widdrick et coll., 1999), car elle n'est pas modifiée si elle est rapportée à la section des fibres (Holy et Mounier, 1991). La sensibilité calcique des fibres lentes est diminuée chez le rat comme chez le singe (Gardetto et coll., 1989 ; Holy et Mounier, 1991 ; Kischel et coll., 2001 ; Stevens et coll., 1993) ou peu modifiée chez l'homme (Widrick et coll., 1999). Des études ont démontré que la vitesse de contraction (TPT) et le demi-temps de relaxation ($RT_{1/2}$) étaient diminués dans le soleus, ce qui indique que la libération du calcium par le RS comme sa recaptation sont modifiés (Caiozzo et coll., 1996).

Le phénotype des muscles antigravitaires s'oriente vers des caractéristiques de muscles rapides. On observe ainsi après vol spatial une diminution du pourcentage des fibres lentes de type I et une augmentation des fibres de type IIA dans les muscles lents posturaux du rat (Edgerton et Roy, 1996 ; Jiang et coll., 1992 ; Martin et coll., 1988 ; Ohira et coll., 1992 ; Roy et coll., 1991 ; Staron et coll., 1998 ; Talmadge et coll., 1996 ; Widrick et coll., 1999). Cette diminution du pourcentage de fibres lentes se développe rapidement après 7 jours de vol (Caiozzo et coll., 1994 ; Desplanches et coll., 1990). L'apparition de fibres hybrides exprimant l'isoforme IIX/D avec d'autres isoformes de MHC est observée en microgravité réelle dans le soleus (Caiozzo et coll., 1994 ; 1996 ; Talmadge et coll., 1996 ; Ohira et coll., 1992). La diminution de l'isoforme MHC I est toujours associée à une augmentation des proportions de MHC IIA et IIX/D (Caiozzo et coll., 1994, 1996 ; Staron et coll., 1998 ; Widrick et coll., 1999). Il y a également apparition de MHC IIB dans le soleus (Allen et coll., 1996 ; Staron et coll., 1998 ; Talmadge et coll., 1996).

Ces changements d'expression de MHC ont été reliés à des changements des propriétés contractiles des fibres musculaires principalement caractérisés par une diminution des cinétiques de contraction (temps de contraction, temps de demi-relaxation) et une augmentation de la V_{max} des muscles lents antigravitaires (Caiozzo et coll., 1994, 1996).

Les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire excepté le cortisol, qui ne peut être impliqué dans une atrophie sélective des muscles antigravitaires, ainsi que le taux d'hormones de croissance ne sont pas modifiés après microgravité (Stein et coll., 1999).

La quantité totale d'enzymes oxydatives est diminuée après vol (Miu et coll., 1990 ; Manchester et coll., 1990). De plus, des études réalisées sur fibres isolées semblent montrer que le taux d'enzymes glycolytiques augmente de 28 % après microgravité (Manchester et coll., 1990). Une augmentation de la GAPDH et de la pyruvate kinase est mesurée après 2 semaines de vol dans les fibres lentes alors qu'aucun changement n'est mesuré dans des fibres

rapides de tibialis anterior (Chi et coll., 1992). Une très forte augmentation de l'hexokinase qui convertit le glucose en glucose-6-phosphate est également observée dans le soleus voire dans le tibialis où les résultats sont variables (Chi et coll., 1992) après microgravité réelle. Cependant, les résultats concernant l'étude des enzymes de la glycolyse dans le muscle entier après vol spatial sont très contrastés. Ainsi, certains travaux montrent que l'activité de la lactate deshydrogenase n'est pas augmentée dans le soleus (Desplanches et coll., 1990) tandis que d'autres démontrent que l'activité GAPDH est fortement accrue (Musacchia et coll., 1992 ; Martin et coll., 1988).

Les résultats décrivant les activités des enzymes du métabolisme du muscle humain sont encore très partiels. Peu de changements ont été observés si ce n'est une augmentation de l'activité GAPDH dans les fibres de type I (Edgerton et coll., 1995). En évaluant le profil enzymatique de fibres isolées de soleus et de gastrocnémien d'astronautes, Fitts et coll (2000) ont montré que la microgravité réelle augmentait les enzymes oxydatives des fibres de type I du soleus. Cependant aucune variation n'a été mesurée concernant l'hexokinase, ou d'autres enzymes glycolytiques comme la glycogène phosphorylase, la glycogène synthétase, la phosphofructokinase ou la LDH.

- *Effets de la microgravité simulée sur les propriétés morphologiques, contractiles et électrophorétiques du tissu musculaire.*

Une atrophie musculaire se développe après microgravité simulée, particulièrement bien marquée pour les muscles antigravitaires tels que le soleus (Thomason et Booth, 1990 pour revue, Roy et coll., 1991 ; Oganov et coll., 1980 ; Stevens et coll., 1993). En effet l'atrophie reste modérée pour les muscles rapides fléchisseurs comme le tibialis ou l'EDL et pour les extenseurs rapides (gastrocnemius, plantaris, vastus) (Edgerton et Roy, 1996 ; Jiang et coll., 1992 ; Ohira et coll., 1992 ; Roy et coll., 1991 ; Thomason et Booth, 1990). Cette atrophie est due à une diminution de la section des fibres et non à une diminution du nombre de fibres (Templeton et coll., 1988). Cette atrophie est associée à une diminution de la concentration en protéines totales due à une augmentation du taux de dégradation et une diminution de la synthèse protéique (Edgerton et Roy, 1991 ; Goldspink et coll., 1986 ; Steffen et Musacchia, 1985, Thomason et coll., 1987a, 1989). Il a été clairement montré que la section des fibres musculaires dépend de l'activité des neurones α (Roy et coll., 1991), mais d'autres facteurs interviennent sans doute dans le développement de l'atrophie musculaire observée en HU. Ainsi, certaines hormones peuvent induire une atrophie ou une hypertrophie musculaire

(Grindeland et coll., 1994 ; Jakubiec et coll., 1999). Cependant diverses études ont démontrés qu'une réponse chronique au stress ne pouvait être impliquée dans ces transitions. S'il existe bien une hypertrophie transitoire des surrénales durant les premiers jours de suspension, aucune différence significative n'est mesurée après 14 jours d'HU (Fitts et coll., 1986). D'autres indicateurs de stress ne sont également pas modifiés pour de telles durée de HU (Desplanches et coll., 1987) telle la concentration en corticostérone qui ne présente qu'une augmentation transitoire correspondant aux trois premiers jours de suspension (Steffen et Musacchia, 1987). Des études sur le développement embryonnaire démontrent qu'il n'y a aucun stress chez la femelle gestante après 20 jours de suspension (Gharbi et coll., 1996). Les messages afférents interviennent également même s'ils ne sont pas les facteurs majeurs de cette atrophie (Picquet et Falempin, 2003).

D'une façon générale, l'HU entraîne une diminution des forces développées par les muscles lents (Asmussen et coll., 1989 ; Diffie et coll., 1991 ; Falempin et coll., 1990 ; Fitts et coll., 1986 ; Herbert et coll., 1988) alors que les niveaux de force musculaire ne sont pas modifiés pour les muscles rapides (Fitts et coll., 1986 ; Herbert et coll., 1988). La perte de force est due en grande partie à la baisse de tension délivrée par les fibres musculaires (Gardetto et coll., 1989). Les pertes de force sont plutôt attribuées à la diminution en protéines myofibrillaires (Thomason et coll., 1987) qu'à la réduction du nombre de ponts actine-myosine par unité de surface de fibre, ou l'augmentation de l'espace entre les filaments (Baldwin et coll., 1990). Un autre facteur affectant la force musculaire des muscles est la sensibilité calcique des fibres musculaires. Les fibres du soleus présentent des relations tension/pCa possédant des seuils d'activation calcique plus élevés après HU (Caiozzo et coll., 1994, 1996 ; Stevens et coll., 1990, 1993). Cette baisse de la sensibilité calcique est due en partie à l'expression d'isoformes rapides de protéines contractiles (MHC) et régulatrices de la contraction dans les fibres atrophiées (Caiozzo et coll., 1994, 1996 ; Campione et coll., 1993 ; Stevens et coll., 1993 ; Stevens et coll., 2002, Bastide et coll., 2002). La vitesse de raccourcissement des fibres de soleus est également augmentée et peut être associée aux modifications de l'expression des isoformes de MHC et de protéines régulatrices (Caiozzo et coll., 1994, 1996 ; Campione et coll., 1993).

Le muscle soleus lent se transforme en un muscle rapide alors que dans le même temps peu de modifications de l'expression des protéines contractiles sont observées dans les muscles rapides (tibialis anterior, plantaris, extensor digitorum longus, gastrocnemius) (Baldwin et coll., 1990 ; Diffie et coll., 1991 ; Reiser et coll., 1987). Cette transformation d'un phénotype lent en un phénotype rapide est caractérisée par une augmentation de la

proportion des fibres II au détriment des fibres I (Desplanches, 1987 ; Diffie et coll., 1991 ; Oishi et coll., 1998 ; Stevens et coll., 1999).

Cette transformation se traduit par une augmentation de l'isoforme IIA et une induction de l'isoforme II D/X qui n'est pas normalement exprimée dans le muscle soleus normal (Campione et coll., 1993 ; Diffie et coll., 1991 ; Leterme et coll., 1994 ; Oishi, 1993, 1994 ; Stevens et coll., 1999 ; Takahashi et coll., 1991) ainsi que de la MHC IIB (Caïozzo et coll., 1998 ; Cros et coll., 1999 ; Oishi et coll., 1998 ; Stevens et coll., 1999) dont l'expression est plus marquée pour des périodes de microgravité prolongée. L'expression de l'isoforme MHC I α (Pedrosa-Domello et coll., 1992 ; Peuker et coll., 1998) est également augmentée dans le soleus comme dans les muscles rapides et pourrait correspondre à une étape intermédiaire entre la MHC I β et la MHC IIA (Stevens et coll., 2000)

La régulation génétique de ces expressions montre que le transcript de la MHCI ne diminue pas significativement avec la protéine suggérant une dégradation importante de cette isoforme (Caïozzo et coll., 1996 ; Stevens et coll., 1999). L'évolution des transcripts des MHC rapides est sujette à controverse puisque certains auteurs ne mesure pas d'augmentation significative des transcripts des MHCIIA et IIB (Caïozo et al., 1996 ; Diffie et coll., 1991) alors qu'une augmentation parallèle des transcripts et des isoformes de MHC rapides a été démontrée dans le soleus de rat (Stevens et coll., 1999) avec des régulations géniques différentes entre les différentes isoformes.

Ces différentes études des transformations de MHC après microgravité et l'analyse de la forte augmentation du nombre de fibres hybrides suggèrent qu'il existe un schéma de transformation des MHC suivant la séquence MHCI \Leftrightarrow MHCIIA \Leftrightarrow MHC II D/X \Leftrightarrow MHCIIB comme cela a été décrit après électrostimulation pour la transformation rapide \rightarrow lent (Pette et Staron, 1997). Cependant l'identification de fibres hybrides MHCI/MHCIID (Caïozzo et coll., 1998 ; Haddad et coll., 1998 ; Talmadge et coll., 1996 ; Toursel, thèse 1999) semble indiquer que ce schéma séquentiel ne peut refléter la complexité et l'ensemble des transformations.

Cependant, les transformations ne se limitent pas aux seules MHC. Si peu de travaux font référence à la plasticité du réticulum sarcoplasmique et de ses composantes avec la microgravité, de nombreux résultats semblent indiquer que ce stock de calcium est également impliqué dans les transformations musculaires qui apparaissent après microgravité. Certains auteurs montrent que le demi-temps de relaxation (RT $\frac{1}{2}$) peut être altéré après 28 jours de HU dans le soleus de rat, en corrélation avec une forte augmentation de la SERCA du muscle

rapide (Schulte et coll., 1993). L'augmentation de l'expression de la SERCA du muscle rapide est très précoce puisqu'une augmentation de la transcription s'établit après 2 jours (Peters et coll., 1999) pour atteindre 75 % de l'expression d'un muscle rapide après 10 jours. Cependant la $RT_{1/2}$ n'est modifiée qu'après 28 jours de HU ce que semble indiquer que d'autres facteurs sont nécessaires à ces changements de durée de la contraction. Ainsi, il a été démontré que l'expression du DHPR dans le soleus atteignait après 28 jours d'HU des taux comparables à l'EDL (Kandarian et coll., 1992). Des études montrant que 15 jours d'HU augmentait la sensibilité du largage du calcium par le réticulum sarcoplasmique induit par la caféine et une accélération du recaptage du calcium par le RS suggèrent un effet de HU sur le niveau d'expression ou les caractéristiques du RyR (Stevens et Mounier, 1992) et sur la Ca-ATPase.

Le profil d'enzymes métaboliques est également modifié par la microgravité simulée. Une augmentation significative des enzymes glycolytiques (lactate deshydrogenase, phosphofructokinase, citrate syntase) est reportée dans le soleus alors que le taux de ces enzymes n'est pas modifié dans les muscles rapides. Le soleus acquiert donc des caractéristiques typiques d'un métabolisme de type glycolytique caractéristique des fibres rapides, mais cette conversion n'est pas complète même après 4 semaines (Fitts et coll., 1989). Le potentiel oxydatif des fibres atrophiées ne serait pas modifié puisque l'activité de certaines enzymes oxydatives (citrate synthétase et SDH) ou le nombre de mitochondries par unité contractile ne sont pas modifiés voire augmentés (Fitts et coll., 1989, Manchester et coll., 1990 ; Desplanches et coll., 1991). Une augmentation de la concentration en glycogène a été décrite dans le soleus en microgravité réelle ou simulée (Grichko et coll., 2000; Musacchia et coll., 1992; Fitts et coll., 2000).

Enfin un environnement microgravitaire augmente la fatigue musculaire : cette plus grande susceptibilité à la fatigue musculaire serait liée à une accélération de l'utilisation du glycogène et une diminution de la capacité à oxyder les graisses (Baldwin et coll., 1993 ; Caïozzo et coll., 1994). De telles observations chez le rat (Mc Donald et coll., 1992; Grichko et coll., 2000) ont été également effectuées après HU, i.e. une augmentation de la fatigabilité du soleus et une déplétion du glycogène en particulier dans les fibres de type I.

III. C. Quelles sont les voies intracellulaires impliquées dans cette plasticité musculaire ?

L'importance de la compréhension des mécanismes à la base de la plasticité musculaire et de leurs conséquences pour l'activité musculaire est évidente dans le cadre des pathologies neuromusculaires où pour de longues périodes d'immobilisation. Il est également reconnu qu'un exercice modéré a des effets bénéfiques sur divers paramètres de la santé comme le poids, la résistance etc..... La compréhension des mécanismes à la base de la plasticité musculaire pourrait donc permettre de comprendre certains facteurs intervenant dans le développement de pathologies comme le diabète, l'obésité, l'hypertension, l'hyperlipidémie (voir Booth et coll., 2002). L'étude des voies intracellulaires de signalisation impliquées dans la plasticité musculaire est actuellement en plein développement (Flück et Hoppeler, 2003 ; Taillandier et coll., 2003). Nous nous contenterons dans ce chapitre de faire une description rapide des principaux mécanismes mis en jeu.

Deux voies de transduction semblent très importantes dans ces mécanismes de transformation musculaire: la voie myogénine/MyoD et la voie calcineurine/NFAT (figure 22).

Les MRF (myogenic regulator factor) constituent un groupe de 4 protéines incluant la myogénine, MyoD, myf5 et MRF4. Ces MRF forment des hétérodimères avec les protéines E, une famille de protéines ubiquitaires de type bHLH (basic helix-loop-helix). Ces hétérodimères se lient à une séquence définie de l'ADN, l'E-box. Cette séquence se retrouve dans de nombreuses régions régulatrices des gènes des protéines comme les MHC I et MHC IIb. Le premier rôle des MRF est d'initier l'expression de protéines spécifiques du muscle après la fusion des myoblastes et des cellules satellites durant le développement de la fibre musculaire (Olson, 1993.). Cependant certains MRF en particulier la myogénine et MyoD semblent impliqués dans la régulation du phénotype des fibres musculaires (Hughes et coll., 1993). Le niveau d'expression du facteur de transcription myogénine est plus élevé dans le muscle lent alors que le facteur MyoD est plus important dans le muscle rapide (Hughes et coll., 1993). MyoD est fortement exprimé dans les cellules satellites du soleus alors que la myogénine est détectable dans les deux types cellulaires (Dupont-Versteegden et coll., 1998). Ce résultat pourrait indiquer que la fusion de cellules satellites permettrait une expression de MHC II dans les fibres lentes. MyoD serait impliqué dans le contrôle des gènes du métabolisme glycolytique alors que la myogénine serait impliquée dans l'expression des

gènes des fibres lentes, en particulier le gène de la MHCI (Olson , 1990 ; Hughes et coll., 1993). Ainsi l'altération du phénotype d'une fibre correspondrait à un changement du rapport MyoD/myogenine suite à une stimulation électrique ou hormonale (Hughes et coll.,1993). Il existe une accumulation nucléaire de ces facteurs de transcription myogénique dans la fibre mature après dénervation (Weis et coll., 2000 ; Walters et coll., 2000). Les muscles répondent très rapidement à une dénervation avec une augmentation des transcrits des facteurs MRF, MyoD et la myogenine (Walters et coll., 2000). Il a été démontré que le facteur de transcription MRF4 régulaient les gènes codant pour des protéines contractiles adultes et les sous unités du récepteur à l'ACh : ce facteur jouerait un rôle important dans la régulation des gènes dans la régénération musculaire comme après dénervation (Weiss et coll., 2000). Une augmentation du facteur MyoD sans variation de myogenine a également été observée après HU ce qui semble en accord avec la transformation d'expression des MHC observée dans ce modèle (Mozdziak et coll., 1999 ; Wheeler et coll., 1999) et le schéma proposé par Hughes et coll (1993). Si le rapport myogenine /MyoD du soleus est en accord avec l'augmentation de l'expression des MHC rapides, le rapport myogenine /MyoD de l'EDL n'est pas en accord avec l'expression des MHC détectées dans ce muscle après HU (Dupont –Versteegden et coll., 1998). Cette apparente contradiction pourrait être expliquée par l'augmentation du facteur Id-1, un régulateur négatif des MRF. MyoD et myogenine seraient impliqués plus particulièrement dans la régulation de la taille des fibres, le profil métabolique et l'expression des MHC en réponse à une modification de la commande motrice (Gundersen, 1998 ; Buonanno et coll., 1998 ; Dupont –Versteegden et coll., 1998). Cependant, des souris ne présentant pas d'expression de MyoD ont un taux de fibres rapides normal dans l'EDL (Hughes et coll., 1997), ce qui semble indiquer que la relation entre le rapport myogenine/MyoD et l'expression des MHC est plus complexe que ce qui avait été proposé dans le schéma de Hughes et coll (1993). Ainsi la surexpression de la myogenine dans des cellules musculaires de souris transgénique induit un changement d'expression des enzymes métaboliques sans changement dans l'expression des MHC (Hughes et coll., 1999). Des facteurs pourraient réguler l'effet de la myogenine ou de MyoD tels Mist1 ou MyoR (Lu et coll., 1999 ; Lemerrier et coll., 1997).

Le modèle de Hughes et coll (1993) ne peut donc à lui seul expliquer les changements d'expression observés dans le muscle (Flück et Hoppeler, 2003). Un modèle alternatif a été proposé : l'innervation du motoneurone induirait des mécanismes régulateurs de la transcription qui activeraient l'expression des gènes codant pour les protéines contractiles et les enzymes métaboliques (Buonanno et coll., 1998 ; Olson et Williams, 2000).

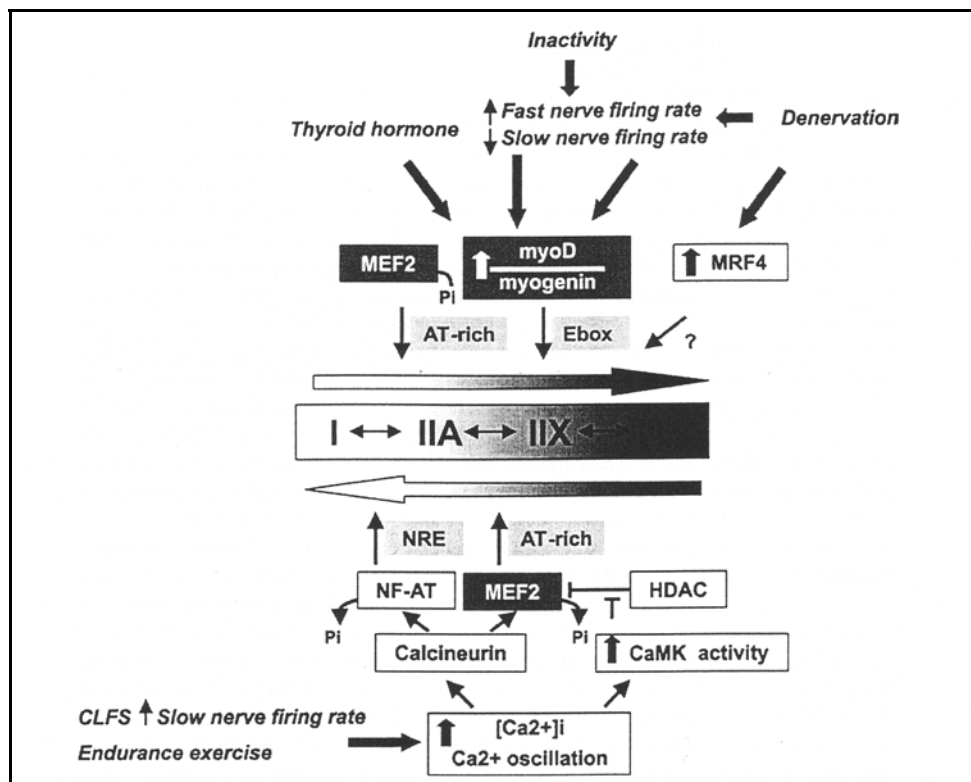


Figure 22 : schéma des régulations pouvant intervenir dans la transformation phénotypique des fibres musculaires (d'après Flück et Hoppeler, 2003).

Une deuxième voie d'importance a pu être mise en évidence dans le remodelage musculaire: la voie de la calcineurine (Olson et Williams, 2000, Schiaffino et Serrano, 2002 pour revues).

La calcineurine est une phosphatase serine/thréonine constituée d'une partie catalytique (calcineurine A) et d'une sous unité régulatrice (calcineurine B). La calcineurine peut fonctionner comme un calcium sensor puisqu'elle est activée par la calmoduline après qu'elle aît, elle-même, lié du calcium. La calcineurine a d'abord été démontrée comme très impliquée dans la régulation des gènes des cytokines dans les lymphocytes T. Il existe de nombreuses isoformes de calcineurine, qui affectent l'expression des gènes par déphosphorylation de substrats spécifiques, en particulier les facteurs NFAT (Nuclear factor of activated T-cells). Suite à leur déphosphorylation, les facteurs NFAT vont migrer du cytoplasme au noyau et activer les gènes cibles (Crabtree et Olson, 2002). L'activité de la calcineurine est elle-même contrôlée par des inhibiteurs intracellulaires comme la cain (cabin1), la MCIP (DSCR1). Il existe des inhibiteurs spécifiques de la calcineurine, la cyclosporine et la FK506. Plusieurs

protéines spécifiques des fibres musculaires lentes (sTnI, myoglobine, créatine kinase mitochondriale) contiennent des sites de liaison aux NFAT dans la région régulatrice de leur gène (Chin et coll., 1998). Divers arguments sont favorables à un rôle de la calcineurine dans le muscle (Abbot et coll., 1998) : des NFAT, NFAT4 et NFAT2, sont exprimés dans le muscle, leur expression est augmentée si l'on élève le calcium cytosolique et une translocation de ces

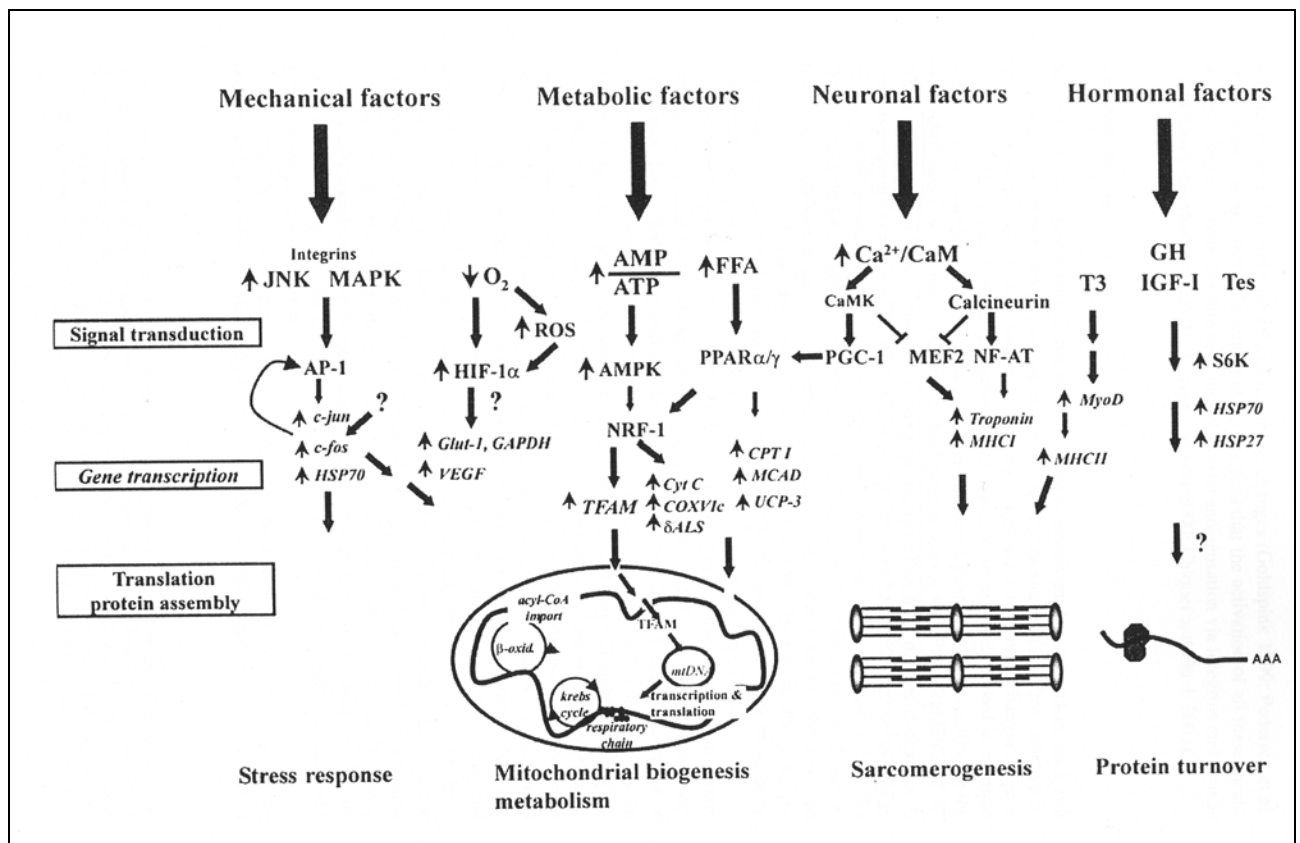


Figure 23 : Schéma intégrant les différents signaux provoquant une transformation de l'expression des gènes dans le muscle (d'après Flück et Hoppeler, 2003).

facteurs peut être démontrée. Il a été également démontré que l'administration de cyclosporine à des souris soumises à un exercice bloque la transformation des isoformes de MHC d'un phénotype rapide vers un phénotype lent (Dunn et coll., 1999). L'activité de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), une enzyme phosphorylante de NFAT dans le noyau et favorisant sa translocation vers le cytoplasme est diminuée lors de la stimulation de l'activité neuromusculaire (Markuns et coll., 1999). Ainsi, la régulation de la taille des fibres musculaires et de leur phénotype par la voie de la calcineurine a pu être démontrée dans de nombreux travaux à la fois in vivo et sur des cellules maintenues en culture (Chin et coll., 1998 ; Bigard et coll., 2000 ; Delling et coll., 2000 ; Naya et coll., 2000).

Une autre voie de signalisation, les facteurs de transcription de la famille MEF2 (myocyte enhancer factor 2) qui peuvent être activés par la CaMKinase, serait mise en jeu par la calcineurine (Wu et coll., 2001). Cette voie des MEF2 est également impliquée dans les transitions d'expression des MHC en mettant en jeu la CaMK (Allen et Leinwand, 2002). Des inter-connections entre les deux voies signalétiques de la calcineurine et des MRF ont récemment été mises en évidence. Ainsi le calcium et la calcineurine régulent l'expression du gène de la myogénine au niveau de la transcription. La calcineurine active MyoD en diminuant l'inhibition due à Id-1 et stimule MEF2 ce qui induit l'expression de la myogénine (Friday et coll., 2003). D'autres travaux montrent que la myogénine est une cible sous le contrôle des voies de la CaMK, de la calcineurine et de MAPK (Xu et coll., 2002).

Outre ces deux voies, d'autres mécanismes semblent impliqués dans la plasticité musculaire. Ainsi l'augmentation de l'activité contractile active la voie de la MAP kinase (Aronson et coll., 1997 ; Goodyear et coll., 1996 ; Sherwood et coll., 1999). Le rôle de la voie Ras-MAPK a pu être défini grâce à l'étude de la régénération musculaire chez des souris mutantes Ras (Murgia et coll., 2000). L'activation de la voie ERK (extracellular signal-regulated kinase), une voie majeure d'activation de la voie MAPK peut reproduire l'effet de la stimulation de motoneurones lents avec une augmentation de l'expression des MHC I et une diminution parallèle des MHCII.

La taille des fibres musculaires met en jeu un équilibre entre synthèse et dégradation protéique. Ainsi les voies contrôlant la synthèse protéique pourraient être impliquées dans le contrôle de l'hypertrophie musculaire. La voie de la kinase mTOR, qui est une cible de la rapamycine, active la kinase S6 et en inhibant la protéine 4^E-BP-1 stimule l'initiation de la translation des protéines (Schiaffino et Serrano, 2002 pour revue). mTOR est un effecteur de la kinase B sérine.thréonine (PKB) encore appelée Akt, dépendant de la kinase inositide 3 phosphate (PI3K). La voie PKB-mTOR a été démontrée comme une voie régulatrice de l'hypertrophie pouvant prévenir l'atrophie musculaire (Bodine et coll., 2001b ; Pallafacchina et coll., 2002) alors qu'elle semble sans effet sur le typage de la fibre (Pallafacchina et coll., 2002).

L'activation de la voie ubiquitin-proteasome, ainsi que la voie NF-kappa B est impliquée dans la perte de masse musculaire lors de l'atrophie ou de la non utilisation (Hunter et coll., 2002 ; Ikemoto et coll., 2001 ; Jagoe et coll., 2001 pour revue ; Taillandier et coll., 1996). Ainsi l'expression de deux ligases d'ubiquitin, spécifiques du muscle MURF1 (muscle ring finger 1) et MAFbx (muscle atrophy F box) est augmentée dans des stades

précoces de dégradation musculaire avant même le développement de l'atrophie musculaire, période pendant laquelle leur expression reste maintenue (Bodine et coll., 2001a ; Gomes et coll., 2001). Les voies de signalisation contrôlant ces gènes ne sont pas encore connues.

La modulation du nombre de noyaux d'une fibre musculaire est un moyen de contrôler la taille de la fibre et ses caractéristiques (Allen et coll., 1996). C'est la théorie du domaine myonucléaire soit le rapport cytoplasme/nombre de noyau. Ce domaine myonucléaire reste ainsi constant dans le cas de l'hypertrophie grâce à la fusion de cellules satellites. Différents facteurs vont stimuler la prolifération des cellules satellites, en particulier l'IGF1 qui est également un activateur de la voie calcineurine. Ainsi, l'expression d'un vecteur de IGF1 dans des myoblastes maintenus en culture ou l'exposition à IGF1 produit une hypertrophie accompagnée d'une augmentation de l'expression de la calcineurine et de sa localisation nucléaire (Musaro et coll., 1999 ; Semsarian et coll., 1999).

Comme décrit à la figure 20 de nombreux signaux seraient à l'origine de la modulation de l'expression des différents gènes musculaires (Flück et Hoppeler pour revue, 2003).

En conclusion, l'ensemble de ces données démontre que si le processus de contraction du muscle squelettique répond globalement au même schéma quelque soit le type de muscle, la mise en jeu de nombreuses isoformes différentes de protéines motrices et régulatrices est à l'origine de la diversité des fibres musculaires, de leur spécialisation fonctionnelle. En outre cette diversité de protéines permet une plasticité et une adaptation des propriétés du muscle à de nouvelles conditions physiologiques lors d'une adaptation physiologique ou lors du développement d'une pathologie. Les travaux qui sont présentés dans ce manuscrit visent à mieux comprendre la capacité d'adaptabilité du système musculaire face à une situation nouvelle et d'appréhender les conséquences fonctionnelles de ces transitions phénotypiques. Si les MHC sont considérées comme des marqueurs précoces de la plasticité musculaire et impliquées dans les changements de cinétique de contraction observés lors de l'atrophie musculaire, les transitions d'expression de MHC ne permettent d'expliquer l'ensemble des changements de propriétés contractiles des fibres musculaires observés lors de l'atrophie. Qu'en est-il du RyR à l'implication fondamentale dans le couplage-excitation contraction et des protéines régulatrices de la contraction qui permettent une modulation fine de la contraction musculaire ? Peu de données étaient disponibles dans la littérature à l'entame de ces travaux.

RESULTATS

Le système musculosquelettique présente une plasticité remarquable caractérisée par une adaptation de ses propriétés structurales et fonctionnelles à différents types et degrés de stimuli. Parmi de nombreux stimuli possibles, l'un d'entre eux a des conséquences sévères sur le tissu musculaire. Il s'agit de la condition d'hypodynamie-hypokinésie (HU), une situation expérimentale où, d'une part, se trouve supprimée la charge corporelle sur les membres et, d'autre part, l'activité motrice est fortement réduite. Ce type de situation conduit au développement d'une atrophie musculaire dite fonctionnelle, rencontrée en microgravité (réelle ou simulée) ou dans certaines immobilisations et pathologies. Cette atrophie est caractérisée par une perte de masse et de force musculaires, plus nettement marquées sur les muscles posturaux et tout spécialement sur les muscles lents tels que le soleus. En outre, une conversion structurale et fonctionnelle des muscles lents vers un phénotype de muscle rapide est classiquement observée.

Sur cette base, les travaux réalisés par notre laboratoire au cours de ces dernières années ont eu pour **objectifs** d'étudier la plasticité des propriétés musculaires et les interactions entre systèmes nerveux et musculaire lors d'atrophies fonctionnelles ou de dysfonctionnements neuromusculaires d'origine pathologique ou expérimentale (déafférentation - déefférentation). Les études portent sur les modifications du contrôle sensori-moteur de la contraction musculaire **et sur le fonctionnement, à l'échelon moléculaire, des protéines contractiles et du réticulum sarcoplasmique.**

Nous tentons donc de répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les conséquences d'une situation d'hypodynamie-hypokinésie sur le système musculosquelettique ? Sur les protéines clés de la contraction musculaire ?
- Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la plasticité des protéines contractiles ?

I. Le RYR.

Le travail mécanique produit par les cellules musculaires et qui met en jeu les protéines contractiles est déclenché par une libération importante et rapide du Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarcoplasmique (RS) mettant en jeu un canal calcique sélectif présent dans la membrane du RS encore appelé récepteur de la ryanodine, un alcaloïde qui modifie spécifiquement le fonctionnement de ce canal .

Dans le cadre des travaux du laboratoire concernant l'atrophie musculaire et les modifications fonctionnelles du muscle atrophié, j'ai développé un nouvel axe d'étude concernant le canal calcique du RS, ses régulations et sa plasticité.

Les expériences sont réalisées à partir de canaux, contenus dans des fractions vésiculaires enrichies en membrane dérivées du réticulum sarcoplasmique qui sont fusionnées dans des bicouches lipidiques planes, étudiés en conditions de patch clamp.

L'activité électrique élémentaire des canaux (probabilité d'ouverture, constante de temps d'ouverture et de fermeture, conductance) est étudiée après amplification, numérisation et acquisition des signaux en utilisant des logiciels adaptés (Axon Instruments): les protocoles expérimentaux ont été mis au point lors d'études préliminaires que nous avons réalisées au laboratoire (voir Catinot et coll., 1997, 1998).

Nous avons également étudié la liaison de la ryanodine tritiée sur le récepteur, afin d'étudier les propriétés des canaux lorsque le matériel biologique était en quantité insuffisante: la ryanodine se fixe sur des sites internes du pore du canal ce qui permet de faire une étude de l'expression de la protéine mais également de sa probabilité d'ouverture et donc de son activité canalaire.

**Fonctionnement du canal de largage
calcique du réticulum sarcoplasmique (RS)
dans le muscle lent et rapide**

Le transcript du récepteur de la ryanodine squelettique est identique dans le muscle lent et rapide (Otsu et coll., 1990). Pourtant, si les récepteurs de la ryanodine semblent biochimiquement identiques dans le muscle lent et rapide, leurs propriétés fonctionnelles diffèrent. Ainsi, le niveau initial de libération de calcium induit par le calcium ou la caféine est plus faible pour les canaux calciques du récepteur de la ryanodine du muscle lent que pour ceux du muscle rapide (Stevens et Mounier, 1992). Les capacités de largage du calcium différentes entre muscle lent et muscle rapide pourraient rendre compte des cinétiques de mise sous tension différentes (Salviati et Volpe, 1988).

Des expériences réalisées sur fibres pelées ont montré que le canal calcique du RS de muscle lent semblait avoir une plus grande affinité pour la caféine et une moindre affinité pour la ryanodine et le rouge de ruthénium que le muscle rapide (Salviati et Volpe, 1988). Pourtant, des expériences réalisées sur des fractions membranaires de SR montrent que la dépression calcique produite par la ryanodine est 2 à 4 fois plus sensible à la caféine, le calcium et le magnésium dans les muscles rapides que pour les muscles lents (Su et coll., 1995). D'autres auteurs ont montré qu'il existait peu de différence de sensibilité de la fixation de la ryanodine, dans les conditions normales et en présence d'activateur du RyR, sur un muscle lent ou rapide. Ces auteurs montrent néanmoins que le canal calcique du muscle lent est caractérisé par une plus faible probabilité d'ouverture que dans le muscle rapide (Lee et coll., 1991)

Les comparaisons entre l'activité et la sensibilité du canal calcique du RS de muscle lent et rapide apparaissent donc souvent contradictoires, peut-être à cause de l'hétérogénéité des techniques utilisées, sans que l'on puisse clairement déterminer si les caractéristiques contractiles des muscles lents et rapides sont attribuables à une propriété ou une régulation particulière du canal calcique du RS. Nous avons analysé les propriétés électrophysiologiques du RyR dans le muscle en utilisant la technique de bicouche lipidique. *Ces travaux sont présentés dans l'article paru dans Pflügers Archiv, intitulé : » Single-channel properties of the sarcoplasmic reticulum calcium-release channel in slow- and fast-twitch muscles of rhesus monkeys »(Bastide et Mounier, 1998).*

En résumé, nous avons tout d'abord effectué une analyse de l'activité électrophysiologique du RyR dans deux types de muscles fonctionnellement différents : muscle lent (soleus) et muscles rapides (gastrocnemius et EDL), chez le rat et le singe. Ces deux animaux ont été retenus pour notre étude d'une part, parce que nous pouvons obtenir, dans le cas du rat, des biopsies de muscles atrophiés (microgravité simulée), et d'autre part parce que nous avons pu disposer dans le cas du singe de matériel biologique en quantité plus importante. Si le rendement d'obtention de canaux est très faible pour le muscle lent, ce qui est en accord avec la plus grande densité de canaux calciques mesurée dans le muscle rapide comme le gastrocnemius, *nos résultats démontrent que les canaux calciques du RS de muscles lents et rapides présentent des caractéristiques très voisines, contrairement à ce qui avait été proposé chez le lapin (Lee et coll., 1991). Par contre, nos résultats sont en accord avec ceux de Damiani et Margreth (1994) montrant que les canaux calciques de muscles lents et rapides correspondent à une même protéine.* Ainsi, l'étude de la sensibilité calcique de ces canaux nous a permis de montrer que le canal calcique du muscle rapide, de même que 82 % des canaux du muscle lent, présentent des caractéristiques comparables de sensibilité au Ca^{2+} et à la caféine. Cependant, certains canaux de muscle lent présentent des propriétés spécifiques. En effet, pour 18 % d'entre eux l'activité n'apparaît pas influencée par la concentration calcique et est caractérisée par une probabilité d'ouverture toujours nettement supérieure à celle de tous les autres canaux.

Sachant qu'une isoforme du récepteur ryanodine RyR₃ (classiquement exprimée dans le cerveau) a été détectée dans le muscle lent et dans le diaphragme (Conti et coll., 1996 ; voir article suivant), sa co-expression avec RyR₁ pourrait être à la base des différences d'activité du canal calcique de muscles lents et rapides. Cette isoforme pourrait être impliquée ainsi que RyR₁ dans la plasticité musculaire après atrophie. C'est le thème qui sera abordé dans le travail suivant.

Plasticité du RyR après atrophie musculaire

Très peu de travaux se rapportent à l'étude de la plasticité du RS en apesanteur ou en situation de "disuse" sur des modèles au sol. Dans les conditions normales, il est connu que le degré de développement du RS est différent selon le type de muscles ; des relations ont été décrites entre la vitesse de contraction et de relaxation des contractions musculaires et l'importance du développement du RS. Celui-ci apparaît en effet plus important sur les muscles rapides, avec une capacité de pompage du calcium et une quantité de Ca-ATPases plus fortes, que sur les muscles lents (Martonosi, 1982). Des perturbations des mouvements de calcium au niveau du RS, de même que des altérations ultrastructurales de la membrane du RS ont été décrites dans des cas de dystrophies ou de dénervation (Martonosi, 1972 ; Salvatori et coll., 1988 ; Takekura et coll., 1996). Dans les mêmes conditions d'hypodynamie-hypokinésie, un accroissement de la capacité de pompage mais aussi un renforcement du largage calcique ont été mesurés sur le soleus, ces deux fonctions devenant alors proches de celles d'un muscle rapide (Stevens et Mounier, 1992). Des études menées sur le rat ont décrit des changements importants de l'activité du canal calcique du RS après 14 jours de dénervation (Delbono et Chu, 1995). Si la conductance du canal reste inchangée, le canal calcique du RS de muscles rapides de rats dénervés présente une forte altération de sa sensibilité au calcium puisqu'il reste activé même en présence de concentrations millimolaires de calcium tandis que le canal de rats normaux est inactivé à de telles concentrations calciques. Ces altérations pourraient expliquer certaines particularités contractiles des muscles squelettiques après dénervation et semblent indiquer que des protéines régulatrices du canal calcique du RS présentent une certaine plasticité ou que l'expression d'isoformes du canal calcique du RS de type squelettique dépend de l'état d'innervation.

Nous avons voulu déterminer si des changements dans la régulation du canal pouvaient intervenir lors de l'atrophie musculaire, comme cela a été observé après dénervation , ce qui pourrait expliquer certaines caractéristiques contractiles du muscle lent et rapide après atrophie telle l'augmentation de la cinétique de contraction. Une analyse de l'expression des différentes isoformes de RyR et la plasticité de cette expression au cours de l'atrophie ont également été envisagée en mettant en place une collaboration avec le laboratoire dirigé par le professeur V. Sorrentino (DIBIT, Milan, Italie). Ce laboratoire est plus particulièrement spécialisé dans l'étude du récepteur RyR₃.

Ces travaux sont présentés dans l'article paru dans Biochemical Biophysical Research Communications, intitulé : « Properties of ryanodine receptor in rat muscles submitted to unloaded conditions » (Bastide et coll., 2000).

Nos résultats démontrent que la variation d'expression des isoformes de RyR du muscle squelettique permet une plasticité à l'origine de modification fonctionnelle de l'activité contractile des fibres squelettiques sans qu'il y ait de changement des propriétés intrinsèques du canal calcique. Deux points essentiels méritent d'être soulignés.

Après isolement des vésicules des citernes terminales du RS, on observe une augmentation du rendement protéique pour le soleus atrophié par rapport au contrôle qui devient proche de celui caractéristique de préparations de muscles rapides. *Ces résultats indiquent qu'il existe une prolifération du RS dans le muscle soleus atrophié après HH.*

Cependant, le profil électrophorétique des vésicules isolées à partir de muscles soleus contrôle et atrophié de rat ne révèle pas de différence significative du taux de RyR₁ après deux semaines de HU. C'est seulement après quatre semaines de HU que le taux de RyR₁ dans le soleus atrophié augmente. *Parallèlement à l'augmentation de RyR₁, une diminution du taux de RyR₃ peut être mesurée dans le muscle soleus après HU. La composition en RyR du soleus se rapproche donc de celle d'un muscle rapide adulte où l'isoforme RyR₃ n'a pas été mise en évidence.* De plus, les caractéristiques du canal calcique avant et après HU ont été déterminées en étudiant la liaison de la ryanodine tritiée sur le récepteur ryanodine. Aucune modification des propriétés du canal n'a pu être observée après HU. *Par conséquent, les transformations du RyR apparaissent plus lentes que le changement d'expression des protéines contractiles. Enfin, nos résultats démontrent que l'expression de l'isoforme RyR₃ dans le muscle squelettique peut être régulée par l'activité musculaire et l'innervation contrairement à ce qui avait été proposé dans des travaux antérieurs (Péréon et coll., 1997).*

Régulation de RyR₁ par l'ADPr

Le rôle clé de l'isoforme RyR₁ dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique a été clairement illustré ces dernières années. La démonstration de l'existence d'une coexpression des isoformes RyR₁ et RyR₃ dans le muscle squelettique et plus particulièrement dans le soleus et le diaphragme amène à s'interroger sur le rôle de l'isoforme RyR₃ qui est très faiblement exprimée par rapport à RyR₁. Si un rôle direct de cette isoforme dans le couplage excitation-contraction a pu être exclu, son rôle dans l'activité contractile de la fibre squelettique doit être envisagé.

De plus, nos résultats démontrent que l'expression de RyR₃ peut être modulée par l'activité musculaire. Nous souhaitons mieux comprendre l'importance de l'expression de RyR₃ et son rôle éventuel dans les propriétés contractiles du muscle squelettique dans les conditions normales et lors de dysfonctionnements liés à l'atrophie musculaire (HU). Ce type d'étude peut être réalisé en étudiant la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) sur des fibres musculaires pelées en considérant tout particulièrement la sensibilité des fibres à des métabolites intracellulaires activateurs ou inhibiteurs du canal calcique du RS. A cet effet, il a été nécessaire de développer l'étude de molécules permettant de discerner l'implication des deux isoformes de RyR dans l'activité contractile. Dans un premier temps, nous avons considéré l'ADPribose cyclique (cADPr): l'effet du cADPr et de son analogue l'ADPr sur l'activité du RyR reste controversé. Ce métabolite, présenté comme un activateur de la libération du calcium à partir de microsomes isolés de cœur ou de cerveau (Sitsapesan et Williams, 1995; Lee, 1997), est un activateur de RyR₃ (Sonnleitner et coll., 1998) mais ne semblerait pas mettre en jeu l'isoforme RyR₁ (Copello et coll, 2001; Fruen et coll., 1994). Cependant, l'activation directe de RyR₁ par le cADPr et ses métabolites reste controversée, certaines études démontrant un effet activateur du seul cADPr (Morrissette et coll., 1993) quand d'autres études semblent indiquer que le cADPr et ses métabolites peut activer le RyR mais seulement à des concentrations millimolaires de calcium (Sitsapesan et Williams, 1995) ou bien être sans aucun effet. Il apparaît donc intéressant de voir si la présence de RyR₃ dans la fibre squelettique lente peut conférer à cette fibre musculaire une sensibilité particulière à l'ADPr et permettre de discerner un rôle effectif de RyR₃ dans l'activité contractile. Cependant, il est nécessaire de reconsidérer la spécificité de cette molécule en particulier de reconsidérer la sensibilité de RyR₁ à ce type de molécule dans des conditions où la concentration en calcium est bien contrôlée et plus spécialement pour des concentrations micromolaires de calcium.

Ces travaux ont donné lieu à la publication parue dans Biochemical Biophysical Research Communications, intitulée : » ADP-ribose stimulates the calcium release channel RyR₁ in skeletal muscle of rat » (Bastide et coll., 2002).

En résumé , nous démontrons dans ce travail que l'ADP-ribose est un activateur de RyR₁ contrairement à ce qui avait été proposé dans des travaux antérieurs. Cette activation qui semble mettre en jeu le site de liaison de l'ATP est observée à des concentrations micromolaires de calcium intracellulaire. Le délai nécessaire pour que la molécule produise son effet pourrait indiquer que l'ADP-ribose induit un changement conformationnel de la protéine qui augmente la sensibilité du canal au Ca²⁺.

L'ADP-ribose ne peut permettre de différencier l'activité due à RyR₁ ou RyR₃. Nous avons donc développé l'étude pharmacologique de molécules qui pourraient permettre de différencier le rôle des deux isoformes de RyR exprimées dans le soleus. A cet effet, nous avons abordé l'étude du mode d'action de molécules « calcium sensitizer » sur l'activité du RyR, tels le bépridil, le compound 4880 et la trifluoroperazine. Ces molécules ont des effets inotropes positifs mettant en jeu une augmentation de la sensibilité calcique des protéines contractiles. Cette étude permettra donc de mieux appréhender le rôle d'une activation du canal de largage calcique dans l'effet inotrope positif mesuré en présence de ces molécules.

II. Les protéines régulatrices

**Effets de la microgravité réelle ou
simulée sur l'expression protéique et les
propriétés d'activation calcique liées à la
TnC**

L'augmentation de la concentration calcique myoplasmique nécessaire à la contraction musculaire est détectée par une protéine régulatrice, la TnC, qui possède des sites de fixation pour les ions Ca^{2+} . Il existe deux isoformes de cette protéine, une lente (sTnC) et une rapide (fTnC) respectivement spécifiques des fibres musculaires lentes et rapides. Les deux isoformes de TnC diffèrent au niveau de leur domaine régulateur aminoterminal. La TnC rapide possède en effet deux sites calciques régulateurs fonctionnels (sites I et II) alors que pour la TnC lente, seul le site II est actif. Le rôle clé de la TnC dans la régulation de la T/pCa a été mis en évidence par de nombreux auteurs, notamment par des techniques d'extraction-remplacement (Moss et coll., 1986 ; Gulati et coll., 1988) et l'utilisation de mutants (Sheng et coll., 1990).

Nous avons mentionné précédemment que les conditions de microgravité simulée ou réelle induisent une modification des caractéristiques des muscles posturaux dans le sens lent → rapide. Si l'étude des modifications d'expression des MHC a donné lieu à de nombreux travaux, peu de choses sont connues quand à la plasticité des protéines régulatrices de la contraction et de ses conséquences bien que le rôle clé de ces protéines dans la régulation de la contraction musculaire ait été démontré. Afin d'examiner une possible transformation de la TnC lente du soleus lorsque celui-ci s'atrophie en conditions d'HU, nous avons utilisé une molécule " Ca^{2+} sensitizer", le bépridil (BPD), connue pour cibler son effet sur le domaine amino-terminal de la TnC en augmentant son affinité calcique. Ainsi, des travaux effectués au laboratoire ont démontré un effet différentiel du BPD entre des fibres lentes et rapides (Kischel et coll., 1999). Nous pouvions donc nous attendre à observer une action différente du BPD en fonction de l'isoforme de TnC exprimée (selon qu'1 ou 2 sites étaient impliqués) et détecter ainsi, par un outil pharmacologique, des variations d'expression de cette protéine et leurs répercussions fonctionnelles. La technique des fibres pelées (perméabilisation du sarcolemme) permet de rendre accessible aux ions les protéines myofibrillaires et de maîtriser la concentration calcique les environnant. Ainsi, la relation entre le niveau de tension développé en fonction du taux de Ca^{2+} libre (relation T/pCa) permet de déterminer certaines caractéristiques du fonctionnement des protéines contractiles : la sensibilité calcique (seuil d'activation), l'affinité calcique (pCa_{50}), et la coopérativité entre les sites calciques de la TnC et/ou entre les différentes protéines régulatrices du filament fin (pente de la relation). Ces

paramètres permettent de distinguer fonctionnellement les fibres lentes des fibres rapides (Mounier et coll., 1989). Ces expériences ont été complétées par une identification immunohistochimique. *Ces travaux sont présentés dans l'article intitulé : » Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading » publié dans the Journal of Applied Physiology (Kischel et coll., 2001).*

En résumé, sur des muscles soleus contrôles, la sTnC est exprimée de façon largement dominante (88 %) par rapport à la fTnC (12 %). Les fibres lentes, qui n'expriment que de la sTnC, sont prédominantes (74%, n=80) alors que les fibres hybrides lentes (sTnC>fTnC) et rapides (fTnC>sTnC) représentent respectivement 10 et 16%. Après HU, l'expression de la fTnC est accrue, atteignant 22 % au détriment du taux de sTnC. Cependant, aucune fibre n'exprime la fTnC seule. Le pourcentage de fibres lentes pures (sTnC seule) est réduit (45%). *Le fait essentiel après HU est une augmentation de la proportion de fibres hybrides rapides (45%, n=88) coexprimant la sTnC et la fTnC (fTnC>sTnC).* Le pourcentage de fibres hybrides lentes reste inchangé (10%). L'expression de la fTnC correspond toujours à une coexpression avec de la sTnC, ce qui semble indiquer que les transitions d'expression des TnC restent limitées.

Les fibres hybrides lentes présentent des caractéristiques identiques aux fibres lentes dans les conditions contrôles, ce qui indique que la présence de fTnC minoritaire est sans influence sur les caractéristiques calciques de ces fibres.

Les fibres demeurées lentes après HU (avec sTnC seule) acquièrent des caractéristiques d'activation calcique différentes de celles des fibres contrôles avec une diminution de la sensibilité calcique mais une augmentation de la coopérativité ce qui suggère que les changements observés sur ces fibres ne peuvent être attribués à la molécule de TnC et que d'autres protéines régulatrices doivent participer à la plasticité fonctionnelle après HU.

Nous avons donc décidé d'étudier la plasticité d'expression des troponines après HU.

**Mise en évidence du ciblage spécifique du
bépridil sur la molécule de TnC.**

Des études menées au laboratoire ont permis de montrer que la relation T/pCa obtenue en présence de bépridil est caractéristique de l'isoforme de TnC exprimée par la fibre (Kischel et coll., 1999). Ceci n'exclut pas que d'autres protéines régulatrices interviennent dans le processus régulateur enclenché par la TnC. La TnC n'est pas l'unique protéine régulatrice affectée par la microgravité : il a été démontré sur muscle que les MLC, TnT et TnI subissaient aussi des changements plus ou moins rapides (Campione et coll., 1993). Quelle est, dès lors, la contribution exacte de la TnC dans le processus de transformation induit par les conditions d'HU ? Afin de déterminer si l'effet du bépridil était dû uniquement à l'isoforme de TnC, et de mettre en évidence le rôle intrinsèque de la TnC dans les changements fonctionnels observés après HU, nous avons réalisé des expériences d'extraction-remplacement de la TnC avec l'utilisation de TnC recombinantes produites chez E.Coli, en collaboration avec laboratoire du Pr J. Potter (Université de Miami, USA). Nous avons choisi d'extraire la TnC lente de fibres lentes (les plus affectées en microgravité ou HU) et de la remplacer par une isoforme rapide. Cette situation expérimentale mime l'effet de la microgravité sur la TnC (conversion lent → rapide), sans toutefois changer les autres protéines régulatrices participant à l'établissement de la relation T/pCa. L'extraction sélective de TnC a été réalisée par des protocoles classiques (Gulati et coll., 1988, Allhouse et coll., 1999). La TnC lente extraite est remplacée par de la TnC rapide purifiée à partir de muscles rapides. Des études complémentaires ont été faites avec extraction-remplacement de TnC de fibres rapides par de la TnC cardiaque et de la TnC mutante VG2, qui ne possède que le site I, le site II étant muté et non fonctionnel. Après remplacement, les relations T/pCa et T/pSr sont établies en absence et présence de bépridil. La composition en TnC des différents fragments est ensuite testée par immunoblotting. Cette étude électrophorétique permet également de déterminer si le protocole expérimental ne provoque pas l'extraction d'une autre protéine contractile.

Les résultats de ces études sont présentés dans l'article publié dans *British Journal of Pharmacology* intitulé : « *The role of the Ca²⁺ regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca²⁺ sensitizer bepridil* » (Kischel et coll., 2000).

Dans ce travail, les TnC lentes et les TnC rapides ont été remplacées respectivement par les TnC recombinantes rapides et lentes. Des fibres rapides reconstituées avec de la TnC cardiaque de souris (lente) présente une forte réactivité au bépridil, dépendante de la concentration en Ca^{2+} , caractéristique d'une fibre lente, alors qu'une fibre lente reconstituée avec de la TnC rapide de poulet présente une réactivité plus faible, indépendante de la concentration en Ca^{2+} . *Nos résultats démontrent que l'effet du BPD est spécifique de l'isoforme de TnC présente et cible bien le domaine amino-terminal de la molécule.*

Les expériences réalisées avec la TnC mutante VG2, qui ne possède que le site I fonctionnel, le site II étant muté et non fonctionnel, démontrent que *le bépridil peut exercer son effet en absence de site II*. Par contre, *le site I est nécessaire pour que l'effet du BPD soit indépendant de la concentration en calcium*. De plus, le renforcement de l'affinité calcique observé en présence de bépridil est dépendant du nombre de site régulateur fonctionnel, cet effet étant plus fortement marqué quand un seul site régulateur est fonctionnel (site I ou site II).

Les précisions apportées par nos travaux sur le mode d'action du BPD pourraient permettre de développer d'autres molécules ciblant spécifiquement la TnC, qui seraient particulièrement utiles dans le cadre de pathologies cardiaques (insuffisance cardiaque) et musculaires squelettiques (atrophies fonctionnelles). En outre, nos résultats démontrent clairement que la TnC est responsable de la sensibilité de la fibre musculaire au Sr^{2+} et au Ca^{2+} .

Pattern d'expression des troponines dans le soleus de rat après HU

Nous avons démontré que parmi les troponines, protéines régulatrices de la contraction, l'expression de la troponine C était modifiée après HU, les fibres de soleus transformées acquérant alors de la TnC rapide. Cependant nos résultats (notamment l'augmentation de la pente de la relation T/pCa) indiquent que d'autres protéines régulatrices sont vraisemblablement impliquées dans les changements des propriétés contractiles des fibres de soleus transformées. Nous avons considéré en premier lieu les changements d'expression de la troponine T, dont le rôle des différentes isoformes dans la sensibilité calcique des fibres musculaires a déjà été suggéré (Schachat et coll., 1987).

La troponine T existe sous de nombreuses isoformes chez le rat (Sabry et Dhoot, 1991a et b). On dénombre deux TnT spécifiques dans le muscle lent, les sTnT1 et sTnT2, et quatre isoformes de TnT dans le muscle adulte rapide, les fTnT1, fTnT2, fTnT3, fTnT4. Il a été montré que cette hétérogénéité résultait d'épissages alternatifs au niveau de mini-exons du gène de la fTnT.

La troponine T a un rôle important dans la régulation des interactions actine-myosine. Elle fixe le complexe des troponines à la tropomyosine et participe au changement conformationnel qui est à l'origine de l'interaction actine-myosine quand le calcium se lie à la troponine C. Des travaux montrent que l'expression des TnT présente une plasticité lors d'électrostimulations réalisées chez le lapin (Härtner et coll., 1989), et que des isoformes rapides de TnT peuvent être exprimées dans le soleus après HU (Campione et coll., 1993), sans qu'une analyse détaillée des différentes isoformes de TnT n'ait été envisagée dans ces derniers travaux.

Dans un premier temps, nous avons considéré précisément les variations d'expression de la TnT observées après différents temps d'HU dans le soleus de rat. La corrélation entre les expressions d'isoformes de TnT, TnI et TnC et l'expression des MLC et des MHC permet de définir s'il existe réellement des programmes coordonnés d'expression des protéines contractiles au niveau de la fibre musculaire.

Les résultats ont fait l'objet d'une publication intitulée : » Time-dependent changes in the expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle » publiée dans American Journal of Physiology (Stevens et coll., 2000).

Ainsi, l'étude du pattern d'expression des sous unités de la troponine réalisée après 7, 14, 28 jours d'HU permet de démontrer que des périodes d'HU ont des effets importants sur la composition en troponine du muscle. Dans l'ensemble, ces changements d'expression répondent à une transition des troponines, d'un phénotype lent vers un phénotype rapide. Cependant le décours temporel et l'intensité de ces transformations sont très différents suivant la protéine considérée : les TnT sont les protéines les plus sensibles à ces transformations en comparaison des TnI puis des TnC. Ainsi l'expression d'isoformes rapides de TnI et de TnC est augmentée parallèlement à la diminution de l'expression de l'isoforme lente. Par contre, une augmentation très importante de l'expression des fTnT est observée, de nouvelles isoformes étant nouvellement exprimées dans le soleus. Dans le même temps, des réarrangements importants entre les isoformes lentes et les isoformes rapides de TnT sont mesurés. Ces réarrangements peuvent être associés aux changements d'expression mesurés dans les mêmes muscles (Stevens et coll., 1999). L'augmentation de la fTnT1 suit l'augmentation de la MHC IId et la fTnT4 augmente en parallèle avec l'apparition de la MHC I Ib alors que la fTnT3 diminue suivant le même schéma que la MHC IIa. De plus, nous n'observons pas un changement uniforme des isoformes rapides et lentes des différentes troponines ce qui suggère une régulation différente des isoformes lentes et rapides en réponse à la période de HU. Ainsi l'expression des sTnT est peu altérée, même après 28 jours d'HU ce qui suggère que l'expression des sTnT est sous la dépendance d'un programme intrinsèque et peu dépendante de l'activité neuromusculaire comme cela a été proposé après dénervation. La TnI présente également des modifications importantes puisque l'isoforme lente diminue de 40 % après 28 jours par rapport à son niveau initial. La diminution lente de la sTnI et l'augmentation rapide de la fTnI semblent donc régulées de façon indépendantes.

**Implication de la TnT dans la modulation
de la réponse contractile et la coopérativité
au sein du filament fin**

Nous avons poursuivi cette étude au niveau de la fibre musculaire afin d'établir une corrélation entre l'activité fonctionnelle de la fibre, sa composition en chaînes de myosine et en protéines régulatrices, TnC, TnT et TnI. A cet effet, nous avons développé l'utilisation d'une coloration non fixante (Sypro Orange) aussi sensible que la technique de coloration au nitrate d'argent, permettant de révéler les protéines exprimées dans les fibres musculaires après séparation sur gel SDS PAGE. Nous pouvons ainsi contrôler, à partir du même gel, le type de fibre étudiée par l'expression de ses MLC et analyser ensuite l'expression des protéines régulatrices par immunoblot à l'aide d'anticorps spécifiques des isoformes rapides et lentes de TnI, TnC et TnT (en collaboration avec le laboratoire de D. Pette, Allemagne), d'un anticorps monoclonal dirigé contre les sTnT(laboratoire de JP Jin, USA).

Cette approche, au niveau de la fibre musculaire, permet de mieux comprendre les coexpressions possibles des différentes protéines contractiles et régulatrices, et leurs conséquences sur le fonctionnement de la fibre musculaire. Ces études ont permis de déterminer si des coexpressions d'isoformes lentes et rapides de TnT pouvaient coexister sur une même fibre comme nous l'avons montré pour la TnC, et de définir les combinaisons possibles d'expression des isoformes lentes et rapides de TnT, TnI et TnC. De telles combinaisons signifient que les cellules musculaires ont à leur disposition un système extrêmement performant leur permettant de moduler finement la sensibilité de leur machinerie contractile au calcium.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée : « Expression and functional implications of TnT isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading », parue dans Pflügers Archives (Bastide et coll., 2002).

Basée sur l'expression des TnT, quatre populations de fibres ont pu être discernées dans le soleus contrôle. Les fibres lentes expriment essentiellement des isoformes lentes de TnT et de protéines régulatrices et sont prédominantes dans le soleus contrôle (58 %). Nous avons identifié sans ambiguïté une troisième isoforme de TnT lente ce qui suggère que la diversité des sTnTs pourrait être plus importante que ce qui a été décrit jusqu'à présent et être proche de celle des fTnT. Les fibres hybrides lentes (16%) pour la TnT, diffèrent des fibres lentes par l'expression de deux isoformes de fTnT. Les fibres hybrides rapides (22%) expriment à la fois des isoformes lentes et rapides de TnT et de protéines régulatrices, les fTnT étant prédominantes. Les fibres rapides (8%) n'expriment que des fTnT.

Après HU, deux populations prédominantes de fibres peuvent être discernées : les fibres rapides (55%) et les fibres lentes (41%). L'étude des caractéristiques contractiles démontre que l'expression de TnT rapides dans un environnement de protéines contractiles et régulatrices lentes confèrent aux courbes T/pCa des pentes élevées caractéristiques des fibres rapides. Par contre, l'expression de sTnT dans les fibres hybrides rapides ne module pas la coopérativité qui est similaire à celle d'une fibre rapide. Ces résultats soulignent donc l'implication de la TnT dans la modulation de la réponse contractile et la coopérativité au sein du filament et démontrent les multiples combinaisons d'isoformes lentes et rapides de protéines régulatrices qui peuvent exister au sein d'une fibre musculaire. Les cellules musculaires ont grâce à ces combinaisons un système extrêmement performant, leur permettant de moduler la sensibilité de leur machinerie contractile au calcium.

PERSPECTIVES

Nos perspectives de travail se subdivisent en trois axes principaux. Certaines de ces perspectives ont déjà été engagées et semblent prometteuses, faisant l'objet d'articles soumis, présentés dans le cadre de ce chapitre « perspectives » :

- I. une étude des TnT et de leur rôle fonctionnel ;
- II. l'étude des modifications post-traductionnelles, phosphorylation-glycosylation des protéines contractiles, étude qui sera axée sur les protéines régulatrices et le rôle fonctionnel de ces modifications ;
- III. une étude des propriétés du RyR.

I. Identification de nouvelles isoformes de TnT et mise en évidence de leur rôle fonctionnel.

Le développement de nouvelles techniques électrophorétiques couplées à des systèmes de détection de protéines de plus en plus sensibles permet d'identifier de nouvelles isoformes de certaines protéines impliquées dans la contraction du muscle squelettique. Ainsi, nous avons pu démontrer que la diversité des sTnT du muscle squelettique était sans doute plus complexe que ce qui avait été décrit jusqu'à présent. Nous souhaitons donc développer une étude de la complexité des TnT en se fixant trois objectifs :

- I. a. Le premier objectif sera d'identifier les TnT exprimées dans le muscle squelettique en couplant des techniques de biologie moléculaire et des techniques protéomiques. Nous concentrerons notre travail dans un premier temps sur l'identification des sTnT qui semblent présenter une moindre diversité que les isoformes rapides.

- I. b. Le deuxième objectif sera de comprendre la signification de la complexité des TnT dans le muscle squelettique. A cet effet, nous développerons des expériences d'extraction-remplacement des TnT à partir de fibres pelées de biopsies musculaires de rat en utilisant des isoformes de TnT recombinantes. Ce travail devrait permettre de comprendre le rôle de ces différentes isoformes de TnT dans les propriétés contractiles des fibres squelettiques.
- I.c. Le troisième objectif sera de comprendre les mécanismes de régulation post-traductionnelle d'expression des TnT.
- *Objectif I.a. Diversité des TnT dans le muscle squelettique de rat.*

Ces études ont été engagées en collaboration avec le Dr Philippe Kischel qui, après avoir effectué son doctorat dans notre laboratoire, est actuellement en stage postdoctoral dans le laboratoire de Biologie Moléculaire et Génie Génétique, dirigé par le professeur J. Martial à Liège (Belgique). Dans le cadre de cette collaboration, nous avons développé au laboratoire la mise en évidence par RT-PCR des transcrits des sTnT exprimés dans le muscle squelettique de rat. Les primers utilisés pour cette mise en évidence ont été choisis à partir de séquences de la région amino-terminale des sTnT, conservées chez la souris et l'homme. Nous avons également réalisé au laboratoire l'analyse de l'expression des protéines correspondantes. Les expérimentations de clonage et d'expression des protéines sont réalisées au laboratoire du professeur J Martial. *Une première partie de ce travail vient de donner lieu à une publication actuellement soumise pour publication dans Febs Lett.*

Dans cet article, nous décrivons la mise en évidence et le clonage de quatre isoformes de sTnT dans le soleus de rat. Cette diversité concerne la région amino-terminale par épissages alternatifs des exons 5 et 6' du gène de la sTnT. Les isoformes sTnT1, sTnT2, sTnT4 présentent 96 % d'homologie de séquence avec les isoformes correspondantes, sTnT1, sTnT2, sTnT3, décrites chez la souris, puisqu'elles ne diffèrent que par l'addition d'un codon. La sTnT3, dont le transcript est faiblement exprimé, n'a jamais été décrite dans aucun tissu musculaire et aucune autre espèce. La principale différence entre les isoformes de sTnT concerne le nombre d'acides glutamiques de la terminaison amino-terminale ce qui pourrait indiquer que cet acide aminé chargé joue un rôle important dans la fonctionnalité de la sTnT. La comparaison des niveaux d'expression des transcripts et des protéines semble indiquer qu'il existe des mécanismes différents de régulation post-traductionnelle. Ainsi si le niveau d'expression des transcripts répond au schéma sTnT2>sTnT1>sTnT4>sTnT3, l'expression des isoformes protéiques répond à la séquence sTnT1=sTnT2>sTnT3, alors qu'aucune expression de sTnT4 n'a pu être mise en évidence dans aucun muscle testé. L'identification des isoformes est basée sur la migration des sTnT recombinantes produites chez E.Coli. Cependant, l'analyse en électrophorèse 2D démontre que les sTnT du soleus présentent des modifications post-traductionnelles : ainsi la troisième sTnT du soleus identifiée comme de la sTnT3 pourrait être de la sTnT4 sans qu'aucune technique (séquençage, spectrométrie de masse) ne puisse permettre une identification totalement affirmative. Une faible expression des sTnT a été mise en évidence dans des muscles rapides (EDL, Dia). La sTnT3 n'a pu être mise en évidence que dans le soleus et un homogénat de muscles de la patte de rat embryonnaire ce qui semble indiquer qu'il s'agit d'un marqueur spécifique du muscle lent. Les isoformes sTnT1 et sTnT2 qui sont prédominantes, ont sans doute un rôle primordial dans la régulation de l'activité contractile du soleus. Ces travaux confirment que la diversité et la modulation de l'expression des sTnT dans le muscle squelettique sont plus complexes que tout ce qui avait été décrit jusqu'à présent.

Nous poursuivrons ce travail en étudiant la diversité des fTnT dans le muscle squelettique de rat. Cette diversité sera considérée à la fois au niveau du transcript comme au niveau de la protéine. Une partie de cette étude sera menée en parallèle avec l'analyse des états de phosphorylation des protéines régulatrices (voir chapitre suivant). Nous considérerons une diversité de la région amino comme de la région carboxy-terminale.

Les cDNA correspondant aux différentes sTnT pourront être utilisés afin de faire une étude en utilisant la technique d'hybridation *in situ* de l'expression des sTnT dans une fibre

squelettique. Du fait de la forte homogénéité entre les sTnT nous ne pourrions que faire une distinction entre les paires sTnT1-sTnT2 et sTnT3-sTnT4. Cette étude aura pour but de décrire la localisation des différents TnTs le long de la fibre musculaire et d'établir si l'hétérogénéité d'expression des TnTs dans une fibre musculaire, que l'on peut observer par électrophorèse, correspond à une localisation préférentielle de certaines isoformes ou à une expression homogène des différents sTnT le long de la fibre musculaire. Cette étude pourra être menée sur fibres musculaires contrôles et après HU afin de mieux comprendre comment se développe la plasticité de l'expression des sTnT dans la fibre musculaire

- *Objectif I.b. Expériences d'extraction-remplacement des sTnT.*

P. Kischel a développé dans le cadre de son stage postdoctoral, la production et la purification des sTnT chez *E. Coli*. La production de ces quatre isoformes recombinantes de sTnT nous permet d'envisager des expériences d'extraction-remplacement sur fibres isolées. Cependant, l'extraction des TnT nécessite d'extraire l'ensemble du complexe des troponines. Afin de pouvoir remplacer la totalité du complexe des troponines, les sTnI et sTnC de rat ont également été clonées et produites par P. Kischel à Liège. Nous envisageons donc en collaboration avec le Dr P. Kischel de réaliser des expériences d'extraction-remplacement sur fibres pelées rapides d'EDL de rat. L'utilisation de ces fibres rapides se justifie par les expériences préalables réalisées au laboratoire concernant les TnC, qui nous ont permis de constater qu'il était plus facile d'extraire et de remplacer des protéines régulatrices dans une fibre rapide que dans une fibre lente. Après extraction du complexe des troponines rapides, nous procéderons au remplacement par un complexe lent [sTnC-sTnI]-sTnTx, respectivement avec les différentes isoformes de sTnT (x=1 à 4). Nous chercherons à déterminer si les différents TnTs confèrent à la fibre musculaire des propriétés de sensibilité calcique spécifiques. L'ensemble des étapes d'extraction et de remplacement sera testé parallèlement aux expériences fonctionnelles grâce à l'utilisation de techniques électrophorétiques.

- *Objectif I.c. Régulation post-traductionnelle des TnT.*

Nous avons démontré que la transformation d'expression des fTnT était très rapide, alors que l'expression des sTnT était peu sensible au changement d'activité neuromusculaire (Stevens et coll., 2002 ; Bastide et coll., 2002). Il nous semble donc intéressant de faire une

étude en parallèle des changements d'expression des protéines et de leur transcript afin de mieux comprendre les régulations post-traductionnelles mises en jeu dans ces transformations. Les transcripts des TnT seront mis en évidence par RT-PCR quantitative. Dans le cadre de cette étude nous analyserons la diversité des fTnT dans le muscle squelettique de rat.

II. Etude des modifications post-traductionnelles des protéines contractiles. Implications fonctionnelles.

II. A. Phosphorylation

La phosphorylation est parmi les modifications post-traductionnelles, la plus courante puisque l'on considère que près de 10 % des protéines intracellulaires sont des phosphoprotéines. Le transfert d'un groupement phosphate à une protéine va lui conférer des caractéristiques structurales, thermodynamiques et cinétiques qui vont modifier sa fonctionnalité. Le mécanisme de phosphorylation est catalysé par une kinase et correspond à l'addition réversible d'un groupement phosphate, la réaction de déphosphorylation étant assurée par une phosphatase. La famille de kinases catalysant cette réaction est très importante de part sa diversité, bien que ces enzymes possèdent une structure conservée (Taylor et coll., 1993, Morgan et Bondt, 1994).

Les protéines kinases vont catalyser la liaison d'un groupement phosphate sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine et sont spécifiques de leurs substrats grâce à la reconnaissance de certains motifs structuraux (Kemp et Pearson, 1990).

Les processus de phosphorylation-déphosphorylation sont impliqués dans de nombreux systèmes de régulation cellulaire :

- les voies de transduction des messages extracellulaires ;
- la régulation du cycle cellulaire ;
- la traduction avec la phosphorylation de protéines ribosomales ;
- le métabolisme cellulaire ;
- la contraction musculaire avec la phosphorylation des MLC2 et de la TnI cardiaque.

Parmi les trois types de chaînes légères (MLC1, MLC2 et MLC3) du muscle squelettique, la MLC2 (présente sous 2 formes selon le type de muscle, la sMLC2 et la fMLC2) peut être phosphorylée in vivo par une enzyme spécialisée : la "myosin light chain kinase" ou MLCK. Comme la MLCK musculaire lisse, la MLCK squelettique dépend d'une protéine activatrice, elle-même dépendante du calcium, la calmoduline. Les premières études concernant l'effet modulateur de la phosphorylation de la MLC2 sur la performance contractile ont porté sur la potentiation de la contraction isométrique de muscles rapides

(Manning et Stull, 1982). Cet effet est plus marqué lorsque des facteurs augmentent le calcium intracellulaire (tels que stimulus électrique ou caféine). Ils activent la MLCK et entraînent donc la phosphorylation de la MLC2 (Klug et coll., 1982). En outre, il a été démontré que la phosphorylation de la MLC2 en présence de MLCK et de calmoduline augmente la sensibilité au calcium (traduite par des changements des valeurs du seuil d'activation calcique et de la pCa_{50} dans la relation Tension/ pCa) sur des myofilaments pelés de muscle psoas (Persechini et Stull, 1985). Inversement, la sensibilité au calcium de l'activité acto-myosine est diminuée pour une myosine déficiente en MLC2.

Une autre série de résultats nous a conduit à nous intéresser aux modalités de régulation de l'état de phosphorylation des protéines contractiles dans les muscles soleus atrophiés. Il s'agit de la baisse d'affinité calcique présentée par le système contractile, observée dans tous les cas d'atrophie fonctionnelle (HU, déefférentation, souris Wobbler). Son origine demeure inexplicée. Des expériences réalisées au laboratoire ont permis de démontrer qu'une molécule agoniste des récepteurs β_2 adrénergiques, le clenbutérol, augmentait l'affinité calcique du système contractile (Stevens et coll., 2000). Il est envisagé que la fixation du clenbutérol sur les récepteurs β_2 adrénergiques entraîne, via l'augmentation d'AMPc dans le muscle, une cascade de réactions intracellulaires aboutissant à une plus forte phosphorylation des protéines (Gao et coll., 1992).

Par conséquent, une voie possible de contrôle de la sensibilité calcique pourrait être le degré de phosphorylation de certaines protéines des muscles atrophiés en condition de non utilisation ou après une altération du message nerveux.

Si de nombreux travaux ont permis de démontrer que le muscle pouvait très rapidement adapter sa machinerie contractile et son métabolisme à de nouvelles conditions physiologiques, il existe peu de données concernant une modulation de l'état de phosphorylation des protéines impliquées dans la contraction. C'est donc une première série d'expériences que nous comptons mener afin de contrôler ces degrés de phosphorylation, en particulier sur les protéines régulatrices, TnI, TnT et Tm. Très peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature concernant le degré de phosphorylation des protéines régulatrices de la contraction dans le muscle squelettique, la modulation de cette phosphorylation et ses conséquences fonctionnelles aussi bien dans les conditions normales ou dans des conditions de dysfonctionnement musculaire. Par contre, il est bien établi que la phosphorylation de la TnI et de la TnT cardiaque par la PKC diminue l'activité ATPasique du complexe acto-myosine et diminue l'interaction actine-myosine (Noland et coll., 1993). Il est connu que dans le muscle squelettique, les fTnT et la Tm sont des phosphoprotéines, comme

l'ont montré les travaux de Härtner et coll. (1989) ou de Watson et coll. (1988) dans le muscle squelettique de lapin. Si les états de phosphorylation sont à la base de la diversité des fTnT (Härtner et coll., 1989), la phosphorylation de la Tm au niveau du résidu Ser283 a été démontrée comme pouvant être impliquée dans le processus de polymérisation du filament de tropomyosine ou l'interaction Tm-TnT voir Tm-actine (Watson et coll., 1988 ; Sano et coll., 2000). D'autre part, la phosphorylation de la α Tm semblerait in vitro modifier les propriétés de la partie T1 de la TnT (Heeley, 1994). L'interaction entre la sTnT du muscle squelettique et la protéine kinase cGMP dépendante a également été démontrée (Yuasa et coll., 1999).

Nous souhaitons donc développer une étude des états de phosphorylation des protéines régulatrices de la contraction, et de la modulation de cette phosphorylation au cours de dysfonctionnements musculaires physiologiques environnementaux et pathologiques (après HU et dans le cas de maladies neuromusculaires comme l'amyotrophie spinale). Cette étude sera menée sur muscle entier en utilisant des enzymes déphosphorylantes telle la phosphatase alcaline, afin de discerner les formes phosphorylées des formes déphosphorylées, et leur pourcentage relatif. Nous utiliserons également des anticorps dirigés contre les résidus Ser, Thr et Tyr phosphorylés afin de déterminer le type de résidu phosphorylé. L'identification des formes éventuelles de fTnT phosphorylées nécessitera de reconsidérer la diversité des TnTf (Voir chapitre précédent). Ces études permettront de déterminer si des modifications post-traductionnelles sont également impliquées dans les transformations observées lors de ces dysfonctionnements et pathologies. Nous réaliserons ces études à partir de biopsies de muscles de rats suspendus selon le modèle de Morey. Les études se rapportant aux pathologies seront réalisées à partir de biopsies humaines obtenues dans une collaboration établie entre le laboratoire (Dr. L. Stevens) et le service hospitalier de Neuropédiatrie du CHU de Lille avec le docteur C.A. Maurage. Cette dernière collaboration est déjà établie dans le cadre d'un projet d'étude ayant pour sujet les transformations phénotypiques d'expression des protéines contractiles observées lors de l'amyotrophie spinale chez l'homme.

Nous développerons dans un deuxième temps, cette étude de la phosphorylation des protéines régulatrices sur fibres isolées, afin d'analyser les conséquences fonctionnelles des états de phosphorylation des troponines et de la Tm sur la sensibilité calcique des fibres squelettiques. La sensibilité calcique des fibres sera mesurée à l'aide de la technique de fibre pelée et les états de phosphorylation seront analysés par électrophorèse 2D. L'utilisation de phosphatases

et de kinases, combinée à l'utilisation de techniques d'extraction-remplacement permettront de modifier l'état de phosphorylation des protéines régulatrices et d'en étudier les conséquences fonctionnelles.

Dans le futur, ces études devraient mener à rechercher les voies de transduction mises en jeu dans la régulation de ces états de phosphorylation.

II. B. O-glycosylation

Il existe deux grands types de modifications post-traductionnelles : la phosphorylation et la glycosylation qui augmentent considérablement la diversité du protéome. Les N- et les O-glycosylations se retrouvent sur des protéines membranaires ou sécrétées, et la localisation luminale ou extracellulaire de ces glycanes empêche leur participation dans les voies de régulation des cellules. La O-N-acétylglucosamylation (O-GlcNAc) constitue la forme majeure de glycosylation sur les résidus sérine et thréonine des protéines au niveau nucléaire ou cytoplasmique (Torres et Hart, 1984, Hart, 1997 ; Haltiwanger et coll., 1997). C'est une glycosylation réversible qui présente de nombreuses similitudes avec la phosphorylation (Figure 25). Elle correspond à la fixation d'un monosaccharide unique, la N-acétylglucosamine, par l'intermédiaire d'une liaison O-Glycosidique au groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Le transfert d'un résidu de N-acétylglucosamine, qui n'est pas épimérisé en N-acétylgalactosamine (Haltiwanger et coll., 1990) est réalisé par l'UDP-GlcNAc-peptide- β -GlcNAc transférase en utilisant l'UDP-GlcNAc comme substrat (Figure 25 et 27). La concentration de l'UDP-GlcNAc est elle-même très sensible au taux de glucose (Rosseti et coll., 1995). La O-GlcNAc est un phénomène réversible puisque l'hydrolyse du motif O-GlcNAc peut être catalysée par la N-acetyl- β -D-glucosaminidase (Dong et Hart, 1994 ; figure 25).

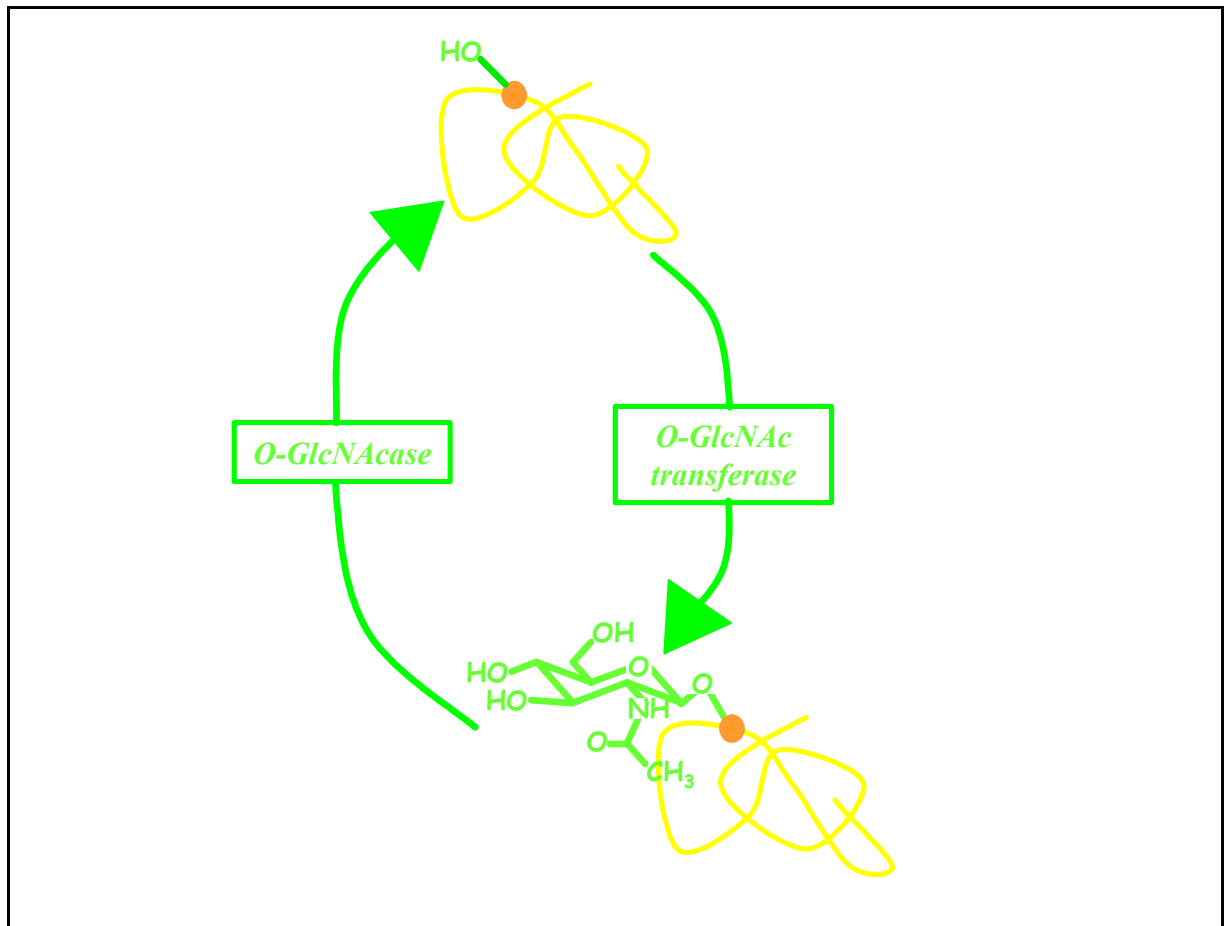


Figure 25 : La O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc) est un processus réversible.

De nombreuses protéines ont été identifiées comme O-GlcNAc ce qui suggère que cette glycosylation serait impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques comme la transcription (glycosylation de l'ARN polymérase II, Kelly et coll., 1993), le transport cytosol-noyau (les nucléoporines sont O-GlcNAc, Miller et coll., 1999), les interactions protéines-protéines (l' α cristalline (Roquemore et coll., 1996). D'autre part, toutes les protéines O-GlcNAc identifiées sont également des phosphoprotéines ce qui suggère que cette glycosylation pourrait être impliquée dans la régulation de la phosphorylation des protéines. Il existe une apparente réciprocité entre la O-GlcNAc et la phosphorylation. : c'est la relation Yin-Yang, mise en évidence au niveau de protéines cellulaires globales mais également au niveau de sites spécifiques de protéines particulières (Wells et coll., 2001, Figure 26). Ainsi des modifications de l'état de phosphorylation peuvent être associées à des variations opposées de O-GlcNAc (Griffitz et Schmitz, 1999). Certains agents qui augmentent le taux de phosphorylation tels l'acide oxaïdique ou le dibutyryl cAMP diminuent le taux de O-GlcNAc (Lefebvre et coll., 1999), alors que des inhibiteurs de kinases comme la rapamycine ou la

staurosporine provoquent une augmentation de O-GlcNAc. De plus, le site principal de O-GlcNAc de la protéine c-Myc a été identifié comme la Thr 58 qui est également un site de phosphorylation (Chou et coll., 1995).

Il n'y a pas de séquence consensus reconnue pour la O-N-acétylglucosaminylation. Cependant, il est admis qu'un résidu de Pro est nécessaire à proximité du point d'attachement du monosaccharide et que la région où se produit la glycosylation est riche en Ser et Thr. Le résidu de O-GlcNAc est neutre tandis que le groupement phosphate apporte deux charges négatives : cette différence de charge pourrait être à l'origine de différences au niveau de la conformation de la protéine et ainsi entraîner des modifications de ses propriétés et moduler ses interactions avec d'autres protéines.

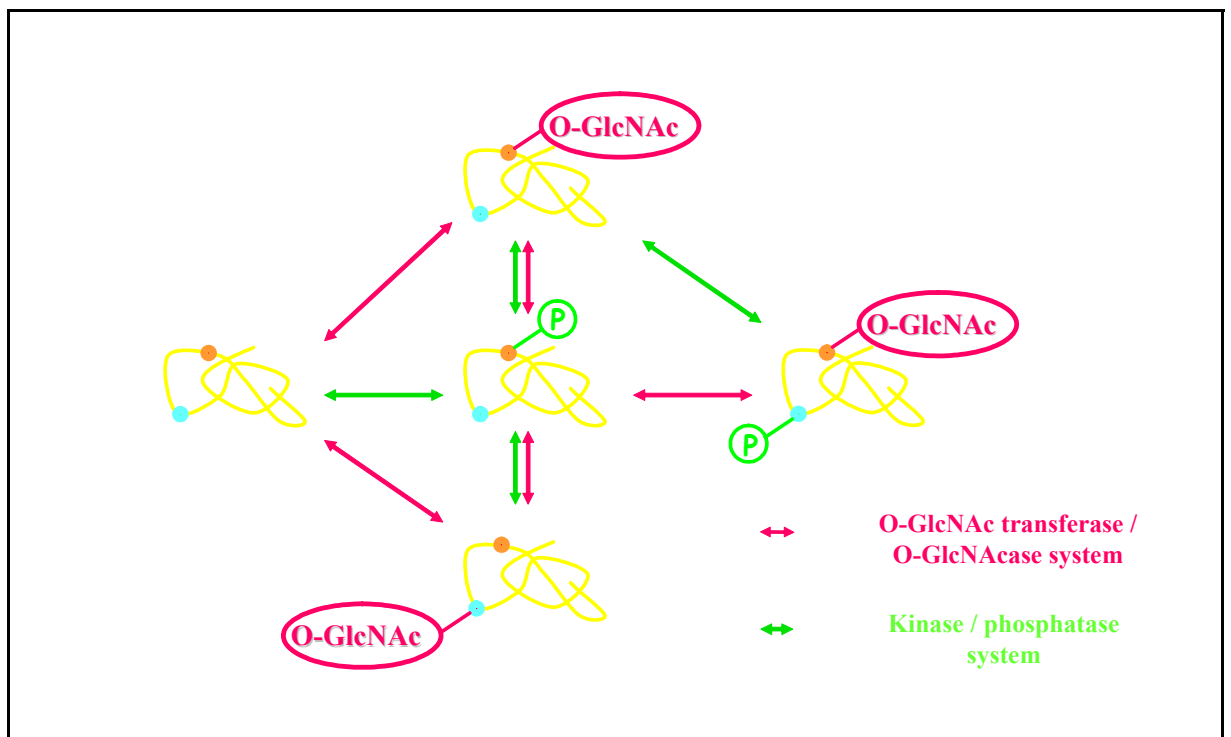


Figure 26 : Schématisation du phénomène de Yin-Yang.

La O-GlcNAc pourrait jouer un rôle fondamental dans certaines pathologies comme le diabète, le cancer et les maladies neurodégénératives. Ainsi, il a été établi que le taux de glucose influait sur la concentration de l'UDP-GlcNAc (Figure 27). De plus, la O-GlcNAc est abondante dans un nombre important de protéines du cytosquelette neuronal (actine, tubuline, protéines des filaments intermédiaires, MAP : microtubules associated proteins, synapsine I) et des modifications dans le nombre et la liaison des O-GlcNAc sont associées à des pathologies

neurodégénératives conduisant à des atrophies musculaires de caractéristiques comparables à celles obtenues après HU (amyotrophie spinale de type I, Chou et Wang, 1997).

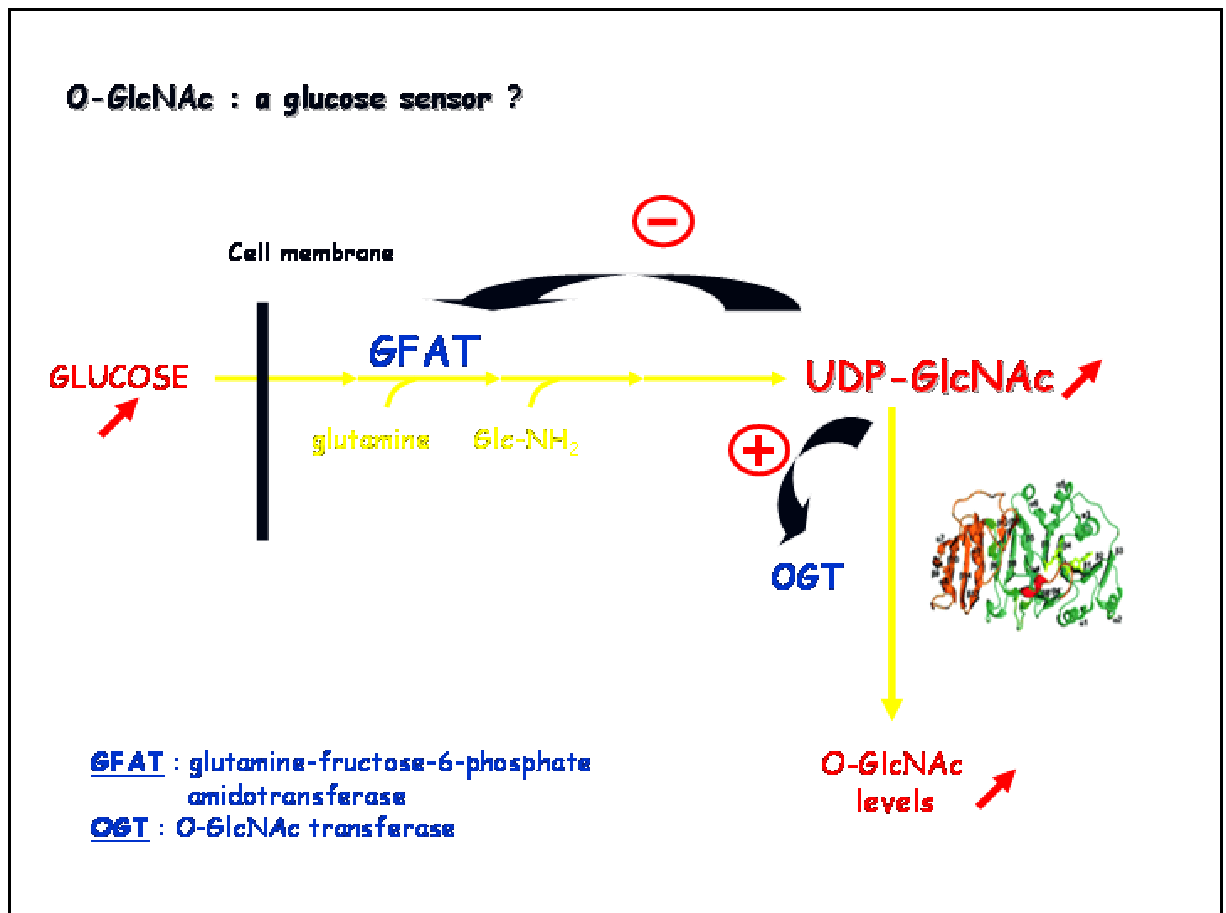


Figure 27 : Relation entre le taux de glucose et la O-GlcNAc.

Pourquoi étudier la O-GlcNAc dans le muscle squelettique ? Phosphorylation et métabolisme du glucose sont étroitement liés au processus de O-N-acétylglucosaminylation. D'autre part, le métabolisme musculaire est hautement dépendant du taux de glucose dans la cellule et les liaisons O-GlcNAc dépendent également du métabolisme glucidique. Une corrélation positive entre les contenus en glycogène et en O-GlcNAc sous forme totale ou liée aux protéines musculaires squelettiques a ainsi été démontrée (Yki-Jarvinen et coll., 1998). Or, après hypodynamie-hypokinésie, le métabolisme du muscle soleus passe d'un type oxydatif à une forme glycolytique. Notre hypothèse est donc qu'un changement de O-glycosylation peut survenir dans le muscle transformé en HU, ce changement pouvant réguler un facteur de transcription pour l'expression de certaines protéines (Jackson et Tjian, 1988) ou

intervenir à des niveaux post-traductionnels. La O-glycosylation pourrait également conduire à une phosphorylation anormale de certaines protéines.

Dans un premier temps, nous chercherons à identifier les protéines qui sont effectivement O-GlcNAc dans le muscle squelettique en utilisant une approche protéomique. Dans un deuxième temps, nous étudierons les variations et modulation du taux global comme du niveau d'expression des protéines identifiées comme O-GlcNAc au cours de l'atrophie musculaire. Nous étudierons parallèlement la variation du taux global de phosphorylation afin de considérer l'existence d'un mécanisme de Yin-Yang dans la modulation du taux de O-GlcNAc. L'utilisation d'inhibiteurs de kinases et de phosphatases pourrait nous permettre de moduler l'équilibre O-glycosylation/phosphorylation sur des cellules musculaires maintenues en culture et d'en analyser les effets sur les propriétés contractiles (force et cinétique de contraction par exemple).

Ce projet a fait partie d'un programme dit "transverse" de la génopole lilloise. Il est mené en commun avec l'équipe dirigée par le Dr J.C. Michalski (UMR 8576, laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle) dans le cadre du co-encadrement d'une étudiante en thèse Caroline Cieniewski.

Les premiers résultats obtenus dans le cadre de ce projet sont présentés dans le manuscrit qui suit, soumis pour publication dans *Journal of Molecular and Cellular Proteomics*.

Ces premiers travaux ont permis d'identifier, après purification des protéines de gastrocnemius de rat sur colonne de WGA immobilisée (une lectine qui reconnaît spécifiquement les motifs O-GlcNAc) et séparation des protéines O-GlcNAc par électrophorèse bidimensionnelle, trois classes de protéines :

- la première classe de protéines correspond à des protéines déjà décrites comme O-GlcNAc dans d'autres tissus, des kinases ou des protéines impliquées dans le transport noyau-cytoplasme ou des protéines du cytosquelette : la map kinase kinase kinase 8, la protéine phosphatase 2A, la 3 phosphoinositide kinase, l'inhibiteur de la protéase sérine, l' α - β cristalline, et une homologue de la protéine de localisation 4 nucléaire de la levure.
- la deuxième classe de protéines correspond à des protéines impliquées dans le métabolisme du glucose et la voie glycolytique : la créatine kinase M, la glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'anhydrase carbonique III (ACIII), la β émolase, la triose phosphate isomérase, la fructose biphosphatase aldolase et la malate déshydrogénase mitochondriale.
- la troisième classe de protéines correspond aux protéines impliquées directement dans la contraction musculaire: la myosine est la première protéine identifiée.

Le rôle joué par cette glycosylation reste pour l'instant purement hypothétique. Cependant, plusieurs commentaires peuvent être faits à la vue de nos résultats. La O-GlcNAc joue sans doute un rôle important dans le muscle squelettique puisqu'elle affecte des protéines clés du métabolisme énergétique ou de la contraction musculaire. Cette modification post-traductionnelle pourrait être impliquée dans l'activité de certaines de ces protéines ou dans des interactions protéine-protéine. Ainsi, des interactions entre l'émolase et la créatine kinase et la bande M (Foucault et coll., 2000), ou entre la myosine et les chaînes légères de myosine (Murakami et coll., 1988) ont été démontrées. La rupture de cette dernière interaction permet une phosphorylation de la myosine par la caséine kinase II. Ainsi, la balance O-GlcNAc/Phosphorylation pourrait être impliquée dans la modulation ou la dynamique de telles interactions.

Enfin, il est à noter que de nombreuses protéines identifiées comme O-GlcNAc ont été démontrées comme étant des marqueurs précoces des transformations musculaires aussi bien dans le cas de dénervation comme pour l'AC III ou l'émolase que dans des conditions de HU pour la GPDH, la créatine kinase M ou l' α - β cristalline (Cros et coll., 1999) voire dans toute plasticité pour les MHC .

La poursuite de ce programme est déjà engagée et portera sur quatre axes principaux :

1. **Existe-t-il d'autres protéines contractiles qui présentent cette glycosylation ?** Pour les études préliminaires, nous avons purifié l'ensemble des protéines musculaires sur colonne de WGA immobilisée. Il est évident que les protéines faiblement exprimées n'ont pu être identifiées ou même détectées dans ce travail. Afin de pouvoir étudier plus précisément les protéines contractiles, nous pensons réaliser un transfert de [³H]Gal sur les protéines O-GlcNAc ce qui devrait permettre l'identification de protéines au niveau d'expression faible. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux protéines contractiles non révélées dans ce travail. L'utilisation d'un anticorps anti-O-GlcNAc couplé à un système de révélation puissant (ECL) pourrait permettre également l'identification de ces nouvelles protéines.
2. **Existe-t-il une balance O-N Glycosylation/Phosphorylation dans le développement de l'atrophie musculaire ?** Pour cette étude nous réaliserons une mesure du taux global de O-GlcNAc et de protéines phosphorylées dans le soleus et dans l'EDL à différents temps de HU et après récupération d'une période de HU. Nous mesurerons également par RT-PCR quantitative l'évolution des transcrits des enzymes clés du métabolisme de la fonction O-GlcNAc soit la O-GlcNAcTransférase et la O-GlcNAcase, afin de déterminer si l'évolution du taux de O-GlcNAc correspond à une baisse de l'activité enzymatique ou à une baisse de l'expression des enzymes impliquées. L'activité enzymatique de la O-GlcNAcTransférase sera analysée grâce à l'utilisation d'un peptide accepteur synthétique de séquence YSDSPSTST, le donneur de GlcNAc étant l'UDP-[³H]GlcNAc. L'incorporation de la GlcNAc tritiée sera quantifiée par spectrophotométrie à scintillation liquide. L'activité de la O-GlcNAcase sera mesurée en utilisant le PNP-GlcNAc comme substrat et en utilisant une méthode colorimétrique de mesure du PNP(paranitrophenol phenol) libéré par action de la O-GlcNAcase.
Enfin nous discernons quelles sont les protéines qui présentent le plus de changement de taux de O-GlcNAc et essaierons de les identifier par analyse protéomique.

3. **Y a t il dans le muscle des protéines lectines pour les protéines O-GlcNAc ?** Nous utiliserons une approche protéomique proche de celle employée concernant l'identification de protéine O-GlcNAc afin d'appréhender cette question après purification des protéines sur sur colonne de GlcNAc immobilisée.
4. **Comprendre quel peut être le rôle de cette modification post-traductionnelle sur les propriétés de la protéine et sur l'activité contractile du muscle.**

Le rôle de la O-GlcNAc sur les activités des enzymes sera étudié en combinant des dosages des activités sur les protéines glycosylées et non glycosylées, la déglycosylation étant réalisée par la β -hexosaminidase. Concernant l'ACIII, un rôle éventuel de la O-GlcNAc sur les flux calciques sera considéré.

Le rôle possible de la O-GlcNAc sur une interaction myosine–protéine sera analysé en utilisant dans un premier temps des colonnes d'affinité. Ainsi, nous étudierons la liaison de la myosine glycosylée ou déglycosylée sur des colonnes d'affinité de chaînes légères de myosine immobilisées .

Le rôle de la O-GlcNAc sur l'activité contractile pourra être appréhendé en utilisant des cultures primaires de myotubes. Cette étude sera menée dans des conditions contrôles et après modification de l'état de glycosylation. A cet effet nous utiliserons des inhibiteurs de la O-GlcNAc transferase (Alloxan), de la O-GlcNAcase (streptozotocine , O-(2-acetamide-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenyl-carbamate ou PUGNAc), des inhibiteurs de kinases (staurosporine, rapamycine), des activateurs de kinases (dibutyryl cAMP) et inhibiteurs de phosphatases (acide okadaïque). Nous mesurerons l'effet de ces agents pharmacologiques sur la contraction musculaire des myotubes stimulés électriquement avec enregistrement de la contraction (temps de contraction, force de contraction, indices de fatigue musculaire). Des expériences pourront être menées parallèlement en utilisant la technique des fibres pelées avec glycosylation et déglycosylation et étude des caractéristiques contractiles (force de contraction, sensibilité calcique).

Le rôle de la O-GlcNAc sur la myosine sera également appréhendé sur culture primaire de myotubes en considérant par exemple l'état de striation des cellules maintenues en culture dans les différentes conditions expérimentales, voire le taux respectif MLC/MHC après séparation des protéines par électrophorèse. L'état de glycosylation et de phosphorylation de la myosine sera déterminé par électrophorèse et l'utilisation d'anticorps spécifiques. Un rôle de la O-GlcNAc sur les propriétés contractiles de la

myosine pourra être déterminé en utilisant les techniques de motilité « in vitro » en mesurant les vitesses de déplacement des filaments reconstitués avec de la myosine glycosylée et déglycosylée. Ces travaux pourraient se faire dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire dirigé par le professeur C. Reggiani de l'université de Padoue (Italie) avec lequel on entretient déjà des collaborations concernant l'étude de la phosphorylation des MLC2 et des voies impliquées dans la modulation de ces états de phosphorylation.

L'AC III pourrait jouer un rôle dans les flux calciques de la cellule (Wetzel et coll., 1990) : ainsi l'incubation de fibres de soleus en présence d'inhibiteurs spécifiques de l'ACIII retarde et diminue le signal calcique. Dans le cadre de ces études sur des myotubes squelettiques maintenus en culture, nous pourrions étudier les flux calciques des myotubes afin de considérer un rôle potentiel de la O-GlcNAc dans l'homéostasie calcique de la cellule.

L'ensemble de ces travaux fera appel à des compétences de biochimistes et donc à des collaborations poursuivies avec le laboratoire dirigé par le Dr J.C. Michalski (UMR 8576, laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle).

III Régulation de RyR1 par la calséquestrine.

Notre axe prioritaire de recherche concernera l'étude des modifications post-traductionnelles des protéines régulatrices de la contraction. Cependant nous envisageons de poursuivre des études concernant la régulation de l'activité électrophysiologique du RyR. Comme décrit dans le chapitre historique, de nombreuses protéines sont associées au RyR. Parmi celles-ci, la calséquestrine existe sous la forme de deux isoformes. L'isoforme de calséquestrine rapide est spécifique des muscles rapides et est co-exprimée avec la calséquestrine lente dans les muscles lents comme le soleus. Si certains travaux semblent indiquer que la calséquestrine est un activateur direct du RyR, d'autres semblent indiquer que des protéines annexes comme la triadine permettent cette activation. Nous souhaitons développer une étude de la plasticité d'expression de la calséquestrine voire de certaines autres protéines annexes (triadine par exemple) dans des modèles de dysfonctionnement musculaire (HU et hypergravité) et déterminer s'il existe des spécificités de régulation du RyR propres à chacune des isoformes de calséquestrine.

Comme nous l'avons dit précédemment, la démonstration de l'existence d'une coexpression des isoformes RyR₁ et RyR₃ dans le muscle et d'une modulation des taux d'expression de chacune après HU amène à s'interroger sur le rôle fonctionnel possible de l'isoforme RyR₃. Nous souhaiterions poursuivre des études permettant d'analyser un éventuel rôle de cette isoforme dans les propriétés contractiles des fibres où cette isoforme est exprimée. Des résultats très récents suggèrent que l'isoforme RyR₃ présente une affinité très inférieure à celle de RyR₁ pour la protéine associée FKBP12 (Fessenden et coll., 2000). On peut donc s'attendre à une sensibilité très différente de la fibre coexprimant les deux isoformes de RyR aux activateurs de la protéine FKBP12 (rapamycine, bastadine).

REFERENCES

- Abbott, K. L., B. B. Friday, D. Thaloer, T. J. Murphy, and G. K. Pavlath. Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol.Biol.Cell* 9: 2905-2916, 1998.
- Adams, B. A., T. Tanabe, A. Mikami, S. Numa, and K. G. Beam. Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature* 346: 569-572, 1990.
- Ahern, C. A., J. Arikath, P. Vallejo, C. A. Gurnett, P. A. Powers, K. P. Campbell, and R. Coronado. Intramembrane charge movements and excitation- contraction coupling expressed by two-domain fragments of the Ca²⁺ channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 6935-6940, 2001.
- Ahern, C. A., D. Bhattacharya, L. Mortenson, and R. Coronado. A component of excitation-contraction coupling triggered in the absence of the T671-L690 and L720-Q765 regions of the II-III loop of the dihydropyridine receptor alpha(1s) pore subunit. *Biophys.J.* 81: 3294-3307, 2001.
- Ahern, G. P., P. R. Junankar, and A. F. Dulhunty. Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. *FEBS Lett.* 352: 369-374, 1994.
- Airey, J. A., M. M. Grinsell, L. R. Jones, J. L. Sutko, and D. Witcher. Three ryanodine receptor isoforms exist in avian striated muscles. *Biochemistry* 32: 5739-5745, 1993.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1993). *Biologie moléculaire de la cellule. Deuxième édition. Edition Médecine-Science Flammarion*, 1219p.
- Alford, E. K., R. R. Roy, J. A. Hodgson, and V. R. Edgerton. Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp.Neurol.* 96: 635-649, 1987.
- Allen, D. L. and L. A. Leinwand. Intracellular calcium and myosin isoform transitions. Calcineurin and calcium-calmodulin kinase pathways regulate preferential activation of the IIa myosin heavy chain promoter. *J.Biol.Chem.* 277: 45323-45330, 2002.
- Allen, D. L., W. Yasui, T. Tanaka, Y. Ohira, S. Nagaoka, C. Sekiguchi, W. E. Hinds, R. R. Roy, and V. R. Edgerton. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J.Appl.Physiol* 81: 145-151, 1996.
- Allhouse, L. D., G. Guzman, T. Miller, Q. Li, J. D. Potter, and C. C. Ashley. Characterisation of a mutant of barnacle troponin C lacking Ca²⁺- binding sites at positions II and IV. *Pflugers Arch.* 438: 30-39, 1999.
- Ansved, T. and L. Larsson. Effects of denervation on enzyme-histochemical and morphometrical properties of the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand.* 139 : 297-304, 1990.
- Armstrong, C. M., F. M. Bezanilla, and P. Horowicz. Twitches in the presence of ethylene glycol bis(-aminoethyl ether)- N,N'-tetracetic acid. *Biochim.Biophys.Acta* 267: 605-608, 1972.
- Aronson, D., M. A. Violan, S. D. Dufresne, D. Zangen, R. A. Fielding, and L. J. Goodyear. Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J.Clin.Invest* 99: 1251-1257, 1997.
- Asmussen, G., H. Miersch, and T. Soukup. The influence of suspension hypokinesia on contractile properties of slow and fast twitch muscles of young growing and adult rats. *Biomed.Biochim.Acta* 48: S426-S431, 1989.

- Ausoni, S., L. Gorza, S. Schiaffino, K. Gundersen, and T. Lomo. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J.Neurosci.* 10: 153-160, 1990.
- Avila, G., K. M. O'Connell, L. A. Groom, and R. T. Dirksen. Ca²⁺ release through ryanodine receptors regulates skeletal muscle L-type Ca²⁺ channel expression. *J.Biol.Chem.* 276: 17732-17738, 2001.
- Babij, P. and F. W. Booth. Alpha-actin and cytochrome c mRNAs in atrophied adult rat skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 254: C651-C656, 1988.
- Babu, A., S. P. Scordilis, E. H. Sonnenblick, and J. Gulati. The control of myocardial contraction with skeletal fast muscle troponin C. *J.Biol.Chem.* 262: 5815-5822, 1987.
- Bacou, F., P. Rouanet, C. Barjot, C. Janmot, P. Vigneron, and A. d'Albis. Expression of myosin isoforms in denervated, cross-reinnervated, and electrically stimulated rabbit muscles. *Eur.J.Biochem.* 236: 539-547, 1996.
- Baldwin, K. M., R. E. Herrick, E. Ilyina-Kakueva, and V. S. Oganov. Effects of zero gravity on myofibril content and isomyosin distribution in rodent skeletal muscle. *FASEB J.* 4: 79-83, 1990.
- Baldwin, K. M., R. E. Herrick, and S. A. McCue. Substrate oxidation capacity in rodent skeletal muscle: effects of exposure to zero gravity. *J.Appl.Physiol* 75: 2466-2470, 1993.
- Barton, P. J. and M. E. Buckingham. The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem.J.* 231: 249-261, 1985.
- Beam, K. G., C. M. Knudson, and J. A. Powell. A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature* 320: 168-170, 1986.
- Beard, N. A., M. M. Sakowska, A. F. Dulhunty, and D. R. Laver. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys.J.* 82: 310-320, 2002.
- Bers, D. M. and V. M. Stiffel. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am.J.Physiol* 264: C1587-C1593, 1993.
- Betz, W. J., J. H. Caldwell, R. R. Ribchester, K. R. Robinson, and R. F. Stump. Endogenous electric field around muscle fibres depends on the Na⁺-K⁺ pump. *Nature* 287: 235-237, 1980.
- Beurg, M., C. A. Ahern, P. Vallejo, M. W. Conklin, P. A. Powers, R. G. Gregg, and R. Coronado. Involvement of the carboxy-terminus region of the dihydropyridine receptor beta1a subunit in excitation-contraction coupling of skeletal muscle. *Biophys.J.* 77: 2953-2967, 1999a.
- Beurg, M., M. Sukhareva, C. A. Ahern, M. W. Conklin, E. Perez-Reyes, P. A. Powers, R. G. Gregg, and R. Coronado. Differential regulation of skeletal muscle L-type Ca²⁺ current and excitation-contraction coupling by the dihydropyridine receptor beta subunit. *Biophys.J.* 76: 1744-1756, 1999b.
- Bhat, M. B., J. Zhao, S. Hayek, E. C. Freeman, H. Takeshima, and J. Ma. Deletion of amino acids 1641-2437 from the foot region of skeletal muscle ryanodine receptor alters the conduction properties of the Ca release channel. *Biophys.J.* 73: 1320-1328, 1997a.
- Bhat, M. B., J. Zhao, H. Takeshima, and J. Ma. Functional calcium release channel formed by the carboxyl-terminal portion of ryanodine receptor. *Biophys.J.* 73: 1329-1336, 1997b.

- Bhat, M. B., J. Zhao, W. Zang, C. W. Balke, H. Takeshima, W. G. Wier, and J. Ma. Caffeine-induced release of intracellular Ca²⁺ from Chinese hamster ovary cells expressing skeletal muscle ryanodine receptor. Effects on full-length and carboxyl-terminal portion of Ca²⁺ release channels. *J.Gen.Physiol* 110: 749-762, 1997c.
- Bigard, X., H. Sanchez, J. Zoll, P. Mateo, V. Rousseau, V. Veksler, and R. Ventura-Clapier. Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J.Biol.Chem.* 275: 19653-19660, 2000.
- Blazev, R., M. Hussain, A. J. Bakker, S. I. Head, and G. D. Lamb. Effects of the PKA inhibitor H-89 on excitation-contraction coupling in skinned and intact skeletal muscle fibres. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 22: 277-286, 2001.
- Blewett, C. and G. C. Elder. Quantitative EMG analysis in soleus and plantaris during hindlimb suspension and recovery. *J.Appl.Physiol* 74: 2057-2066, 1993.
- Block, B. A., T. Imagawa, K. P. Campbell, and C. Franzini-Armstrong. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J.Cell Biol.* 107: 2587-2600, 1988.
- Blumenschein, T. M., B. P. Tripet, R. S. Hodges, and B. D. Sykes. Mapping the interacting regions between troponins T and C. Binding of TnT and TnI peptides to TnC and NMR mapping of the TnT-binding site on TnC. *J.Biol.Chem.* 276: 36606-36612, 2001.
- Bock, O. Problems of sensorimotor coordination in weightlessness. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 28: 155-160, 1998.
- Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294 : 1704-1708, 2001a.
- Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass, and G. D. Yancopoulos. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat.Cell Biol.* 3: 1014-1019, 2001b.
- Booth, F. W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 52: 1113-1118, 1982.
- Booth, F. W. Terrestrial applications of bone and muscle research in microgravity. *Adv.Space Res.* 14: 373-376, 1994.
- Booth, F. W., M. V. Chakravarthy, S. E. Gordon, and E. E. Spangenburg. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J.Appl.Physiol* 93: 3-30, 2002.
- Bortolotto, S. K., M. Cellini, D. G. Stephenson, and G. M. Stephenson. MHC isoform composition and Ca(2+)- or Sr(2+)-activation properties of rat skeletal muscle fibers. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 279: C1564-C1577, 2000.
- Breitbart, R. E. and B. Nadal-Ginard. Complete nucleotide sequence of the fast skeletal troponin T gene. Alternatively spliced exons exhibit unusual interspecies divergence. *J.Mol.Biol.* 188: 313-324, 1986.
- Breitbart, R. E. and B. Nadal-Ginard. Developmentally induced, muscle-specific trans factors control the differential splicing of alternative and constitutive troponin T exons. *Cell* 49: 793-803, 1987.
- Breitbart, R. E., H. T. Nguyen, R. M. Medford, A. T. Destree, V. Mahdavi, and B. Nadal-Ginard. Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from a single gene. *Cell* 41: 67-82, 1985.

- Bremel, R. D. and A. Weber. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nat.New Biol.* 238: 97-101, 1972.
- Brenner, B., L. C. Yu, and R. J. Podolsky. X-ray diffraction evidence for cross-bridge formation in relaxed muscle fibers at various ionic strengths. *Biophys.J.* 46: 299-306, 1984.
- Brillantes, A. B., K. Ondrias, A. Scott, E. Kobrinsky, E. Ondriasova, M. C. Moschella, T. Jayaraman, M. Landers, B. E. Ehrlich, and A. R. Marks. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77: 513-523, 1994.
- Bronson, D. D. and F. H. Schachat. Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J.Biol.Chem.* 257 : 3937-3944, 1982.
- Brooke, M. H. and K. K. Kaiser. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch.Neurol.* 23: 369-379, 1970.
- Brum, G. and E. Rios. Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge. *J.Physiol* 387: 489-517, 1987.
- Buller, A. J. and D. M. LEWIS. Some observations on the effect of tenotomy in the rabbit. *J.Physiol* 178: 326-342, 1965.
- Buller, A. J. and R. Pope. Plasticity in mammalian skeletal muscle. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 278: 295-305, 1977.
- Buonanno, A., J. Cheng, P. Venepally, J. Weis, and S. Calvo. Activity-dependent regulation of muscle genes: repressive and stimulatory effects of innervation. *Acta Physiol Scand.* 163 : S17-S26, 1998.
- Burke, R. E., D. N. Levine, and F. E. Zajac, III. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174: 709-712, 1971.
- Burtnick, L. D. and C. M. Kay. The calcium-binding properties of bovine cardiac troponin C. *FEBS Lett.* 75: 105-110, 1977.
- Caiozzo, V. J., M. J. Baker, R. E. Herrick, M. Tao, and K. M. Baldwin. Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J.Appl.Physiol* 76: 1764-1773, 1994.
- Caiozzo, V. J., M. J. Baker, and K. M. Baldwin. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J.Appl.Physiol* 85: 2237-2248, 1998.
- Caiozzo, V. J., F. Haddad, M. J. Baker, R. E. Herrick, N. Prietto, and K. M. Baldwin. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 81: 123-132, 1996.
- Campione, M., S. Ausoni, C. Y. Guezennec, and S. Schiaffino. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* 74: 1156-1160, 1993.
- Canu, M. H. and M. Falempin. Effect of hindlimb unloading on locomotor strategy during treadmill locomotion in the rat. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 74: 297-304, 1996.
- Canu, M. H. and M. Falempin. Effect of hindlimb unloading on interlimb coordination during treadmill locomotion in the rat. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 78: 509-515, 1998.

- Canu, M. H. and M. Falempin. Fictive motor activity in rat after 14 days of hindlimb unloading. *Exp. Brain Res.* 139: 30-38, 2001.
- Casarotto, M. G., D. Green, S. M. Pace, S. M. Curtis, and A. F. Dulhunty. Structural determinants for activation or inhibition of ryanodine receptors by basic residues in the dihydropyridine receptor II-III loop. *Biophys.J.* 80: 2715-2726, 2001.
- Caswell, A. H., N. R. Brandt, J. P. Brunschwig, and S. Purkerson. Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* 30: 7507-7513, 1991.
- Catinot, M. P., B. Bastide, V. Montel, G. Suarez-Kurtz, and Y. Mounier. Effect of bovine serum albumin on the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 160: 199-205, 1997.
- Catinot, M. P., B. Bastide, G. Suarez-Kurtz, and Y. Mounier. Uridine triphosphate-sensitive pathway of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle fibers. *Eur.J.Pharmacol.* 362: 221-227, 1998.
- Chalovich, J. M. and E. Eisenberg. Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. *J.Biol.Chem.* 257: 2432-2437, 1982.
- Chandler, W. K., R. F. Rakowski, and M. F. Schneider. Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *J.Physiol* 254: 285-316, 1976.
- Chandra, M., E. F. da Silva, M. M. Sorenson, J. A. Ferro, J. R. Pearlstone, B. E. Nash, T. Borgford, C. M. Kay, and L. B. Smillie. The effects of N helix deletion and mutant F29W on the Ca²⁺ binding and functional properties of chicken skeletal muscle troponin. *J.Biol.Chem.* 269: 14988-14994, 1994.
- Chen, S. R., K. Ebisawa, X. Li, and L. Zhang. Molecular identification of the ryanodine receptor Ca²⁺ sensor. *J.Biol.Chem.* 273: 14675-14678, 1998.
- Chen, S. R., X. Li, K. Ebisawa, and L. Zhang. Functional characterization of the recombinant type 3 Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) expressed in HEK293 cells. *J.Biol.Chem.* 272: 24234-24246, 1997.
- Cheung, H. C., C. K. Wang, and N. A. Malik. Interactions of troponin subunits: free energy of binary and ternary complexes. *Biochemistry* 26: 5904-5907, 1987.
- Chi, M. M., R. Choksi, P. Nemeth, I. Krasnov, E. Ilyina-Kakueva, J. K. Manchester, and O. H. Lowry. Effects of microgravity and tail suspension on enzymes of individual soleus and tibialis anterior fibers. *J.Appl.Physiol* 73: 66S-73S, 1992.
- Chin, E. R., E. N. Olson, J. A. Richardson, Q. Yang, C. Humphries, J. M. Shelton, H. Wu, W. Zhu, R. Bassel-Duby, and R. S. Williams. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 12: 2499-2509, 1998.
- Ching, L. L., A. J. Williams, and R. Sitsapesan. Evidence for Ca(2+) activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circ.Res.* 87: 201-206, 2000.
- Chong, P. C. and R. S. Hodges. Photochemical cross-linking between rabbit skeletal troponin subunits. Troponin I-troponin T interactions. *J.Biol.Chem.* 257: 11667-11672, 1982.

- Chou, S. M. and H. S. Wang. Aberrant glycosylation/phosphorylation in chromatolytic motoneurons of Werdnig-Hoffmann disease. *J.Neurol.Sci.* 152: 198-209, 1997.
- Chou, T. Y., G. W. Hart, and C. V. Dang. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J.Biol.Chem.* 270: 18961-18965, 1995.
- Clancy, J. S., H. Takeshima, S. L. Hamilton, and M. B. Reid. Contractile function is unaltered in diaphragm from mice lacking calcium release channel isoform. *Am.J.Physiol* 277: R1205-R1209, 1999.
- Clement, G. and C. Andre-Deshays. Motor activity and visually induced postural reactions during two-g and zero-g phases of parabolic flight. *Neurosci.Lett.* 79: 113-116, 1987.
- Clement, G., V. S. Gurfinkel, F. Lestienne, M. I. Lipshits, and K. E. Popov. Adaptation of postural control to weightlessness. *Exp. Brain Res.* 57: 61-72, 1984.
- Clement, G., V. S. Gurfinkel, F. Lestienne, M. I. Lipshits, and K. E. Popov. Changes of posture during transient perturbations in microgravity. *Aviat.Space Environ.Med.* 56: 666-671, 1985.
- Cognard, C., B. Constantin, M. Rivet-Bastide, N. Imbert, C. Besse, and G. Raymond. Appearance and evolution of calcium currents and contraction during the early post-fusional stages of rat skeletal muscle cells developing in primary culture. *Development* 117: 1153-1161, 1993.
- Cohen, N. M. and W. J. Lederer. Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development. *J.Physiol* 406: 115-146, 1988.
- Conti, A., L. Gorza, and V. Sorrentino. Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles. *Biochem.J.* 316 (Pt 1): 19-23, 1996.
- Cooper, T. A. and C. P. Ordahl. A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science* 226: 979-982, 1984.
- Copello, J. A., S. Barg, H. Onoue, and S. Fleischer. Heterogeneity of Ca²⁺ gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys.J.* 73: 141-156, 1997.
- Copello, J. A., S. Barg, A. Sonnleitner, M. Porta, P. Diaz-Sylvester, M. Fill, H. Schindler, and S. Fleischer. Differential activation by Ca²⁺, ATP and caffeine of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors after block by Mg²⁺. *J.Membr.Biol.* 187: 51-64, 2002.
- Copello, J. A., Y. Qi, L. H. Jeyakumar, E. Ogunbunmi, and S. Fleischer. Lack of effect of cADP-ribose and NAADP on the activity of skeletal muscle and heart ryanodine receptors. *Cell Calcium* 30: 269-284, 2001.
- Coronado, R., J. Morrisette, M. Sukhareva, and D. M. Vaughan. Structure and function of ryanodine receptors. *Am.J.Physiol* 266: C1485-C1504, 1994.
- Crabtree, G. R. and E. N. Olson. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl: S67-S79, 2002.
- Cros, N., J. Muller, S. Bouju, G. Pietu, C. Jacquet, J. J. Leger, J. F. Marini, and C. A. Dechesne. Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am.J.Physiol* 276: R308-R316, 1999.

- Cummins, P. and S. V. Perry. The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem.J.* 133: 765-777, 1973.
- d'Albis, A., F. Goubel, R. Couteaux, C. Janmot, and J. C. Mira. The effect of denervation on myosin isoform synthesis in rabbit slow-type and fast-type muscles during terminal differentiation. Denervation induces differentiation into slow-type muscles. *Eur.J.Biochem.* 223: 249-258, 1994.
- Damiani, E. and A. Margreth. Characterization study of the ryanodine receptor and of calsequestrin isoforms of mammalian skeletal muscles in relation to fibre types. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 15: 86-101, 1994.
- Dantzig, J. A., Y. E. Goldman, N. C. Millar, J. Lacktis, and E. Homsher. Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J.Physiol* 451: 247-278, 1992.
- Da Silva, A. C. and F. C. Reinach. Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends Biochem.Sci.* 16: 53-57, 1991.
- De-Doncker, L. Etude du fonctionnement des récepteurs musculaires après une période d'hypodynamie-hypokinésie. *Thèse d'Université, Université de Lille 1*, 162p, 2002.
- De Doncker, L., F. Picquet, and M. Falempin. Effects of cutaneous receptor stimulation on muscular atrophy developed in hindlimb unloading condition. *J.Appl.Physiol* 89: 2344-2351, 2000.
- De Doncker, L., F. Picquet, G. B. Browne, and M. Falempin. Expression of myosin heavy chain isoforms along intrafusal fibers of rat soleus muscle spindles after 14 days of hindlimb unloading. *J.Histochem.Cytochem.* 50: 1543-1554, 2002.
- Delbono, O. and A. Chu. Ca²⁺ release channels in rat denervated skeletal muscles. *Exp.Physiol* 80: 561-574, 1995.
- Delling, U., J. Tureckova, H. W. Lim, L. J. De Windt, P. Rotwein, and J. D. Molkenin. A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol.Cell Biol.* 20: 6600-6611, 2000.
- Desplanches, D., M. H. Mayet, E. I. Ilyina-Kakueva, J. Frutoso, and R. Flandrois. Structural and metabolic properties of rat muscle exposed to weightlessness aboard Cosmos 1887. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 63: 288-292, 1991.
- Desplanches, D., M. H. Mayet, E. I. Ilyina-Kakueva, B. Sempore, and R. Flandrois. Skeletal muscle adaptation in rats flown on Cosmos 1667. *J.Appl.Physiol* 68: 48-52, 1990.
- Desplanches, D., M. H. Mayet, B. Sempore, and R. Flandrois. Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J.Appl.Physiol* 63: 558-563, 1987.
- Dhoot, G. K. and S. V. Perry. Polymorphic forms of troponin T and troponin C and their localization in striated muscle cell types. 122: 339-350, 1979.
- Diffie, G. M., V. J. Caiozzo, R. E. Herrick, and K. M. Baldwin. Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am.J.Physiol* 260: C528-C534, 1991.
- Digel, J., O. Abugo, T. Kobayashi, Z. Gryczynski, J. R. Lakowicz, and J. H. Collins. Calcium- and magnesium-dependent interactions between the C-terminus of troponin I and the N-terminal, regulatory domain of troponin C. *Arch.Biochem.Biophys.* 387: 243-249, 2001.

- Donaldson, S. K. Characterization of the effects of Mg²⁺ on Ca²⁺- and Sr²⁺-activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers. *J.Gen.Physiol* 66: 427-444, 1975.
- Donaldson, S. K. Mammalian muscle fiber types: comparison of excitation-contraction coupling mechanisms. *Acta Physiol Scand.Suppl* 556: 157-166, 1986.
- Dong, D. L. and G. W. Hart. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J.Biol.Chem.* 269: 19321-19330, 1994.
- Droppert, P. M. A review of muscle atrophy in microgravity and during prolonged bed rest. *J.Br.Interplanet.Soc.* 46: 83-86, 1993.
- Du, G. G., V. K. Khanna, and D. H. MacLennan. Mutation of divergent region 1 alters caffeine and Ca(2+) sensitivity of the skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *J.Biol.Chem.* 275: 11778-11783, 2000.
- Du, G. G. and D. H. MacLennan. Ca(2+) inactivation sites are located in the COOH-terminal quarter of recombinant rabbit skeletal muscle Ca(2+) release channels (ryanodine receptors). *J.Biol.Chem.* 274: 26120-26126, 1999.
- Dulhunty, A. F. and P. W. Gage. Effects of extracellular calcium concentration and dihydropyridines on contraction in mammalian skeletal muscle. *J.Physiol* 399: 63-80, 1988.
- Dulhunty, A. F., C. S. Haarmann, D. Green, D. R. Laver, P. G. Board, and M. G. Casarotto. Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 79: 45-75, 2002.
- Dulhunty, A. F., P. R. Junankar, and C. Stanhope. Extra-junctional ryanodine receptors in the terminal cisternae of mammalian skeletal muscle fibres. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 247: 69-75, 1992.
- Dulhunty, A. F., D. R. Laver, E. M. Gallant, M. G. Casarotto, S. M. Pace, and S. Curtis. Activation and inhibition of skeletal RyR channels by a part of the skeletal DHPR II-III loop: effects of DHPR Ser687 and FKBP12. *Biophys.J.* 77: 189-203, 1999.
- Dunn, S. E., J. L. Burns, and R. N. Michel. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J.Biol.Chem.* 274: 21908-21912, 1999
- Dunn, S. E. and R. N. Michel. Differential sensitivity of myosin-heavy-chain-typed fibers to distinct aggregates of nerve-mediated activation. *Pflugers Arch.* 437: 432-440, 1999.
- Dupont-Versteegden, E. E., J. D. Houle, C. M. Gurley, and C. A. Peterson. Early changes in muscle fiber size and gene expression in response to spinal cord transection and exercise. *Am.J.Physiol* 275: C1124-C1133, 1998.
- Dupont-Versteegden, E. E., R. J. Murphy, J. D. Houle, C. M. Gurley, and C. A. Peterson. Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 279: C1677-C1684, 2000.
- Edgerton, V. R. and R. R. Roy. Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. *J.Biomech.* 24 Suppl 1: 123-133, 1991.
- Edgerton, V.R. and Roy, R.R. The Gravitational Environment : "Neuromuscular adaptation to actual and simulated spaceflight". Handbook of Physiology, section 4, Environmental Physiology. New York, Oxford UP : Fregly M.J. and C.M. Blatteis, vol. III, p.721-763, 1996.

Edgerton, V. R., M. Y. Zhou, Y. Ohira, H. Klitgaard, B. Jiang, G. Bell, B. Harris, B. Saltin, P. D. Gollnick, R. R. Roy, and . Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J.Appl.Physiol* 78: 1733-1739, 1995.

El Hayek, R., B. Antoniu, J. Wang, S. L. Hamilton, and N. Ikemoto. Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J.Biol.Chem.* 270: 22116-22118, 1995.

El Hayek, R. and N. Ikemoto. Identification of the minimum essential region in the II-III loop of the dihydropyridine receptor alpha 1 subunit required for activation of skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *Biochemistry* 37: 7015-7020, 1998.

El Saleh, S. C. and J. D. Potter. Calcium-insensitive binding of heavy meromyosin to regulated actin at physiological ionic strength. *J.Biol.Chem.* 260: 14775-14779, 1985.

El Saleh, S. C., K. D. Warber, and J. D. Potter. The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 7: 387-404, 1986.

Etgen, G. J., Jr., J. T. Brozinick, Jr., H. Y. Kang, and J. L. Ivy. Effects of exercise training on skeletal muscle glucose uptake and transport. *Am.J.Physiol* 264: C727-C733, 1993.

Fajloun, Z., R. Kharrat, L. Chen, C. Lecomte, E. Di Luccio, D. Bichet, M. El Ayeb, H. Rochat, P. D. Allen, I. N. Pessah, M. De Waard, and J. M. Sabatier. Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 469: 179-185, 2000.

Falempin, M., T. Leclercq, D. Leterme, and Y. Mounier. Time-course of soleus muscle-change in and-recovery from disuse atrophy. *Physiologist* 33: S88-S89, 1990.

Farah, C. S., C. A. Miyamoto, C. H. Ramos, A. C. Da Silva, R. B. Quaggio, K. Fujimori, L. B. Smillie, and F. C. Reinach. Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J.Biol.Chem.* 269: 5230-5240, 1994.

Farah, C. S. and F. C. Reinach. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* 9: 755-767, 1995.

Felder, E. and C. Franzini-Armstrong. Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 1695-1700, 2002.

Feng, W. and V. Shoshan-Barmatz. Involvement of lysine residues in the gating of the ryanodine receptor/Ca²⁺-release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Eur.J.Biochem.* 247: 955-962, 1997.

Ferguson, D. G., H. W. Schwartz, and C. Franzini-Armstrong. Subunit structure of junctional feet in triads of skeletal muscle: a freeze-drying, rotary-shadowing study. *J.Cell Biol.* 99: 1735-1742, 1984.

Ferguson, R. E., Y. B. Sun, P. Mercier, A. S. Brack, B. D. Sykes, J. E. Corrie, D. R. Trentham, and M. Irving. In situ orientations of protein domains: troponin C in skeletal muscle fibers. *Mol.Cell* 11: 865-874, 2003.

Fessenden, J. D., Y. Wang, R. A. Moore, S. R. Chen, P. D. Allen, and I. N. Pessah. Divergent functional properties of ryanodine receptor types 1 and 3 expressed in a myogenic cell line. *Biophys.J.* 79: 2509-2525, 2000.

Fill, M. and J. A. Copello. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 82: 893-922, 2002.

- Fink, R. H., D. G. Stephenson, and D. A. Williams. Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J.Physiol* 373: 513-525, 1986.
- Fitts, R. H., C. J. Brimmer, A. Heywood-Cooksey, and R. J. Timmerman. Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *Am.J.Physiol* 256: C1082-C1091, 1989.
- Fitts, R. H., J. M. Metzger, D. A. Riley, and B. R. Unsworth. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J.Appl.Physiol* 60: 1946-1953, 1986.
- Fitts, R. H., D. R. Riley, and J. J. Widrick. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 89: 823-839, 2000.
- Fleischer, S., E. M. Ogunbunmi, M. C. Dixon, and E. A. Fleer. Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82: 7256-7259, 1985.
- Flicker, P. F., G. N. Phillips, Jr., and C. Cohen. Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J.Mol.Biol.* 162: 495-501, 1982.
- Fliegel, L., M. Ohnishi, M. R. Carpenter, V. K. Khanna, R. A. Reithmeier, and D. H. MacLennan. Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84: 1167-1171, 1987.
- Flucher, B. E. and C. Franzini-Armstrong. Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 8101-8106, 1996.
- Flucher, B. E., M. Terasaki, H. M. Chin, T. J. Beeler, and M. P. Daniels. Biogenesis of transverse tubules in skeletal muscle in vitro. *Dev.Biol.* 145: 77-90, 1991.
- Fluck, M. and H. Hoppeler. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 146: 159-216, 2003.
- Fodili-In Albon, S. Contribution à la mise en évidence du rôle du système nerveux périphérique dans le développement de l'atrophie musculaire liée à l'action de la microgravité simulée. *Thèse d'Université, Université de Lille 1*, 193p, 1996.
- Foucault, G., M. Vacher, S. Cribier, and M. Arrio-Dupont. Interactions between beta-enolase and creatine kinase in the cytosol of skeletal muscle cells. *Biochem.J.* 346 Pt 1: 127-131, 2000.
- Foucault, G., M. Vacher, T. Merkulova, A. Keller, and M. Arrio-Dupont. Presence of enolase in the M-band of skeletal muscle and possible indirect interaction with the cytosolic muscle isoform of creatine kinase. *Biochem.J.* 338 (Pt 1): 115-121, 1999.
- Fournier, M., R. R. Roy, H. Perham, C. P. Simard, and V. R. Edgerton. Is limb immobilization a model of muscle disuse? *Exp.Neurol.* 80: 147-156, 1983.
- Francois, J. M., Z. Sheng, D. Szczesna, and J. D. Potter. The functional role of the domains of troponin-C investigated with thrombin fragments of troponin-C reconstituted into skinned muscle fibers. *J.Biol.Chem.* 270: 19287-19293, 1995.

- Franzini-Armstrong, C. Natural variability in the length of thin and thick filaments in single fibres from a crab, *Portunus depurator*. *J.Cell Sci.* 6: 559-592, 1970.
- Franzini-Armstrong, C. Functional significance of membrane architecture in skeletal and cardiac muscle. *Soc.Gen.Physiol Ser.* 51: 3-18, 1996.
- Franzini-Armstrong, C., L. J. Kenney, and E. Varriano-Marston. The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J.Cell Biol.* 105: 49-56, 1987.
- Franzini-Armstrong, C. and G. Nunzi. Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 4: 233-252, 1983.
- Franzini-Armstrong, C., M. Pincon-Raymond, and F. Rieger. Muscle fibers from dysgenic mouse in vivo lack a surface component of peripheral couplings. *Dev.Biol.* 146: 364-376, 1991.
- Franzini-Armstrong, C., F. Protasi, and V. Ramesh. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys.J.* 77: 1528-1539, 1999.
- Friday, B. B., P. O. Mitchell, K. M. Kegley, and G. K. Pavlath. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation* 71: 217-227, 2003.
- Froemming, G. R., B. E. Murray, S. Harmon, D. Pette, and K. Ohlendieck. Comparative analysis of the isoform expression pattern of Ca(2+)- regulatory membrane proteins in fast-twitch, slow-twitch, cardiac, neonatal and chronic low-frequency stimulated muscle fibers. *Biochim.Biophys.Acta* 1466: 151-168, 2000.
- Fruen, B. R., J. R. Mickelson, N. H. Shomer, P. Velez, and C. F. Louis. Cyclic ADP-ribose does not affect cardiac or skeletal muscle ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 352: 123-126, 1994.
- Fujita, S., K. Maeda, and Y. Maeda. Expression in *Escherichia coli* and a functional study of a beta- troponin T 25 kDa fragment of rabbit skeletal muscle. *J.Biochem.(Tokyo)* 112: 306-308, 1992.
- Gahlmann, R. and L. Kedes. Cloning, structural analysis, and expression of the human fast twitch skeletal muscle troponin C gene. *J.Biol.Chem.* 265: 12520-12528, 1990.
- Gahlmann, R., A. B. Troutt, R. P. Wade, P. Gunning, and L. Kedes. Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T. *J.Biol.Chem.* 262: 16122-16126, 1987.
- Gao, L., D. Balshaw, L. Xu, A. Tripathy, C. Xin, and G. Meissner. Evidence for a role of the luminal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor) activity and conductance. *Biophys.J.* 79: 828-840, 2000.
- Gao, Z. H., C. R. Moomaw, J. Hsu, C. A. Slaughter, and J. T. Stull. Autophosphorylation of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Biochemistry* 31: 6126-6133, 1992.
- Gardetto, P. R., J. M. Schluter, and R. H. Fitts. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* 66: 2739-2749, 1989.
- Gayevskaya, M.S., Veretsatskaya, N.A., Kolganova, N.S., Kolchina, Y.N., Kurkina, L.M, and Nosovs, Y.A. Changes in metabolism of soleus muscle tissues in rats following flight aboard COSMOS-690 biosatellite. *Space Biol. Aerospace Med.* 13, 16-19, 1979a.

- Gayevskaya, M.S., Belitskaya, R.A., Kolganova, N.S., Kolchina, Y.N., Kurkina, L.M, and Nosova, Y.A. Tissular metabolism in mixed type fibers of rat skeletal muscles after flight aboard COSMOS-690 biosatellite. *Space Biol. Aerospace Med.* 13: 28-31, 1979b.
- Geeves, M. A. and P. B. Conibear. The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys.J.* 68: 194S-199S, 1995.
- Geeves, M. A. and D. J. Halsall. Two-step ligand binding and cooperativity. A model to describe the cooperative binding of myosin subfragment 1 to regulated actin. *Biophys.J.* 52: 215-220, 1987.
- Geeves, M. A. and S. S. Lehrer. Dynamics of the muscle thin filament regulatory switch: the size of the cooperative unit. *Biophys.J.* 67: 273-282, 1994.
- Gharbi, N., S. El Fazaa, S. Fagette, G. Gauquelin, C. Gharib, and A. Kamoun. Cortico-adrenal function under simulated weightlessness during gestation in the rat--effects on fetal development. *J Gravit Physiol.* 3(1):63-8, 1996.
- Giannini, G., A. Conti, S. Mammarella, M. Scrobogna, and V. Sorrentino. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J.Cell Biol.* 128: 893-904, 1995.
- Giannini, G. and V. Sorrentino. Molecular structure and tissue distribution of ryanodine receptors calcium channels. *Med.Res.Rev.* 15: 313-323, 1995.
- Goldspink, D. F. The influence of denervation and stretch on the size and protein turnover of rat skeletal muscle [proceedings]. *J.Physiol* 269: 87P-88P, 1977.
- Goldspink, D. F., A. J. Morton, P. Loughna, and G. Goldspink. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Arch.* 407: 333-340, 1986.
- Gomes, M. D., S. H. Lecker, R. T. Jago, A. Navon, and A. L. Goldberg. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 14440-14445, 2001.
- Goodyear, L. J., P. Y. Chang, D. J. Sherwood, S. D. Dufresne, and D. E. Moller. Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 271: E403-E408, 1996.
- Gordon, A. M., Y. Chen, B. Liang, M. LaMadrid, Z. Luo, and P. B. Chase. Skeletal muscle regulatory proteins enhance F-actin in vitro motility. *Adv.Exp.Med.Biol.* 453: 187-196, 1998.
- Gordon, A. M., E. Homsher, and M. Regnier. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 80: 853-924, 2000.
- Gordon, A. M., E. B. Ridgway, L. D. Yates, and T. Allen. Muscle cross-bridge attachment: effects on calcium binding and calcium activation. *Adv.Exp.Med.Biol.* 226: 89-99, 1988.
- Grabarek, Z., J. Grabarek, P. C. Leavis, and J. Gergely. Cooperative binding to the Ca²⁺-specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J.Biol.Chem.* 258: 14098-14102, 1983.
- Grabner, M., R. T. Dirksen, N. Suda, and K. G. Beam. The II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor is responsible for the Bi-directional coupling with the ryanodine receptor. *J.Biol.Chem.* 274: 21913-21919, 1999.
- Greaser, M. L. and J. Gergely. Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J.Biol.Chem.* 246: 4226-4233, 1971.

- Greaser, M. L. and J. Gergely. Purification and properties of the components from troponin. *J.Biol.Chem.* 248: 2125-2133, 1973.
- Greaser, M. L., R. L. Moss, and P. J. Reiser. Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *J.Physiol (Lond)* 406: 85-98, 1988.
- Grichko, V. P., A. Heywood-Cooksey, K. R. Kidd, and R. H. Fitts. Substrate profile in rat soleus muscle fibers after hindlimb unloading and fatigue. *J.Appl.Physiol* 88: 473-478, 2000.
- Griffith, L. S. and B. Schmitz. O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur.J.Biochem.* 262: 824-831, 1999.
- Grindeland, R. E., R. R. Roy, V. R. Edgerton, E. J. Grossman, V. R. Mukku, B. Jiang, D. J. Pierotti, and I. Rudolph. Interactive effects of growth hormone and exercise on muscle mass in suspended rats. *Am.J.Physiol* 267: R316-R322, 1994.
- Grunwald, R. and G. Meissner. Lumenal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J.Biol.Chem.* 270: 11338-11347, 1995.
- Gulati, J., S. Scordilis, and A. Babu. Effect of troponin C on the cooperativity in Ca²⁺ activation of cardiac muscle. *FEBS Lett.* 236: 441-444, 1988.
- Gundersen, K. Determination of muscle contractile properties: the importance of the nerve. *Acta Physiol Scand.* 162 : 333-341, 1998.
- Gundersen, K., E. Leberer, T. Lomo, D. Pette, and R. S. Staron. Fibre types, calcium-sequestering proteins and metabolic enzymes in denervated and chronically stimulated muscles of the rat. *J.Physiol (Lond)* 398: 177-189, 1988.
- Guo, W. and K. P. Campbell. Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 270: 9027-9030, 1995.
- Guo, X., M. A. Laflamme, and P. L. Becker. Cyclic ADP-ribose does not regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in intact cardiac myocytes. *Circ.Res.* 79: 147-151, 1996.
- Guth, K. and J. D. Potter. Effect of rigor and cycling cross-bridges on the structure of troponin C and on the Ca²⁺ affinity of the Ca²⁺-specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers. *J.Biol.Chem.* 262: 13627-13635, 1987.
- Guth, L. and F. J. Samaha. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp.Neurol.* 25: 138-152, 1969.
- Gutmann, E., J. Melichna, and I. Syrovy. Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. *Exp.Neurol.* 36: 488-497, 1972.
- Haddad, F., C. Arnold, M. Zeng, and K. Baldwin. Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve* 20: 1487-1496, 1997.
- Haddad, F., A. X. Qin, M. Zeng, S. A. McCue, and K. M. Baldwin. Interaction of hyperthyroidism and hindlimb suspension on skeletal myosin heavy chain expression. *J.Appl.Physiol* 85: 2227-2236, 1998.
- Hakamata, Y., J. Nakai, H. Takeshima, and K. Imoto. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 312: 229-235, 1992.

- Haltiwanger, R. S., S. Busby, K. Grove, S. Li, D. Mason, L. Medina, D. Moloney, G. Philipsberg, and R. Scartozzi. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 231: 237-242, 1997.
- Haltiwanger, R. S., G. D. Holt, and G. W. Hart. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J.Biol.Chem.* 265: 2563-2568, 1990.
- Hamalainen, N. and D. Pette. Expression of an alpha-cardiac like myosin heavy chain in diaphragm, chronically stimulated, and denervated fast-twitch muscles of rabbit. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 18: 401-411, 1997.
- Hamalainen, N. and D. Pette. Myosin and SERCA isoform expression in denervated slow-twitch muscle of euthyroid and hyperthyroid rabbits. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 22: 453-457, 2001.
- Hammell, R. L. and S. E. Hitchcock-DeGregori. Mapping the functional domains within the carboxyl terminus of alpha-tropomyosin encoded by the alternatively spliced ninth exon. *J.Biol.Chem.* 271: 4236-4242, 1996.
- Hart, G. W. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 66: 315-335, 1997.
- Hart, J. D. and A. F. Dulhunty. Nitric oxide activates or inhibits skeletal muscle ryanodine receptors depending on its concentration, membrane potential and ligand binding. *J.Membr.Biol.* 173: 227-236, 2000.
- Hartner, K. T., B. J. Kirschbaum, and D. Pette. The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur.J.Biochem.* 179: 31-38, 1989.
- Hartner, K. T. and D. Pette. Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur.J.Biochem.* 188: 261-267, 1990.
- Head, J. G., M. D. Ritchie, and M. A. Geeves. Characterization of the equilibrium between blocked and closed states of muscle thin filaments. *Eur.J.Biochem.* 227: 694-699, 1995.
- Heeley, D. H. Investigation of the effects of phosphorylation of rabbit striated muscle alpha alpha-tropomyosin and rabbit skeletal muscle troponin-T. *Eur.J.Biochem.* 221: 129-137, 1994.
- Heeley, D. H., K. Golosinska, and L. B. Smillie. The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and troponin C. *J.Biol.Chem.* 262: 9971-9978, 1987.
- Herbert, R. D. and R. J. Balnave. The effect of position of immobilisation on resting length, resting stiffness, and weight of the soleus muscle of the rabbit. *J.Orthop.Res.* 11: 358-366, 1993.
- Herbert, M. E., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. Influence of one-week hindlimb suspension and intermittent high load exercise on rat muscles. *Exp.Neurol.* 102: 190-198, 1988.
- Herrmann-Frank, A. and F. Lehmann-Horn. Regulation of the purified Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by luminal calcium. *Pflugers Arch.* 432: 155-157, 1996.
- Herrmann-Frank, A. and M. Varsanyi. Enhancement of Ca²⁺ release channel activity by phosphorylation of the skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS Lett.* 332: 237-242, 1993.

- Herzberg, O., J. Moulton, and M. N. James. A model for the Ca²⁺-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J.Biol.Chem.* 261: 2638-2644, 1986.
- Herzberg, O., J. Moulton, and M. N. James. Molecular structure of troponin C and its implications for the Ca²⁺-triggering of muscle contraction. *Methods Enzymol.* 139: 610-632, 1987.
- Heslinga, J. W. and P. A. Huijting. Effects of short length immobilization of medial gastrocnemius muscle of growing young adult rats. *Eur.J.Morphol.* 30: 257-273, 1992.
- Hidalgo, C., P. Donoso, and P. H. Rodriguez. Protons induce calsequestrin conformational changes. *Biophys.J.* 71: 2130-2137, 1996.
- Hill, T. L., E. Eisenberg, and L. Greene. Theoretical model for the cooperative equilibrium binding of myosin subfragment 1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77: 3186-3190, 1980.
- Hinkle, A., A. Goranson, C. A. Butters, and L. S. Tobacman. Roles for the troponin tail domain in thin filament assembly and regulation. A deletional study of cardiac troponin T. *J.Biol.Chem.* 274: 7157-7164, 1999.
- Hitchcock, S. E., H. E. Huxley, and A. G. Szent-Gyorgyi. Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin: a two-site model for troponin action. *J.Mol.Biol.* 80: 825-836, 1973.
- Hitchcock-DeGregori, S. E., Y. Song, and N. J. Greenfield. Functions of tropomyosin's periodic repeats. *Biochemistry* 41: 15036-15044, 2002.
- Hoar, P. E. and W. G. Kerrick. Rabbit diaphragm: two types of fibres determined by calcium strontium activation and protein content. *J.Physiol* 295: 345-352, 1979.
- Hodgson, J. A., S. C. Bodine-Fowler, R. R. Roy, R. D. de Leon, C. P. de Guzman, I. Koslovskaya, M. Sirota, and V. R. Edgerton. Changes in recruitment of rhesus soleus and gastrocnemius muscles following a 14 day spaceflight. *Physiologist* 34: S102-S103, 1991.
- Hofmann, P. A. and F. Fuchs. Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. *Am.J.Physiol* 253: C541-C546, 1987.
- Hofmann, S. and D. Pette. Low-frequency stimulation of rat fast-twitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose transporter 4 (GLUT-4). *Eur.J.Biochem.* 219: 307-315, 1994.
- Holmes, K. C. Muscle proteins--their actions and interactions. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 6: 781-789, 1996.
- Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44-49, 1990.
- Holy, X. and Y. Mounier. Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscles. *Muscle Nerve* 14: 70-78, 1991.
- Hryshko, L. V., T. Kobayashi, and D. Bose. Possible inhibition of canine ventricular sarcoplasmic reticulum by BAY K 8644. *Am.J.Physiol* 257: H407-H414, 1989.
- Hudlicka, O., M. Brown, M. Cotter, M. Smith, and G. Vrbova. The effect of long-term stimulation of fast muscles on their blood flow, metabolism and ability to withstand fatigue. *Pflugers Arch.* 369: 141-149, 1977.

- Huey, K. A. and S. C. Bodine. Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur.J.Biochem.* 256: 45-50, 1998.
- Hughes, S. M., M. M. Chi, O. H. Lowry, and K. Gundersen. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J.Cell Biol.* 145: 633-642, 1999.
- Hughes, S. M., K. Koishi, M. Rudnicki, and A. M. Maggs. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech.Dev.* 61: 151-163, 1997.
- Hughes, S. M., J. M. Taylor, S. J. Tapscott, C. M. Gurley, W. J. Carter, and C. A. Peterson. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118: 1137-1147, 1993.
- Hui, C. S., R. L. Milton, and R. S. Eisenberg. Charge movement in skeletal muscle fibers paralyzed by the calcium-entry blocker D600. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81: 2582-2585, 1984.
- Hunter, R. B., E. Stevenson, A. Koncarevic, H. Mitchell-Felton, D. A. Essig, and S. C. Kandarian. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.* 16: 529-538, 2002.
- Huxley, A.F. Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys.*, 7, 255-318, 1957.
- Huxley, H. E. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164: 1356-1365, 1969.
- Huxley, H. E. Proceedings: Structural basis of contraction in muscle. *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 356: 377, 1975.
- Huxley, A. F. and R. M. Simmons. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233: 533-538, 1971.
- Iio, T. and H. Kondo. Comparison of the kinetic properties of troponin-C and dansylaziridine-labeled troponin-C1. *J.Biochem.(Tokyo)* 88: 547-556, 1980.
- Ikemoto, M., T. Nikawa, S. Takeda, C. Watanabe, T. Kitano, K. M. Baldwin, R. Izumi, I. Nonaka, T. Towatari, S. Teshima, K. Rokutan, and K. Kishi. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 15: 1279-1281, 2001.
- Ilyina-Kakueva, E. I., V. V. Portugalov, and N. P. Krivenkova. Space flight effects on the skeletal muscles of rats. *Aviat.Space Environ.Med.* 47: 700-703, 1976.
- Ivanenko, A., D. D. McKemy, J. L. Kenyon, J. A. Airey, and J. L. Sutko. Embryonic chicken skeletal muscle cells fail to develop normal excitation-contraction coupling in the absence of the alpha ryanodine receptor. Implications for a two-ryanodine receptor system. *J.Biol.Chem.* 270: 4220-4223, 1995.
- Jackson, S. P. and R. Tjian. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55: 125-133, 1988.
- Jagoe, R. T. and A. L. Goldberg. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 4: 183-190, 2001.
- Jakubiec-Puka, A., C. Catani, and U. Carraro. Myosin heavy-chain composition in striated muscle after tenotomy. *Biochem.J.* 282 (Pt 1): 237-242, 1992.

- Jakubiec-Puka, A., I. Ciechomska, U. Mackiewicz, J. Langford, and H. Chomontowska. Effect of thyroid hormone on the myosin heavy chain isoforms in slow and fast muscles of the rat. *Acta Biochim.Pol.* 46: 823-835, 1999.
- Jakubiec-Puka, A., J. Kordowska, C. Catani, and U. Carraro. Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. *Eur.J.Biochem.* 193: 623-628, 1990.
- Jamali, A. A., P. Afshar, R. A. Abrams, and R. L. Lieber. Skeletal muscle response to tenotomy. *Muscle Nerve* 23: 851-862, 2000.
- Jankala, H., V. P. Harjola, N. E. Petersen, and M. Harkonen. Myosin heavy chain mRNA transform to faster isoforms in immobilized skeletal muscle: a quantitative PCR study. *J.Appl.Physiol* 82: 977-982, 1997.
- Jarvinen, M. J., S. A. Einola, and E. O. Virtanen. Effect of the position of immobilization upon the tensile properties of the rat gastrocnemius muscle. *Arch.Phys.Med.Rehabil.* 73: 253-257, 1992.
- Jeyakumar, L. H., J. A. Copello, A. M. O'Malley, G. M. Wu, R. Grassucci, T. Wagenknecht, and S. Fleischer. Purification and characterization of ryanodine receptor 3 from mammalian tissue. *J.Biol.Chem.* 273: 16011-16020, 1998.
- Jha, P. K., P. C. Leavis, and S. Sarkar. Interaction of deletion mutants of troponins I and T: COOH-terminal truncation of troponin T abolishes troponin I binding and reduces Ca²⁺ sensitivity of the reconstituted regulatory system. *Biochemistry* 35: 16573-16580, 1996.
- Jha, P. K., C. Mao, and S. Sarkar. Photo-cross-linking of rabbit skeletal troponin I deletion mutants with troponin C and its thiol mutants: the inhibitory region enhances binding of troponin I fragments to troponin C. *Biochemistry* 35: 11026-11035, 1996.
- Jiang, B., Y. Ohira, R. R. Roy, Q. Nguyen, E. I. Ilyina-Kakueva, V. Oganov, and V. R. Edgerton. Adaptation of fibers in fast-twitch muscles of rats to spaceflight and hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* 73: 58S-65S, 1992.
- Jin, J. P., A. Chen, and Q. Q. Huang. Three alternatively spliced mouse slow skeletal muscle troponin T isoforms: conserved primary structure and regulated expression during postnatal development. *Gene* 214: 121-129, 1998.
- Jin, J.P., HuangG, Q.Q., Ogut, O., Chen, A, and Wang, J. Troponin T isoform regulation and structure-function relation-ships. *Basic Appl. Myol.* 10: 17-26, 2000.
- Johnson, J. D., S. C. Charlton, and J. D. Potter. A fluorescence stopped flow analysis of Ca²⁺ exchange with troponin C. *J.Biol.Chem.* 254: 3497-3502, 1979.
- Jones, L. R., L. Zhang, K. Sanborn, A. O. Jorgensen, and J. Kelley. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 270: 30787-30796, 1995.
- Jozsa, L., M. Kvist, P. Kannus, and M. Jarvinen. The effect of tenotomy and immobilization on muscle spindles and tendon organs of the rat calf muscles. A histochemical and morphometrical study. *Acta Neuropathol.(Berl)* 76: 465-470, 1988.
- Jurkat-Rott, K., N. Mitrovic, C. Hang, A. Kouzmekine, P. Iaizzo, J. Herzog, H. Lerche, S. Nicole, J. Vale-Santos, D. Chauveau, B. Fontaine, and F. Lehmann-Horn. Voltage-sensor sodium channel mutations cause hypokalemic periodic paralysis type 2 by enhanced inactivation and reduced current. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 9549-9554, 2000.

- Kagari, T., N. Yamaguchi, and M. Kasai. Biochemical characterization of calsequestrin-binding 30-kDa protein in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 227: 700-706, 1996.
- Kandarian, S., S. O'Brien, K. Thomas, L. Schulte, and J. Navarro. Regulation of skeletal muscle dihydropyridine receptor gene expression by biomechanical unloading. *J.Appl.Physiol* 72: 2510-2514, 1992.
- Kasai, M. and F. Oosawa. The exchangeability of actin-bound calcium with various divalent cations. *Biochim.Biophys.Acta* 154: 520-528, 1968.
- Kawai, M., K. Guth, K. Winnikes, C. Haist, and J. C. Ruegg. The effect of inorganic phosphate on the ATP hydrolysis rate and the tension transients in chemically skinned rabbit psoas fibers. *Pflugers Arch.* 408: 1-9, 1987.
- Kawasaki, T. and M. Kasai. Regulation of calcium channel in sarcoplasmic reticulum by calsequestrin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199: 1120-1127, 1994.
- Kelly, W. G., M. E. Dahmus, and G. W. Hart. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J.Biol.Chem.* 268: 10416-10424, 1993.
- Kemp, B. E. and R. B. Pearson. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem.Sci.* 15: 342-346, 1990.
- Kerrick, W. G., D. A. Malencik, P. E. Hoar, J. D. Potter, R. L. Coby, S. Pociwong, and E. H. Fischer. Ca²⁺ and Sr²⁺ activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflugers Arch.* 386: 207-213, 1980.
- Kimura, C., K. Maeda, Y. Maeda, and M. Miki. Ca(2+)- and S1-induced movement of troponin T on reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence energy transfer spectroscopy. *J.Biochem.(Tokyo)* 132: 93-102, 2002.
- Kischel, P. Expression et rôle fonctionnel de la troponine C dans l'activité contractile, en conditions normales et après un épisode d'hypodynamie-hypokinésie. *Thèse d'Université, Université de Lille 1*, 194p, 2000.
- Kischel, P., B. Bastide, L. Stevens, and Y. Mounier. Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading. *J.Appl.Physiol* 90: 1095-1101, 2001.
- Kischel, P., L. Stevens, and Y. Mounier. Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles. *Br.J.Pharmacol.* 128: 767-773, 1999.
- Kitazawa, T. Physiological significance of Ca uptake by mitochondria in the heart in comparison with that by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J.Biochem.(Tokyo)* 80: 1129-1147, 1976.
- Klug, G. A., B. R. Botterman, and J. T. Stull. The effect of low frequency stimulation on myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 257: 4688-4690, 1982.
- Knudson, C. M., K. K. Stang, A. O. Jorgensen, and K. P. Campbell. Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J.Biol.Chem.* 268: 12637-12645, 1993.
- Knudson, C. M., K. K. Stang, C. R. Moomaw, C. A. Slaughter, and K. P. Campbell. Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J.Biol.Chem.* 268: 12646-12654, 1993.

- Kretsinger, R. H. Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit Rev.Biochem.* 8: 119-174, 1980.
- Krishan, K., M. J. Morgan, W. Zhao, and G. K. Dhoot. Slow troponin T mRNA in striated muscles is expressed in both cell type and developmental stage specific manner. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 21: 527-536, 2000.
- Lai, F. A., Q. Y. Liu, L. Xu, A. el Hashem, N. R. Kramarcy, R. Sealock, and G. Meissner. Amphibian ryanodine receptor isoforms are related to those of mammalian skeletal or cardiac muscle. *Am.J.Physiol* 263: C365-C372, 1992.
- Lamb, G. D. Components of charge movement in rabbit skeletal muscle: the effect of tetracaine and nifedipine. *J.Physiol* 376: 85-100, 1986.
- Lamb, G. D. and D. G. Stephenson. Effect of Mg²⁺ on the control of Ca²⁺ release in skeletal muscle fibres of the toad. *J.Physiol* 434: 507-528, 1991.
- Lamb, G. D. and D. G. Stephenson. Effects of FK506 and rapamycin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat. *J.Physiol* 494 (Pt 2): 569-576, 1996.
- Laver, D. R., V. J. Owen, P. R. Junankar, N. L. Taske, A. F. Dulhunty, and G. D. Lamb. Reduced inhibitory effect of Mg²⁺ on ryanodine receptor-Ca²⁺ release channels in malignant hyperthermia. *Biophys.J.* 73: 1913-1924, 1997.
- Leavis, P. C. and E. L. Kraft. Calcium binding to cardiac troponin C. *Arch.Biochem.Biophys.* 186: 411-415, 1978.
- Lee, H. C. Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev.* 77: 1133-1164, 1997.
- Lee, Y. S., K. Ondrias, A. J. Duhl, B. E. Ehrlich, and D. H. Kim. Comparison of calcium release from sarcoplasmic reticulum of slow and fast twitch muscles. *J.Membr.Biol.* 122: 155-163, 1991.
- Lees-Miller, J. P. and D. M. Helfman. The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *Bioessays* 13: 429-437, 1991.
- Leeuw, T. and D. Pette. Coordinate changes in the expression of troponin subunit and myosin heavy-chain isoforms during fast-to-slow transition of low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Eur.J.Biochem.* 213: 1039-1046, 1993.
- Lefebvre, T., C. Alonso, S. Mahboub, M. J. Dupire, J. P. Zanetta, M. L. Caillet-Boudin, and J. C. Michalski. Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim.Biophys.Acta* 1472: 71-81, 1999.
- Lehman, W., R. Craig, and P. Vibert. Ca(2+)-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature* 368: 65-67, 1994.
- Lehrer, S. S. The regulatory switch of the muscle thin filament: Ca²⁺ or myosin heads? *J.Muscle Res.Cell Motil.* 15: 232-236, 1994.
- Lehrer, S. S. and M. A. Geeves. The muscle thin filament as a classical cooperative/allosteric regulatory system. *J.Mol.Biol.* 277: 1081-1089, 1998.
- Lehrer, S. S. and E. P. Morris. Dual effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin on actomyosin subfragment 1 ATPase. *J.Biol.Chem.* 257: 8073-8080, 1982.
- Lemercier, C., R. Q. To, B. J. Swanson, G. E. Lyons, and S. F. Konieczny. Mist1: a novel basic helix-loop-helix transcription factor exhibits a developmentally regulated expression pattern. *Dev.Biol.* 182: 101-113, 1997.

- Leong, P. and D. H. MacLennan. The cytoplasmic loops between domains II and III and domains III and IV in the skeletal muscle dihydropyridine receptor bind to a contiguous site in the skeletal muscle ryanodine receptor. *J.Biol.Chem.* 273: 29958-29964, 1998.
- Lestienne, F. G. and V. S. Gurfinkel. Posture as an organizational structure based on a dual process: a formal basis to interpret changes of posture in weightlessness. *Prog.Brain Res.* 76: 307-313, 1988.
- Leterme, D., C. Cordonnier, Y. Mounier, and M. Falempin. Influence of chronic stretching upon rat soleus muscle during non- weight-bearing conditions. *Pflugers Arch.* 429: 274-279, 1994.
- Leterme, D. and M. Falempin. Contractile properties of rat soleus motor units following 14 days of hindlimb unloading. *Pflugers Arch.* 432: 313-319, 1996.
- Leterme, D. and M. Falempin. EMG activity of three rat hindlimb muscles during microgravity and hypergravity phase of parabolic flight. *Aviat.Space Environ.Med.* 69: 1065-1070, 1998.
- Levine, B. A., A. J. Moir, and S. V. Perry. The interaction of troponin-I with the N-terminal region of actin. *Eur.J.Biochem.* 172: 389-397, 1988.
- Li, H. C. and P. G. Fajer. Structural coupling of troponin C and actomyosin in muscle fibers. *Biochemistry* 37: 6628-6635, 1998.
- Li, M. X., S. M. Gagne, L. Spyrapoulos, C. P. Kloks, G. Audette, M. Chandra, R. J. Solaro, L. B. Smillie, and B. D. Sykes. NMR studies of Ca²⁺ binding to the regulatory domains of cardiac and E41A skeletal muscle troponin C reveal the importance of site I to energetics of the induced structural changes. *Biochemistry* 36: 12519-12525, 1997.
- Li, Y., S. Mui, J. H. Brown, J. Strand, L. Reshetnikova, L. S. Tobacman, and C. Cohen. The crystal structure of the C-terminal fragment of striated-muscle alpha-tropomyosin reveals a key troponin T recognition site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 7378-7383, 2002.
- Li, Z., J. Gergely, and T. Tao. Proximity relationships between residue 117 of rabbit skeletal troponin- I and residues in troponin-C and actin. *Biophys.J.* 81: 321-333, 2001.
- Liu, Q. Y., F. A. Lai, E. Rousseau, R. V. Jones, and G. Meissner. Multiple conductance states of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biophys.J.* 55: 415-424, 1989.
- Lomo, T. Long-term effects of altered activity on skeletal muscle. *Biomed.Biochim.Acta* 48: S432-S444, 1989.
- Lomo, T., J. Massoulié, and M. Vigny. Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *J.Neurosci.* 5: 1180-1187, 1985.
- Loughna, P. T., S. Izumo, G. Goldspink, and B. Nadal-Ginard. Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adult contractile protein genes in skeletal muscle. *Development* 109: 217-223, 1990.
- Lowey, S., H. S. Slayter, A. G. Weeds, and H. Baker. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J.Mol.Biol.* 42: 1-29, 1969.
- Lu, J., R. Webb, J. A. Richardson, and E. N. Olson. MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 552-557, 1999.

- Lu, X., L. Xu, and G. Meissner. Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J.Biol.Chem.* 269: 6511-6516, 1994.
- Lu, X., L. Xu, and G. Meissner. Phosphorylation of dihydropyridine receptor II-III loop peptide regulates skeletal muscle calcium release channel function. Evidence for an essential role of the beta-OH group of Ser687. *J.Biol.Chem.* 270: 18459-18464, 1995.
- Luo, Y., J. Leszyk, B. Li, J. Gergely, and T. Tao. Proximity relationships between residue 6 of troponin I and residues in troponin C: further evidence for extended conformation of troponin C in the troponin complex. *Biochemistry* 39: 15306-15315, 2000.
- Luttgau, H. C., G. Gottschalk, and D. Berwe. The effect of calcium and Ca antagonists upon excitation-contraction coupling. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 65: 717-723, 1987.
- Ma, J. Desensitization of the skeletal muscle ryanodine receptor: evidence for heterogeneity of calcium release channels. *Biophys.J.* 68: 893-899, 1995.
- Ma, Y. Z. and E. W. Taylor. Kinetic mechanism of myofibril ATPase. *Biophys.J.* 66: 1542-1553, 1994.
- Mak, A. S. and L. B. Smillie. Structural interpretation of the two-site binding of troponin on the muscle thin filament. *J.Mol.Biol.* 149: 541-550, 1981.
- Malnic, B., C. S. Farah, and F. C. Reinach. Regulatory properties of the NH₂- and COOH-terminal domains of troponin T. ATPase activation and binding to troponin I and troponin C. *J.Biol.Chem.* 273: 10594-10601, 1998.
- Malnic, B. and F. C. Reinach. Assembly of functional skeletal muscle troponin complex in Escherichia coli. *Eur.J.Biochem.* 222: 49-54, 1994.
- Manchester, J. K., M. M. Chi, B. Norris, B. Ferrier, I. Krasnov, P. M. Nemeth, D. B. McDougal, Jr., and O. H. Lowry. Effect of microgravity on metabolic enzymes of individual muscle fibers. *FASEB J.* 4: 55-63, 1990.
- Manning, D. R. and J. T. Stull. Myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 242: C234-C241, 1982.
- Marengo, J. J., C. Hidalgo, and R. Bull. Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys.J.* 74: 1263-1277, 1998.
- Marieb, E.N. Anatomie et physiologie humaines. *Deuxième édition. Edition DeBoeck.* 1114p, 1993.
- Margreth, A., E. Damiani, and G. Tobaldin. Ratio of dihydropyridine to ryanodine receptors in mammalian and frog twitch muscles in relation to the mechanical hypothesis of excitation-contraction coupling. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 197: 1303-1311, 1993.
- Marks, A. R. Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev.* 76: 631-649, 1996.
- Marks, A. R., P. Tempst, K. S. Hwang, M. B. Taubman, M. Inui, C. Chadwick, S. Fleischer, and B. Nadal-Ginard. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86: 8683-8687, 1989.
- Markuns, J. F., J. F. Wojtaszewski, and L. J. Goodyear. Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms in rat skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 274: 24896-24900, 1999.

- Marsden, B. J., G. S. Shaw, and B. D. Sykes. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. *Biochem. Cell Biol.* 68: 587-601, 1990.
- Martin, T. P., V. R. Edgerton, and R. E. Grindeland. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* 65: 2318-2325, 1988.
- Martonosi, A. Transport of calcium by sarcoplasmic reticulum, in Cheung WY (ed), Calcium and Cell function. San Diego, Acad Press, Vol III, 37-102, 1982.
- Marx, S. O., K. Ondrias, and A. R. Marks. Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science* 281: 818-821, 1998.
- Maytum, R., M. A. Geeves, and S. S. Lehrer. A modulatory role for the troponin T tail domain in thin filament regulation. *J. Biol. Chem.* 277: 29774-29780, 2002.
- Maytum, R., S. S. Lehrer, and M. A. Geeves. Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry* 38: 1102-1110, 1999.
- McCarthy, T. V., K. A. Quane, and P. J. Lynch. Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum. Mutat.* 15: 410-417, 2000.
- McCullagh, K. J., R. C. Poole, A. P. Halestrap, K. F. Tipton, M. O'Brien, and A. Bonen. Chronic electrical stimulation increases MCT1 and lactate uptake in red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol* 273: E239-E246, 1997.
- McDonald, K. S., M. D. Delp, and R. H. Fitts. Fatigability and blood flow in the rat gastrocnemius-plantaris-soleus after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol* 73: 1135-1140, 1992.
- McKay, R. T., J. R. Pearlstone, D. C. Corson, S. M. Gagne, L. B. Smillie, and B. D. Sykes. Structure and interaction site of the regulatory domain of troponin-C when complexed with the 96-148 region of troponin-I. *Biochemistry* 37: 12419-12430, 1998.
- McKillop, D. F. and M. A. Geeves. Regulation of the acto.myosin subfragment 1 interaction by troponin/tropomyosin. Evidence for control of a specific isomerization between two acto.myosin subfragment 1 states. *Biochem. J.* 279 (Pt 3): 711-718, 1991.
- McKillop, D. F. and M. A. Geeves. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* 65: 693-701, 1993.
- McLachlan, E. M. Rapid atrophy of mouse soleus muscles after tenotomy depends on an intact innervation. *Neurosci. Lett.* 25: 269-274, 1981.
- Mercier, P., M. X. Li, and B. D. Sykes. Role of the structural domain of troponin C in muscle regulation: NMR studies of Ca²⁺ binding and subsequent interactions with regions 1-40 and 96-115 of troponin I. *Biochemistry* 39: 2902-2911, 2000.
- Midrio, M., D. Danieli-Betto, A. Esposito, A. Megighian, U. Carraro, C. Catani, and K. Rossini. Lack of type 1 and type 2A myosin heavy chain isoforms in rat slow muscle regenerating during chronic nerve block. *Muscle Nerve* 21: 226-232, 1998.
- Mikami, A., K. Imoto, T. Tanabe, T. Niidome, Y. Mori, H. Takeshima, S. Narumiya, and S. Numa. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340: 230-233, 1989.

- Millar, N. C. and E. Homsher. The effect of phosphate and calcium on force generation in glycerinated rabbit skeletal muscle fibers. A steady-state and transient kinetic study. *J.Biol.Chem.* 265: 20234-20240, 1990.
- Millar, N. C. and E. Homsher. Kinetics of force generation and phosphate release in skinned rabbit soleus muscle fibers. *Am.J.Physiol* 262: C1239-C1245, 1992.
- Miller, M. W., M. R. Caracciolo, W. K. Berlin, and J. A. Hanover. Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch.Biochem.Biophys.* 367: 51-60, 1999.
- Mills, F. C., M. L. Johnson, and G. K. Ackers. Oxygenation-linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves. *Biochemistry* 15: 5350-5362, 1976.
- Miu, B., T. P. Martin, R. R. Roy, V. Oganov, E. Ilyina-Kakueva, J. F. Marini, J. J. Leger, S. C. Bodine-Fowler, and V. R. Edgerton. Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight, Cosmos 1887. *FASEB J.* 4: 64-72, 1990.
- Mizusawa, H., A. Takagi, H. Sugita, and Y. Toyokura. Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle. *J.Biochem.(Tokyo)* 91: 423-425, 1982.
- Money, K. E. and B. S. Cheung. Alterations of proprioceptive function in the weightless environment. *J.Clin.Pharmacol.* 31: 1007-1009, 1991.
- Moore, C. P., G. Rodney, J. Z. Zhang, L. Santacruz-Toloza, G. Strasburg, and S. L. Hamilton. Apocalmodulin and Ca²⁺ calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *Biochemistry* 38: 8532-8537, 1999.
- Morey, E. R., E. E. Sabelman, R. T. Turner, and D. J. Baylink. A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist* 22: S23-S24, 1979.
- Morgan, D. O. and H. L. De Bondt. Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6: 239-246, 1994.
- Morgan, M. J., J. C. Earnshaw, and G. K. Dhoot. Novel developmentally regulated exon identified in the rat fast skeletal muscle troponin T gene. *J.Cell Sci.* 106 (Pt 3): 903-908, 1993.
- Morimoto, S. and I. Ohtsuki. Effect of substitution of troponin C in cardiac myofibrils with skeletal troponin C or calmodulin on the Ca²⁺- and Sr²⁺-sensitive ATPase activity. *J.Biochem.(Tokyo)* 104: 149-154, 1988.
- Morris, E. P. and S. S. Lehrer. Troponin-tropomyosin interactions. Fluorescence studies of the binding of troponin, troponin T, and chymotryptic troponin T fragments to specifically labeled tropomyosin. *Biochemistry* 23: 2214-2220, 1984.
- Morrisette, J., G. Heisermann, J. Cleary, A. Ruoho, and R. Coronado. Cyclic ADP-ribose induced Ca²⁺ release in rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 330: 270-274, 1993.
- Moss, R. L., M. R. Lauer, G. G. Giulian, and M. L. Greaser. Altered Ca²⁺ dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibers following modification of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J.Biol.Chem.* 261: 6096-6099, 1986.
- Mounier, Y., X. Holy, and L. Stevens. Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflugers Arch.* 415: 136-141, 1989.

- Mozdziak, P. E., M. L. Greaser, and E. Schultz. Myogenin, MyoD, and myosin heavy chain isoform expression following hindlimb suspension. *Aviat.Space Environ.Med.* 70: 511-516, 1999.
- Murakami, N., A. Kumon, S. Matsumura, S. Hara, and T. Ikenaka. Phosphorylation of the heavy chain of skeletal muscle myosin by casein kinase II: localization of the phosphorylation site to the amino terminus. *J.Biochem.(Tokyo)* 103: 209-211, 1988.
- Murayama, T. and Y. Ogawa. Purification and characterization of two ryanodine-binding protein isoforms from sarcoplasmic reticulum of bullfrog skeletal muscle. *J.Biochem.(Tokyo)* 112: 514-522, 1992.
- Murgia, M., A. L. Serrano, E. Calabria, G. Pallafacchina, T. Lomo, and S. Schiaffino. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat.Cell Biol.* 2: 142-147, 2000.
- Musacchia, X. J., D. R. Deavers, G. A. Meininger, and T. P. Davis. A model for hypokinesia: effects on muscle atrophy in the rat. *J.Appl.Physiol* 48: 479-486, 1980.
- Musacchia, X. J., J. M. Steffen, R. D. Fell, M. J. Dombrowski, V. W. Oganov, and E. I. Ilyina-Kakueva. Skeletal muscle atrophy in response to 14 days of weightlessness: vastus medialis. *J.Appl.Physiol* 73: 44S-50S, 1992.
- Musaro, A., K. J. McCullagh, F. J. Naya, E. N. Olson, and N. Rosenthal. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400: 581-585, 1999.
- Muthuchamy, M., I. L. Grupp, G. Grupp, B. A. O'Toole, A. B. Kier, G. P. Boivin, J. Neumann, and D. F. Wieczorek. Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle beta-tropomyosin in the adult murine heart. *J.Biol.Chem.* 270: 30593-30603, 1995.
- Muthuchamy, M., Rethinasamy, P, and Wieczorek, D.F. Tropomyosin structure and function. New insights. *Trends Cardiovasc. Med.* 7: 124-128, 1997.
- Nakai, J., R. T. Dirksen, H. T. Nguyen, I. N. Pessah, K. G. Beam, and P. D. Allen. Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* 380: 72-75, 1996.
- Nakai, J., L. Gao, L. Xu, C. Xin, D. A. Pasek, and G. Meissner. Evidence for a role of C-terminus in Ca(2+) inactivation of skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *FEBS Lett.* 459: 154-158, 1999.
- Nakai, J., T. Imagawa, Y. Hakamat, M. Shigekawa, H. Takeshima, and S. Numa. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett.* 271: 169-177, 1990.
- Nakai, J., N. Sekiguchi, T. A. Rando, P. D. Allen, and K. G. Beam. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca²⁺ channels. *J.Biol.Chem.* 273: 13403-13406, 1998.
- Nakai, J., T. Tanabe, T. Konno, B. Adams, and K. G. Beam. Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J.Biol.Chem.* 273: 24983-24986, 1998.
- Nassar, R., N. N. Malouf, M. B. Kelly, A. E. Oakeley, and P. A. Anderson. Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ.Res.* 69: 1470-1475, 1991.
- Naya, F. J., B. Mercer, J. Shelton, J. A. Richardson, R. S. Williams, and E. N. Olson. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J.Biol.Chem.* 275: 4545-4548, 2000.

Ngai, S. M. and R. S. Hodges. Biologically important interactions between synthetic peptides of the N- terminal region of troponin I and troponin C. *J.Biol.Chem.* 267: 15715-15720, 1992.

Ngai, S. M., J. R. Pearlstone, C. S. Farah, F. C. Reinach, L. B. Smillie, and R. S. Hodges. Structural and functional studies on Troponin I and Troponin C interactions. *J.Cell Biochem.* 83: 33-46, 2001.

Ngai, S. M., J. R. Pearlstone, L. B. Smillie, and R. S. Hodges. Characterization of the biologically important interaction between troponin C and the N-terminal region of troponin I. *J.Cell Biochem.* 83: 99-110, 2001.

Noland, T. A., Jr. and J. F. Kuo. Phosphorylation of cardiac myosin light chain 2 by protein kinase C and myosin light chain kinase increases Ca(2+)-stimulated actomyosin MgATPase activity. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 193: 254-260, 1993.

Nonaka, I., M. Miyazawa, T. Sukegawa, K. Yonemoto, and T. Kato. Muscle fiber atrophy and degeneration induced by experimental immobility and hindlimb suspension. *Int.J.Sports Med.* 18 Suppl 4: S292-S294, 1997.

Nozais, M., A. M. Lompre, C. Janmot, and A. d'Albis. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ pump and metabolic enzyme expression in rabbit fast-type and slow-type denervated skeletal muscles. A time course study. *Eur.J.Biochem.* 238: 807-812, 1996.

Nozais, M., T. Merkulova, A. Keller, C. Janmot, A. M. Lompre, A. d'Albis, and M. Lucas. Denervation of rabbit gastrocnemius and soleus muscles: effect on muscle-specific enolase. *Eur.J.Biochem.* 263: 195-201, 1999.

Oba, T., T. Murayama, and Y. Ogawa. Redox states of type 1 ryanodine receptor alter Ca(2+) release channel response to modulators. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 282: C684-C692, 2002.

O'Brien, J., G. Meissner, and B. A. Block. The fastest contracting muscles of nonmammalian vertebrates express only one isoform of the ryanodine receptor. *Biophys.J.* 65: 2418-2427, 1993.

O'Connell, K. M., N. Yamaguchi, G. Meissner, and R. T. Dirksen. Calmodulin binding to the 3614-3643 region of RyR1 is not essential for excitation-contraction coupling in skeletal myotubes. *J.Gen.Physiol* 120: 337-347, 2002.

Oganov, V. S., S. A. Skuratova, A. N. Potapov, and M. A. Shirvinskaya. Physiological mechanisms of adaptation of rat skeletal muscles to weightlessness and similar functional requirements. *Physiologist* 23: S16-S21, 1980.

Ogut, O., H. Granzier, and J. P. Jin. Acidic and basic troponin T isoforms in mature fast-twitch skeletal muscle and effect on contractility. *Am.J.Physiol* 276: C1162-C1170, 1999.

Ogut, O. and J. P. Jin. Developmentally regulated, alternative RNA splicing-generated pectoral muscle-specific troponin T isoforms and role of the NH₂-terminal hypervariable region in the tolerance to acidosis. *J.Biol.Chem.* 273: 27858-27866, 1998.

Ohira, Y. Effects of denervation and deafferentation on mass and enzyme activity in rat skeletal muscles. *Jpn.J.Physiol* 39: 21-31, 1989.

Ohira, Y. Neuromuscular adaptation to microgravity environment. *Jpn.J.Physiol* 50: 303-314, 2000.

Ohira, Y., B. Jiang, R. R. Roy, V. Oganov, E. Ilyina-Kakueva, J. F. Marini, and V. R. Edgerton. Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* 73: 51S-57S, 1992.

- Ohlendieck, K., G. R. Fromming, B. E. Murray, P. B. Maguire, E. Leisner, I. Traub, and D. Pette. Effects of chronic low-frequency stimulation on Ca²⁺-regulatory membrane proteins in rabbit fast muscle. *Pflugers Arch.* 438: 700-708, 1999.
- Ohtsuki, I. and F. Shiraishi. Periodic binding of troponin C.I and troponin I to tropomyosin-actin filaments. *J.Biochem.(Tokyo)* 131: 739-743, 2002.
- Oishi, Y. Relationship between myosin heavy chain IId isoform and fibre types in soleus muscle of the rat after hindlimb suspension. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 66: 451-454, 1993.
- Oishi, Y., A. Ishihara, H. Yamamoto, and E. Miyamoto. Hindlimb suspension induces the expression of multiple myosin heavy chain isoforms in single fibres of the rat soleus muscle. *Acta Physiol Scand.* 162 : 127-134, 1998.
- Oishi, Y., H. Yamamoto, and E. Miyamoto. Changes in fibre-type composition and myosin heavy-chain IId isoform in rat soleus muscle during recovery period after hindlimb suspension. *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 68: 102-106, 1994.
- Olah, G. A., S. E. Rokop, C. L. Wang, S. L. Blechner, and J. Trehwella. Troponin I encompasses an extended troponin C in the Ca(2+)-bound complex: a small-angle X-ray and neutron scattering study. *Biochemistry* 33: 8233-8239, 1994.
- Olson, E. N. MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* 4: 1454-1461, 1990.
- Olson, E. N. Signal transduction pathways that regulate skeletal muscle gene expression . *Mol.Endocrinol.* 7: 1369-1378, 1993.
- Olson, E. N. and R. S. Williams. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* 22: 510-519, 2000.
- O'Reilly, F. M., M. Robert, I. Jona, C. Szegedi, M. Albrieux, S. Geib, M. De Waard, M. Villaz, and M. Ronjat. FKBP12 modulation of the binding of the skeletal ryanodine receptor onto the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *Biophys.J.* 82: 145-155, 2002.
- Orlova, E. V., I. I. Serysheva, M. van Heel, S. L. Hamilton, and W. Chiu. Two structural configurations of the skeletal muscle calcium release channel. *Nat.Struct.Biol.* 3: 547-552, 1996.
- Otsu, K., H. F. Willard, V. K. Khanna, F. Zorzato, N. M. Green, and D. H. MacLennan. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 265: 13472-13483, 1990.
- Pallafacchina, G., E. Calabria, A. L. Serrano, J. M. Kalhovde, and S. Schiaffino. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 9213-9218, 2002.
- Pan, B. S., A. M. Gordon, and J. D. Potter. Deletion of the first 45 NH₂-terminal residues of rabbit skeletal troponin T strengthens binding of troponin to immobilized tropomyosin. *J.Biol.Chem.* 266: 12432-12438, 1991.
- Papineni, R. V., K. M. O'Connell, H. Zhang, R. T. Dirksen, and S. L. Hamilton. Suramin Interacts with the Calmodulin Binding Site on the Ryanodine Receptor, RYR1. *J.Biol.Chem.* 277: 49167-49174, 2002.
- Parmacek, M. S. and J. M. Leiden. Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation* 84: 991-1003, 1991.

- Pate, E. and R. Cooke. Addition of phosphate to active muscle fibers probes actomyosin states within the powerstroke. *Pflugers Arch.* 414: 73-81, 1989.
- Pato, M. D., A. S. Mak, and L. B. Smillie. Fragments of rabbit striated muscle alpha-tropomyosin. II. Binding to troponin-T. *J.Biol.Chem.* 256: 602-607, 1981.
- Pearlstone, J. R., T. Borgford, M. Chandra, K. Oikawa, C. M. Kay, O. Herzberg, J. Moulton, A. Herklotz, F. C. Reinach, and L. B. Smillie. Construction and characterization of a spectral probe mutant of troponin C: application to analyses of mutants with increased Ca²⁺ affinity. *Biochemistry* 31: 6545-6553, 1992.
- Pearlstone, J. R. and L. B. Smillie. Binding of troponin-T fragments to several types of tropomyosin. Sensitivity to Ca²⁺ in the presence of troponin-C. *J.Biol.Chem.* 257: 10587-10592, 1982.
- Pedrosa-Domello, F., P.O. Ericksson, G.S. Butler-Browne, and L.E. Thornell. Expression of alpha-cardiac myosin heavy chain in mammalian skeletal muscle. *Experientia.* May 15;48(5):491-4, 1992.
- Pereon, Y., J. Navarro, V. Sorrentino, J. P. Louboutin, J. Noireaud, and P. Palade. Regulation of dihydropyridine receptor and ryanodine receptor gene expression in regenerating skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 433: 221-229, 1997.
- Perry, S. V. Troponin T: genetics, properties and function. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 19: 575-602, 1998.
- Perry, S. V. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol.Cell Biochem.* 190: 9-32, 1999.
- Perry, S.V., Cole, H.A., Head, J.F, and Wilson, F.J. Localization and mode of action of the inhibitory component of the troponin complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 251-262, 1972.
- Persechini, A., J. T. Stull, and R. Cooke. The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J.Biol.Chem.* 260: 7951-7954, 1985.
- Peters, D. G., H. Mitchell-Felton, and S. C. Kandarian. Unloading induces transcriptional activation of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1 gene in muscle. *Am.J.Physiol* 276: C1218-C1225, 1999.
- Pette, D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 90: 1119-1124, 2001.
- Pette, D. and R. S. Staron. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 116: 1-76, 1990.
- Pette, D. and R. S. Staron. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int.Rev.Cytol.* 170: 143-223, 1997.
- Pette, D. and G. Vrbova. Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 120: 115-202, 1992.
- Peuker, H., A. Conjard, and D. Pette. Alpha-cardiac-like myosin heavy chain as an intermediate between MHCIIa and MHCI beta in transforming rabbit muscle. *Am.J.Physiol* 274: C595-C602, 1998.
- Phillips, G. N., Jr., J. P. Fillers, and C. Cohen. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J.Mol.Biol.* 192: 111-131, 1986.
- Picquet, F., M. H. Canu, and M. Falempin. Phenotypic changes in the composition of muscular fibres in rat soleus motor units after 14 days of hindlimb unloading. *Pflugers Arch.* 440: 229-235, 2000.

- Picquet, F. and M. Falempin. Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. *Exp.Neurol.* 182: 186-194, 2003.
- Picquet, F., L. Stevens, G. S. Butler-Browne, and Y. Mounier. Differential effects of a six-day immobilization on newborn rat soleus muscles at two developmental stages. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 19: 743-755, 1998.
- Pieples, K., G. Arteaga, R. J. Solaro, I. Grupp, J. N. Lorenz, G. P. Boivin, G. Jagatheesan, E. Labitzke, P. P. DeTombe, J. P. Konhilas, T. C. Irving, and D. F. Wieczorek. Tropomyosin 3 expression leads to hypercontractility and attenuates myofilament length-dependent Ca(2+) activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 283: H1344-H1353, 2002.
- Pieples, K. and D. F. Wieczorek. Tropomyosin 3 increases striated muscle isoform diversity. *Biochemistry* 39: 8291-8297, 2000.
- Popp, D. and Y. Maeda. Calcium ions and the structure of muscle actin filament. An X-ray diffraction study. *J.Mol.Biol.* 229: 279-285, 1993.
- Potter, J. D. and J. Gergely. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J.Biol.Chem.* 250: 4628-4633, 1975.
- Potter, J. D., Z. Sheng, B. S. Pan, and J. Zhao. A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *J.Biol.Chem.* 270: 2557-2562, 1995.
- Powell, J. A., L. Petherbridge, and B. E. Flucher. Formation of triads without the dihydropyridine receptor alpha subunits in cell lines from dysgenic skeletal muscle. *J.Cell Biol.* 134: 375-387, 1996.
- Proenza, C., J. O'Brien, J. Nakai, S. Mukherjee, P. D. Allen, and K. G. Beam. Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the alpha(1S) (Ca(V)1.1) II-III loop. *J.Biol.Chem.* 277: 6530-6535, 2002.
- Proenza, C., C. M. Wilkens, and K. G. Beam. Excitation-contraction coupling is not affected by scrambled sequence in residues 681-690 of the dihydropyridine receptor II-III loop. *J.Biol.Chem.* 275: 29935-29937, 2000.
- Protasi, F., C. Franzini-Armstrong, and P. D. Allen. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J.Cell Biol.* 140: 831-842, 1998.
- Putkey, J. A., W. Liu, and H. L. Sweeney. Function of the N-terminal calcium-binding sites in cardiac/slow troponin C assessed in fast skeletal muscle fibers. *J.Biol.Chem.* 266: 14881-14884, 1991.
- Putkey, J. A., H. L. Sweeney, and S. T. Campbell. Site-directed mutation of the trigger calcium-binding sites in cardiac troponin C. *J.Biol.Chem.* 264: 12370-12378, 1989.
- Radermacher, M., V. Rao, R. Grassucci, J. Frank, A. P. Timerman, S. Fleischer, and T. Wagenknecht. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J.Cell Biol.* 127: 411-423, 1994.
- Rayment, I. and H. M. Holden. The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem.Sci.* 19: 129-134, 1994.
- Reiser, P. J., M. L. Greaser, and R. L. Moss. Developmental changes in troponin T isoform expression and tension production in chicken single skeletal muscle fibres. *J.Physiol (Lond)* 449: 573-588, 1992.

- Reiser, P. J., C. E. Kasper, and R. L. Moss. Myosin subunits and contractile properties of single fibers from hypokinetic rat muscles. *J.Appl.Physiol* 63: 2293-2300, 1987.
- Riley, D. A., J. L. Bain, J. L. Thompson, R. H. Fitts, J. J. Widrick, S. W. Trappe, T. A. Trappe, and D. L. Costill. Decreased thin filament density and length in human atrophic soleus muscle fibers after spaceflight. *J.Appl.Physiol* 88: 567-572, 2000.
- Riley, D. A., G. R. Slocum, J. L. Bain, F. R. Sedlak, T. E. Sowa, and J. W. Mellender. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J.Appl.Physiol* 69: 58-66, 1990.
- Robertson, S. P., J. D. Johnson, and J. D. Potter. The time-course of Ca²⁺ exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca²⁺. *Biophys.J.* 34: 559-569, 1981.
- Roquemore, E. P., M. R. Chevrier, R. J. Cotter, and G. W. Hart. Dynamic O-GlcNacylation of the small heat shock protein $\alpha\beta$ -crystallin. *Biochemistry* 35: 3578-3586, 1996.
- Rossetti, L., M. Hawkins, W. Chen, J. Gindi, and N. Barzilai. In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J.Clin.Invest* 96: 132-140, 1995.
- Rousseau, E., J. S. Smith, J. S. Henderson, and G. Meissner. Single channel and ⁴⁵Ca²⁺ flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophys.J.* 50: 1009-1014, 1986.
- Rousseau, E., J. S. Smith, and G. Meissner. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca²⁺ release channel. *Am.J.Physiol* 253: C364-C368, 1987.
- Roy, R. R., K. M. Baldwin, and V. R. Edgerton. The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. *Exerc.Sport Sci.Rev.* 19 : 269-312, 1991.
- Sabry, M. A. and G. K. Dhoot. Identification of and pattern of transitions of cardiac, adult slow and slow skeletal muscle-like embryonic isoforms of troponin T in developing rat and human skeletal muscles. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 12: 262-270, 1991a.
- Sabry, M. A. and G. K. Dhoot. Identification and pattern of transitions of some developmental and adult isoforms of fast troponin T in some human and rat skeletal muscles. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 12: 447-454, 1991b.
- Saiki, Y., R. El Hayek, and N. Ikemoto. Involvement of the Glu724-Pro760 region of the dihydropyridine receptor II-III loop in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *J.Biol.Chem.* 274: 7825-7832, 1999.
- Saito, K., M. Yoshida, and H. Tanaka. Sensitivity of cultured and skinned chick myotube to calcium, strontium, and barium ions examined by recording isometric contractions. *J.Cell Physiol* 150: 45-51, 1992.
- Salmons, S. and G. Vrbova. The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J.Physiol* 201: 535-549, 1969.
- Salvatori, S., E. Damiani, F. Zorzato, P. Volpe, S. Pierobon, D. Quaglino, Jr., G. Salvati, and A. Margreth. Denervation-induced proliferative changes of triads in rabbit skeletal muscle. *Muscle Nerve* 11: 1246-1259, 1988.
- Salvati, G. and P. Volpe. Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum of skinned fast- and slow-twitch muscle fibers. *Am.J.Physiol* 254: C459-C465, 1988.

- Samsó, M., R. Trujillo, G. B. Gurrola, H. H. Valdivia, and T. Wagenknecht. Three-dimensional location of the imperatoxin A binding site on the ryanodine receptor. *J.Cell Biol.* 146: 493-499, 1999.
- Samsó, M. and T. Wagenknecht. Apocalmodulin and Ca²⁺-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor. *J.Biol.Chem.* 277: 1349-1353, 2002.
- Samson, F., L. Mesnard, M. Mihovilovic, T. G. Potter, J. J. Mercadier, A. D. Roses, and J. R. Gilbert. A new human slow skeletal troponin T (TnTs) mRNA isoform derived from alternative splicing of a single gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199: 841-847, 1994.
- Sano, K., K. Maeda, T. Oda, and Y. Maeda. The effect of single residue substitutions of serine-283 on the strength of head-to-tail interaction and actin binding properties of rabbit skeletal muscle alpha-tropomyosin. *J.Biochem.(Tokyo)* 127: 1095-1102, 2000.
- Satyshur, K. A., S. T. Rao, D. Pyzalska, W. Drendel, M. Greaser, and M. Sundaralingam. Refined structure of chicken skeletal muscle troponin C in the two-calcium state at 2-Å resolution. *J.Biol.Chem.* 263: 1628-1647, 1988.
- Schachat, F., J. M. Schmidt, M. Maready, and M. M. Briggs. Chicken perinatal troponin Ts are generated by a combination of novel and phylogenetically conserved alternative splicing pathways. *Dev.Biol.* 171: 233-239, 1995.
- Schachat, F. H., M. S. Diamond, and P. W. Brandt. Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J.Mol.Biol.* 198: 551-554, 1987.
- Schaertl, S., S. S. Lehrer, and M. A. Geeves. Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation. *Biochemistry* 34: 15890-15894, 1995.
- Schiaffino, S., L. Gorza, G. Pitton, L. Saggin, S. Ausoni, S. Sartore, and T. Lomo. Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle. *Dev.Biol.* 127: 1-11, 1988.
- Schiaffino, S. and C. Reggiani. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev.* 76: 371-423, 1996.
- Schiaffino, S. and A. Serrano. Calcineurin signaling and neural control of skeletal muscle fiber type and size. *Trends Pharmacol.Sci.* 23: 569-575, 2002.
- Schiefer, A., G. Meissner, and G. Isenberg. Ca²⁺ activation and Ca²⁺ inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channels. *J.Physiol* 489 (Pt 2): 337-348, 1995.
- Schneider, M. F. and W. K. Chandler. Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242: 244-246, 1973.
- Schulte, L. M., J. Navarro, and S. C. Kandarian. Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium pump gene expression by hindlimb unweighting. *Am.J.Physiol* 264: C1308-C1315, 1993.
- Scott, B. T., H. K. Simmerman, J. H. Collins, B. Nadal-Ginard, and L. R. Jones. Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J.Biol.Chem.* 263: 8958-8964, 1988.
- Semsarian, C., M. J. Wu, Y. K. Ju, T. Marciniak, T. Yeoh, D. G. Allen, R. P. Harvey, and R. M. Graham. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 400: 576-581, 1999.

- Sencer, S., R. V. Papineni, D. B. Halling, P. Pate, J. Krol, J. Z. Zhang, and S. L. Hamilton. Coupling of RYR1 and L-type calcium channels via calmodulin binding domains. *J.Biol.Chem.* 276: 38237-38241, 2001.
- Serysheva, I. I., E. V. Orlova, W. Chiu, M. B. Sherman, S. L. Hamilton, and M. van Heel. Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel. *Nat.Struct.Biol.* 2: 18-24, 1995.
- Shah, P. K. and R. Sowdhamini. Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein Eng* 14: 867-874, 2001.
- Sharma, M. R., P. Penczek, R. Grassucci, H. B. Xin, S. Fleischer, and T. Wagenknecht. Cryoelectron microscopy and image analysis of the cardiac ryanodine receptor. *J.Biol.Chem.* 273: 18429-18434, 1998.
- Sheng, Z., B. S. Pan, T. E. Miller, and J. D. Potter. Isolation, expression, and mutation of a rabbit skeletal muscle cDNA clone for troponin I. The role of the NH2 terminus of fast skeletal muscle troponin I in its biological activity. *J.Biol.Chem.* 267: 25407-25413, 1992.
- Sheng, Z., W. L. Strauss, J. M. Francois, and J. D. Potter. Evidence that both Ca(2+)-specific sites of skeletal muscle TnC are required for full activity. *J.Biol.Chem.* 265: 21554-21560, 1990.
- Sherwood, D. J., S. D. Dufresne, J. F. Markuns, B. Cheatham, D. E. Moller, D. Aronson, and L. J. Goodyear. Differential regulation of MAP kinase, p70(S6K), and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 276: E870-E878, 1999.
- Shou, W., B. Aghdasi, D. L. Armstrong, Q. Guo, S. Bao, M. J. Charng, L. M. Mathews, M. D. Schneider, S. L. Hamilton, and M. M. Matzuk. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391: 489-492, 1998.
- Sia, S. K., M. X. Li, L. Spyropoulos, S. M. Gagne, W. Liu, J. A. Putkey, and B. D. Sykes. Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *J.Biol.Chem.* 272: 18216-18221, 1997.
- Sitsapesan, R. and A. J. Williams. Cyclic ADP-ribose and related compounds activate sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel. *Am.J.Physiol* 268: C1235-C1240, 1995a.
- Sitsapesan, R. and A. J. Williams. The gating of the sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel is regulated by luminal Ca²⁺. *J.Membr.Biol.* 146: 133-144, 1995b.
- Skorjanc, D., F. Jaschinski, G. Heine, and D. Pette. Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Am.J.Physiol* 274: C810-C818, 1998.
- Slavik, K. J., J. P. Wang, B. Aghdasi, J. Z. Zhang, F. Mandel, N. Malouf, and S. L. Hamilton. A carboxy-terminal peptide of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor inhibits Ca(2+)-release channels. *Am.J.Physiol* 272: C1475-C1481, 1997.
- Smillie, L. B., K. Golosinska, and F. C. Reinach. Sequences of complete cDNAs encoding four variants of chicken skeletal muscle troponin T. *J.Biol.Chem.* 263: 18816-18820, 1988.
- Smith, J. S., R. Coronado, and G. Meissner. Sarcoplasmic reticulum contains adenine nucleotide-activated calcium channels. *Nature* 316: 446-449, 1985.
- Smith, J. S., R. Coronado, and G. Meissner. Single-channel calcium and barium currents of large and small conductance from sarcoplasmic reticulum. *Biophys.J.* 50: 921-928, 1986a.

- Smith, J. S., R. Coronado, and G. Meissner. Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca²⁺ and ATP and modulation by Mg²⁺. *J.Gen.Physiol* 88: 573-588, 1986b.
- Smith, J. S., E. Rousseau, and G. Meissner. Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ.Res.* 64: 352-359, 1989.
- Solaro, R. J., J. A. Lee, J. C. Kentish, and D. G. Allen. Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ.Res.* 63: 779-787, 1988.
- Sonnleitner, A., S. Fleischer, and H. Schindler. Gating of the skeletal calcium release channel by ATP is inhibited by protein phosphatase 1 but not by Mg²⁺. *Cell Calcium* 21: 283-290, 1997.
- Sorrentino, V. and P. Volpe. Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol.Sci.* 14: 98-103, 1993.
- Spector, S. A. Trophic effects on the contractile and histochemical properties of rat soleus muscle. *J.Neurosci.* 5: 2189-2196, 1985.
- Spector, S. A., C. P. Simard, M. Fournier, E. Sternlicht, and V. R. Edgerton. Architectural alterations of rat hind-limb skeletal muscles immobilized at different lengths. *Exp.Neurol.* 76: 94-110, 1982.
- Stange, M., A. Tripathy, and G. Meissner. Two domains in dihydropyridine receptor activate the skeletal muscle Ca(2+) release channel. *Biophys.J.* 81: 1419-1429, 2001.
- Staron, R. S., W. J. Kraemer, R. S. Hikida, D. W. Reed, J. D. Murray, G. E. Campos, and S. E. Gordon. Comparison of soleus muscles from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days. *Histochem.Cell Biol.* 110: 73-80, 1998.
- Steffen, J. M. and X. J. Musacchia. Effect of seven days of spaceflight on hindlimb muscle protein, RNA and DNA in adult rats. *Physiologist* 28: S221-S222, 1985.
- Steffen, J. M. and X. J. Musacchia. Thymic involution in the suspended rat: adrenal hypertrophy and glucocorticoid receptor content. *Aviat.Space Environ.Med.* 57: 162-167, 1986.
- Steffen, J. M. and X. J. Musacchia. Disuse atrophy, plasma corticosterone, and muscle glucocorticoid receptor levels. *Aviat. Space Environ. Med.* 58: 996-1000, 1987.
- Stein, T. P., M. J. Leskiw, M. D. Schluter, M. R. Donaldson, and I. Larina. Protein kinetics during and after long-duration spaceflight on MIR. *Am.J.Physiol* 276: E1014-E1021, 1999.
- Stein, T. P., M. D. Schluter, and M. J. Leskiw. Cortisol, insulin and leptin during space flight and bed rest. *J.Gravit.Physiol* 6: 85-86, 1999.
- Stephenson, D. G. and R. Thieleczek. Activation of the contractile apparatus of skinned fibres of frog by the divalent cations barium, cadmium and nickel. *J.Physiol* 380: 75-92, 1986.
- Stevens, L., C. Firinga, B. Gohlsch, B. Bastide, Y. Mounier, and D. Pette. Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 279: C1558-C1563, 2000.
- Stevens, L., B. Gohlsch, Y. Mounier, and D. Pette. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett.* 463: 15-18, 1999a.

- Stevens, L., B. Gohlsch, Y. Mounier, and D. Pette. Upregulation of myosin heavy chain MHC1alpha in rat muscles after unweighting and clenbuterol treatment. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 275: 418-421, 2000.
- Stevens, L. and Y. Mounier. Ca²⁺ movements in sarcoplasmic reticulum of rat soleus fibers after hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* 72: 1735-1740, 1992.
- Stevens, L., Y. Mounier, and X. Holy. Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am.J.Physiol* 264: R770-R776, 1993.
- Stevens, L., Y. Mounier, X. Holy, and M. Falempin. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* 68: 334-340, 1990.
- Stevens, L., K. R. Sultan, H. Peuker, B. Gohlsch, Y. Mounier, and D. Pette. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am.J.Physiol* 277: C1044-C1049, 1999b.
- Su, J. Y. and Y. I. Chang. Modulation of the ryanodine receptor sarcoplasmic reticular Ca²⁺ channel in skinned fibers of fast- and slow-twitch skeletal muscles from rabbits. *Pflugers Arch.* 430: 358-364, 1995.
- Suarez, M. C., C. J. Machado, L. M. Lima, L. B. Smillie, J. R. Pearlstone, J. L. Silva, M. M. Sorenson, and D. Foguel. Role of hydration in the closed-to-open transition involved in Ca²⁺ binding by troponin C. *Biochemistry* 42: 5522-5530, 2003.
- Sutko, J. L. and J. A. Airey. Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: does diversity in form equal diversity in function? *Physiol Rev.* 76: 1027-1071, 1996.
- Swartz, D. R. and R. L. Moss. Influence of a strong-binding myosin analogue on calcium-sensitive mechanical properties of skinned skeletal muscle fibers. *J.Biol.Chem.* 267: 20497-20506, 1992.
- Sweeney, H. L., B. F. Bowman, and J. T. Stull. Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am.J.Physiol* 264: C1085-C1095, 1993.
- Sweeney, H. L., R. M. Brito, P. R. Rosevear, and J. A. Putkey. The low-affinity Ca²⁺(+)-binding sites in cardiac/slow skeletal muscle troponin C perform distinct functions: site I alone cannot trigger contraction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 9538-9542, 1990.
- Syrový, I., E. Gutmann, and J. Melichna. The effect of denervation on contraction and myosin properties of fast and slow rabbit and cat muscles. *Physiol Bohemoslov.* 21: 353-359, 1972.
- Syska, H., J. M. Wilkinson, R. J. Grand, and S. V. Perry. The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem.J.* 153: 375-387, 1976.
- Szczesna, D., G. Guzman, T. Miller, J. Zhao, K. Farokhi, H. Ellemberger, and J. D. Potter. The role of the four Ca²⁺ binding sites of troponin C in the regulation of skeletal muscle contraction. *J.Biol.Chem.* 271: 8381-8386, 1996.
- Taillandier, D., E. Aourousseau, L. Combaret, C. Y. Guezennec, and D. Attaix. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *Int J Biochem Cell Biol* May;35(5):665-75, 2003.
- Taillandier, D., E. Aourousseau, D. Meynial-Denis, D. Bechet, M. Ferrara, P. Cottin, A. Ducastaing, X. Bigard, C. Y. Guezennec, H. P. Schmid, and . Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem.J.* 316 (Pt 1): 65-72, 1996.

- Takagi, A., K. Yonemoto, and H. Sugita. Single-skinned human muscle fibers: activation by calcium and strontium. *Neurology* 28: 497-499, 1978.
- Takahashi, H., M. Wada, and S. Katsuta. Expressions of myosin heavy chain IId isoform in rat soleus muscle during hindlimb suspension. *Acta Physiol Scand.* 143: 131-132, 1991.
- Takeda, S., T. Kobayashi, H. Taniguchi, H. Hayashi, and Y. Maeda. Structural and functional domains of the troponin complex revealed by limited digestion. *Eur.J.Biochem.* 246: 611-617, 1997.
- Takekura, H., L. Bennett, T. Tanabe, K. G. Beam, and C. Franzini-Armstrong. Restoration of junctional tetrads in dysgenic myotubes by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys.J.* 67: 793-803, 1994.
- Takekura, H., B. E. Flucher, and C. Franzini-Armstrong. Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T- Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev.Biol.* 239: 204-214, 2001.
- Takekura, H., N. Kasuga, K. Kitada, and T. Yoshioka. Morphological changes in the triads and sarcoplasmic reticulum of rat slow and fast muscle fibres following denervation and immobilization. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 17: 391-400, 1996.
- Takekura, H., M. Nishi, T. Noda, H. Takeshima, and C. Franzini-Armstrong. Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 3381-3385, 1995.
- Takekura, H., X. Sun, and C. Franzini-Armstrong. Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: peripheral and internal calcium release units are formed sequentially . *J.Muscle Res.Cell Motil.* 15: 102-118, 1994.
- Takeshima, H. Primary structure and expression from cDNAs of the ryanodine receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 707: 165-177, 1993.
- Takeshima, H., S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, T. Hirose, and . Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439-445, 1989.
- Takeshima, H., T. Yamazawa, T. Ikemoto, H. Takekura, M. Nishi, T. Noda, and M. Iino. Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *EMBO J.* 14: 2999-3006, 1995.
- Talbot, J. A. and R. S. Hodges. Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit skeletal troponin I. Relationship of amino acid sequence to biological activity. *J.Biol.Chem.* 256: 2798-2802, 1981.
- Talmadge, R. J., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J.Appl.Physiol* 81: 2540-2546, 1996.
- Tanabe, T., K. G. Beam, B. A. Adams, T. Niidome, and S. Numa. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346: 567-569, 1990.
- Tanabe, T., K. G. Beam, J. A. Powell, and S. Numa. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336: 134-139, 1988.
- Tang, W., S. Sencer, and S. L. Hamilton. Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front Biosci.* 7: d1583-d1589, 2002.

- Tao, T., B. J. Gong, and P. C. Leavis. Calcium-induced movement of troponin-I relative to actin in skeletal muscle thin filaments. *Science* 247: 1339-1341, 1990.
- Tarroni, P., D. Rossi, A. Conti, and V. Sorrentino. Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J.Biol.Chem.* 272: 19808-19813, 1997.
- Taylor, S. S., D. R. Knighton, J. Zheng, J. M. Sowadski, C. S. Gibbs, and M. J. Zoller. A template for the protein kinase family. *Trends Biochem.Sci.* 18: 84-89, 1993.
- Templeton, G. H., H. L. Sweeney, B. F. Timson, M. Padalino, and G. A. Dudenhoefter. Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J.Appl.Physiol* 65: 1191-1195, 1988.
- Thomason, D. B., R. B. Biggs, and F. W. Booth. Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am.J.Physiol* 257: R300-R305, 1989.
- Thomason, D. B. and F. W. Booth. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J.Appl.Physiol* 68: 1-12, 1990.
- Thomason, D. B., R. E. Herrick, D. Surdyka, and K. M. Baldwin. Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J.Appl.Physiol* 63: 130-137, 1987.
- Thomason, D. B., P. R. Morrison, V. Oganov, E. Ilyina-Kakueva, F. W. Booth, and K. M. Baldwin. Altered actin and myosin expression in muscle during exposure to microgravity. *J.Appl.Physiol* 73: 90S-93S, 1992.
- Tikunova, S. B., J. A. Rall, and J. P. Davis. Effect of hydrophobic residue substitutions with glutamine on Ca(2+) binding and exchange with the N-domain of troponin C. *Biochemistry* 41: 6697-6705, 2002.
- Timerman, A. P., E. Ogunbumni, E. Freund, G. Wiederrecht, A. R. Marks, and S. Fleischer. The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 268: 22992-22999, 1993.
- Tinker, A. and A. J. Williams. Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J.Gen.Physiol* 100: 479-493, 1992.
- Tobacman, L. S., M. Nihli, C. Butters, M. Heller, V. Hatch, R. Craig, W. Lehman, and E. Homsher. The troponin tail domain promotes a conformational state of the thin filament that suppresses myosin activity. *J.Biol.Chem.* 277: 27636-27642, 2002.
- Torres, C. R. and G. W. Hart. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J.Biol.Chem.* 259: 3308-3317, 1984.
- Tripathy, A. and G. Meissner. Sarcoplasmic reticulum luminal Ca²⁺ has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *Biophys.J.* 70: 2600-2615, 1996.
- Tripet, B., G. De Crescenzo, S. Grothe, M. O'Connor-McCourt, and R. S. Hodges. Kinetic analysis of the interactions between Troponin C (TnC) and Troponin I (TnI) binding peptides: evidence for separate binding sites for the 'structural' N-terminus and the 'regulatory' C-terminus of TnI on TnC. *J.Mol.Recognit.* 16: 37-53, 2003.
- Tripet, B., J. E. Van Eyk, and R. S. Hodges. Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca²⁺-dependent regulation of muscle contraction. *J.Mol.Biol.* 271: 728-750, 1997.

- Valencia, F. F., A. A. Paulucci, R. B. Quaggio, A. C. Da Silva, C. S. Farah, and F. F. Reinach. Parallel measurement of Ca²⁺-binding and fluorescence emission upon Ca²⁺ titration of recombinant skeletal muscle troponin C: Measurement of sequential calcium binding to the regulatory sites. *J.Biol.Chem.* 2003.
- Vandekerckhove, J., G. Bugaisky, and M. Buckingham. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J.Biol.Chem.* 261: 1838-1843, 1986.
- Van Eerd, J. P. and K. Takahashi. The amino acid sequence of bovine cardiac troponin-C. Comparison with rabbit skeletal troponin-C. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 64: 122-127, 1975.
- Vergara, J., R. Y. Tsien, and M. Delay. Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82: 6352-6356, 1985.
- Vibert, P., R. Craig, and W. Lehman. Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J.Mol.Biol.* 266: 8-14, 1997.
- Volpe, P., G. Salviati, F. Di Virgilio, and T. Pozzan. Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* 316: 347-349, 1985.
- Vrbova, G. Changes in the motor reflexes produced by tenotomy. *J. Physiol.*, 166, 241-250, 1963.
- Wagenknecht, T., R. Grassucci, J. Frank, A. Saito, M. Inui, and S. Fleischer. Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 338: 167-170, 1989.
- Wagenknecht, T., M. Radermacher, R. Grassucci, J. Berkowitz, H. B. Xin, and S. Fleischer. Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J.Biol.Chem.* 272: 32463-32471, 1997.
- Wagner, P. D. and E. Giniger. Calcium-sensitive binding of heavy meromyosin to regulated actin in the presence of ATP. *J.Biol.Chem.* 256: 12647-12650, 1981.
- Walro, J. M., J. Wang, and G. M. Story. Afferent-inherent regulation of myosin heavy chain isoforms in rat muscle spindles. *Muscle Nerve* 20: 1549-1560, 1997.
- Walters, E. H., N. C. Stickland, and P. T. Loughna. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 21: 647-653, 2000.
- Wang, J. and P. M. Best. Inactivation of the sarcoplasmic reticulum calcium channel by protein kinase. *Nature* 359: 739-741, 1992.
- Wang, C. K. and H. C. Cheung. Energetics of the binding of calcium and troponin I to troponin C from rabbit skeletal muscle. *Biophys.J.* 48: 727-739, 1985.
- Wang, J. and J. P. Jin. Primary structure and developmental acidic to basic transition of 13 alternatively spliced mouse fast skeletal muscle troponin T isoforms. *Gene* 193: 105-114, 1997.
- Wang, J. and J. P. Jin. Conformational modulation of troponin T by configuration of the NH₂-terminal variable region and functional effects. *Biochemistry* 37: 14519-14528, 1998.

- Wang, J., D. L. McWhorter, and J. M. Walro. Stability of myosin heavy chain isoforms in selectively denervated adult rat muscle spindles. *Anat.Rec.* 249: 32-43, 1997.
- Warrick, H. M. and J. A. Spudich. Myosin structure and function in cell motility. *Annu.Rev.Cell Biol.* 3: 379-421, 1987.
- Watson, M. H., A. K. Taneja, R. S. Hodges, and A. S. Mak. Phosphorylation of alpha alpha- and beta beta-tropomyosin and synthetic peptide analogues. *Biochemistry* 27: 4506-4512, 1988.
- Weis, J., M. Kaussen, S. Calvo, and A. Buonanno. Denervation induces a rapid nuclear accumulation of MRF4 in mature myofibers. *Dev.Dyn.* 218: 438-451, 2000.
- Wells, L., K. Vosseller, and G. W. Hart. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291: 2376-2378, 2001.
- Wetzel, P., T. Liebner, and G. Gros. Carbonic anhydrase inhibition and calcium transients in soleus fibers. *FEBS Lett.* 267: 66-70, 1990.
- Whalen, R. G., G. S. Butler-Browne, and F. Gros. Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73: 2018-2022, 1976.
- Wheeler, M. T., E. C. Snyder, M. N. Patterson, and S. J. Swoap. An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am.J.Physiol* 276: C1069-C1078, 1999.
- White, S. P., C. Cohen, and G. N. Phillips, Jr. Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* 325: 826-828, 1987.
- Widrick, J. J., S. T. Knuth, K. M. Norenberg, J. G. Romatowski, J. L. Bain, D. A. Riley, M. Karhanek, S. W. Trappe, T. A. Trappe, D. L. Costill, and R. H. Fitts. Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J.Physiol* 516 (Pt 3): 915-930, 1999.
- Wilkens, C. M., N. Kasielke, B. E. Flucher, K. G. Beam, and M. Grabner. Excitation-contraction coupling is unaffected by drastic alteration of the sequence surrounding residues L720-L764 of the alpha 1S II-III loop. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 5892-5897, 2001.
- Wilkinson, J. M. Troponin C from rabbit slow skeletal and cardiac muscle is the product of a single gene. *Eur.J.Biochem.* 103: 179-188, 1980.
- Williams, D. L., Jr., L. E. Greene, and E. Eisenberg. Cooperative turning on of myosin subfragment 1 adenosinetriphosphatase activity by the troponin-tropomyosin-actin complex. *Biochemistry* 27: 6987-6993, 1988.
- Woods, E. F. Molecular weight and subunit structure of tropomyosin B. *J.Biol.Chem.* 242: 2859-2871, 1967.
- Wu, Q. L., P. K. Jha, M. K. Raychowdhury, Y. Du, P. C. Leavis, and S. Sarkar. Isolation and characterization of human fast skeletal beta troponin T cDNA: comparative sequence analysis of isoforms and insight into the evolution of members of a multigene family. *DNA Cell Biol.* 13: 217-233, 1994.
- Wu, H., B. Rothermel, S. Kanatous, P. Rosenberg, F. J. Naya, J. M. Shelton, K. A. Hutcheson, J. M. DiMaio, E. N. Olson, R. Bassel-Duby, and R. S. Williams. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J.* 20: 6414-6423, 2001.

- Xia, R., T. Stangler, and J. J. Abramson. Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J.Biol.Chem.* 275: 36556-36561, 2000.
- Xu, C., R. Craig, L. Tobacman, R. Horowitz, and W. Lehman. Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophys.J.* 77: 985-992, 1999.
- Xu, L., G. Mann, and G. Meissner. Regulation of cardiac Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circ.Res.* 79: 1100-1109, 1996.
- Xu, Q., L. Yu, L. Liu, C. F. Cheung, X. Li, S. P. Yee, X. J. Yang, and Z. Wu. p38 Mitogen-activated protein kinase-, calcium-calmodulin-dependent protein kinase-, and calcineurin-mediated signaling pathways transcriptionally regulate myogenin expression. *Mol.Biol.Cell* 13: 1940-1952, 2002.
- Yamaguchi, N., C. Xin, and G. Meissner. Identification of apocalmodulin and Ca²⁺-calmodulin regulatory domain in skeletal muscle Ca²⁺ release channel, ryanodine receptor. *J.Biol.Chem.* 276: 22579-22585, 2001.
- Yamamoto, T. and N. Ikemoto. T-tubule depolarization-induced local events in the ryanodine receptor, as monitored with the fluorescent conformational probe incorporated by mediation of peptide A. *J.Biol.Chem.* 277: 984-992, 2002.
- Yamamoto, T., J. Rodriguez, and N. Ikemoto. Ca²⁺-dependent dual functions of peptide C. The peptide corresponding to the Glu724-Pro760 region (the so-called determinant of excitation-contraction coupling) of the dihydropyridine receptor alpha 1 subunit II-III loop. *J.Biol.Chem.* 277: 993-1001, 2002.
- Yang, D., Z. Pan, H. Takeshima, C. Wu, R. Y. Nagaraj, J. Ma, and H. Cheng. RyR3 amplifies RyR1-mediated Ca(2+)-induced Ca(2+) release in neonatal mammalian skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 276: 40210-40214, 2001.
- Yano, K. and A. Zarain-Herzberg. Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Mol.Cell Biochem.* 135: 61-70, 1994.
- Yki-Jarvinen, H., A. Virkamaki, M. C. Daniels, D. McClain, and W. K. Gottschalk. Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo. *Metabolism* 47: 449-455, 1998.
- Yonemura, I., T. Hirabayashi, and J. Miyazaki. Heterogeneity of chicken slow skeletal muscle troponin T mRNA. *J.Exp.Zool.* 286: 149-156, 2000.
- Yonemura, I., Y. Mitani, K. Nakada, S. Akutsu, and J. Miyazaki. Developmental changes of cardiac and slow skeletal muscle troponin T expression in chicken cardiac and skeletal muscles. *Zoolog.Sci.* 19: 215-223, 2002.
- Yuasa, K., H. Michibata, K. Omori, and N. Yanaka. A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T. *J.Biol.Chem.* 274: 37429-37434, 1999.
- Zador, E., L. Dux, and F. Wuytack. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 20: 395-402, 1999.
- Zhang, L., C. Franzini-Armstrong, V. Ramesh, and L. R. Jones. Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J.Mol.Cell Cardiol.* 33: 233-247, 2001.
- Zhang, L., J. Kelley, G. Schmeisser, Y. M. Kobayashi, and L. R. Jones. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J.Biol.Chem.* 272: 23389-23397, 1997.

Zhao, M., P. Li, X. Li, L. Zhang, R. J. Winkfein, and S. R. Chen. Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment. *J.Biol.Chem.* 274 : 25971-25974, 1999.

Zorzato, F., J. Fujii, K. Otsu, M. Phillips, N. M. Green, F. A. Lai, G. Meissner, and D. H. MacLennan. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 265: 2244-2256, 1990.

Zorzato, F., P. Volpe, E. Damiani, D. Quaglino, Jr., and A. Margreth. Terminal cisternae of denervated rabbit skeletal muscle: alterations of functional properties of Ca²⁺ release channels. *Am.J.Physiol* 257: C504-C511, 1989.

Zot, A. S. and J. D. Potter. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* 16: 535-559, 1987.

Zot, A. S. and J. D. Potter. Reciprocal coupling between troponin C and myosin crossbridge attachment. *Biochemistry* 28: 6751-6756, 1989.

Zot, H. G. and J. D. Potter. A structural role for the Ca²⁺-Mg²⁺ sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J.Biol.Chem.* 257: 7678-7683, 1982.