

Université des Sciences et Technologies de Lille I

U.F.R. de Biologie

THESE

Présentée par

Philippe KISCHEL

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Discipline : "Sciences de la Vie et de la Santé"

**EXPRESSION ET ROLE FONCTIONNEL DE LA TROPONINE C DANS
L'ACTIVITE CONTRACTILE, EN CONDITIONS NORMALES ET
APRES UN EPISODE D'HYPODYNAMIE – HYPOKINESIE.**

Présentée et soutenue publiquement

le 11 décembre 2000

JURY

Docteur X. BIGARD	Rapporteur
Docteur R. BORDET	Examineur
Docteur J.M. VAN ANCOIS	Examineur
Professeur Y. MOUNIER	Directeur de Thèse
Docteur R. VENTURA-CLAPIER	Rapporteur

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

REMERCIEMENTS

Madame le Professeur Y. Mounier, Directrice du Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, m'a fait l'honneur de m'accorder sa confiance en m'acceptant au sein de son équipe, en m'initiant à la recherche et en dirigeant mes travaux. Pour toutes ces raisons, ainsi que pour l'efficacité de son encadrement durant ces années, sans lequel ce travail n'aurait pu porter ses fruits, je la remercie sincèrement. J'espère que ce mémoire saura représenter dignement la reconnaissance que je lui porte.

Monsieur le Docteur J.M. François, de l'Université de Liège, a eu l'aimable gentillesse de me conseiller lors des expériences d'extraction et de remplacement des TnC, et de me fournir de la TnC d'anguille purifiée. Sa participation au Jury en tant qu'examineur me fait particulièrement plaisir, et je me dois de le remercier vivement pour son aide.

Madame le Docteur R. Ventura-Clapier, de l'Université de Paris Sud (Chatenay-Malabry) a accepté de rapporter sur ce travail. Je lui exprime toute mon estime pour ses compétences dans le domaine et suis très reconnaissant de sa participation dans le Jury.

Monsieur le Docteur A.X. Bigard, du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, me fait le grand plaisir d'être rapporteur de ce travail. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour l'honneur que vous me faites.

Monsieur le Docteur R. Bordet a aimablement accepté d'examiner mon travail, et je lui exprime ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également au Professeur J.D. Potter, de l'Université de Miami, qui a fourni les TnC purifiées et le mutant VG2, sans lesquels une bonne partie de ce travail n'aurait pas pu aboutir. Sa gentillesse et sa disponibilité sont exemplaires.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur B. Bastide qui m'a apporté son aide et ses précieuses compétences, notamment pour la séparation et l'identification des isoformes de TnC. Sa disponibilité, son aide et la pertinence de ses conseils tout au long de ce travail m'ont été très bénéfiques, et je tiens à lui faire part de toute ma gratitude.

Mademoiselle le Docteur L. Stevens a contribué à différentes étapes de ce travail, avec sa gentillesse habituelle. Je tiens à la remercier vivement pour son soutien.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, statutaires ou étudiants, pour leur soutien et leur bonne humeur. Merci également à M. Mayer pour l'efficacité de son soutien logistique.

Je ne saurais terminer sans remercier du fond du cœur ma famille entière, pour leurs soutiens affectifs et financiers, sans lesquels ce travail de longue haleine n'aurait pas été possible.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	11
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	16
I. ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE ET PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT.....	17
1 - Structure du muscle	17
2 - Structure des fibres musculaires.....	19
3 - Structure des myofibrilles	21
4 - Les protéines contractiles motrices	21
a - L'actine	21
b - La myosine	25
5 - Principe général du mécanisme de la contraction musculaire – Le cycle ATPasique de la myosine	30
II. REGULATION CALCIQUE DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE.....	33
1 - Structure et polymorphisme des protéines régulatrices.....	33
a - La tropomyosine	33
b - La troponine I	36
c - La troponine C	42
d - La troponine T	49
2 - Vers un modèle de régulation de la contraction	58
a - Le modèle de l'inhibition stérique et ses limitations	58
b - Le modèle schématique de Lehrer : les hypothèses cinétiques	59

c - Le Ca^{2+} en tant que modulateur allostérique de la régulation de la contraction	62
d - Le couplage TnC – têtes S1 de myosine.....	67

III. MODULATION DE LA REGULATION DE LA CONTRACTION

MUSCULAIRE. ROLE DE LA TROPONINE C.....	69
1 - Modulation par les sites régulateurs de la troponine C	71
2 - Modulation par les cations divalents	72
a - Sr/Ba/Cd/Pb	72
b - Bases de la sensibilité au Strontium	73
3 - Modulation pharmacologique.....	75
a - Bases et intérêts	75
b - Le bépridil	76

MATERIELS ET METHODES..... 83

I. MATERIEL BIOLOGIQUE	84
1 - Singe (Macaca Mulatta)	84
2 - Rats (Souche Wistar).....	85
3 - Muscles étudiés	85
4 - Prélèvements	86
5 - Traitement des biopsies	89
II. DETERMINATION DES RELATIONS TENSION / pCa (T/pCa)	89
1 - Protocole de pelage	89
2 - Isolement des fibres.....	90
3 - Enregistrement des tensions isométriques.....	92

4 - Expression des résultats.....	93
5 - Critères fonctionnels de distinction entre fibres lentes et rapides	95
6 - Extraction / Remplacement des troponines C	95
7 - Composition des solutions	97
8 - Analyse statistique.....	98
III. ANALYSE STRUCTURALE DES MUSCLES ET DES FIBRES MUSCULAIRES	98
1 - Analyse des MHC	99
2 - Analyse des MLC et troponines.	100
3 - Analyse densitométrique	101
RESULTATS.....	103
I. PREMIERE PARTIE : EFFETS DU BEPRIDIL SUR LES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES : CARACTERISATION D'UN OUTIL PHARMACOLOGIQUE.....	104
Article : <i>Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles.....</i>	105
Article : <i>The role of the Ca²⁺ regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca²⁺ sensitizer bepridil</i>	113
II. SECONDE PARTIE : EFFETS DE LA MICROGRAVITE REELLE OU SIMULEE SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE ET LES PROPRIETES D'ACTIVATION CALCIQUE LIEES A LA TROPONINE C.	120
Article : <i>Expression and functional behaviour of troponin C in soleus muscle fibres after hindlimb unloading</i>	121
Article : <i>Plasticity of monkey triceps muscle fibers in microgravity conditions</i>	145

CONCLUSION GENERALE.....	169
1 – L'atrophie musculaire.....	170
2 – La transformation phénotypique des muscles antigraevitaires.....	173
3 – Les variations d'activation calcique.....	176
BIBLIOGRAPHIE	179

LISTE RECAPITULATIVE DES FIGURES

Fig. 1 :	Structure d'un muscle strié squelettique	18
Fig. 2 :	Relations entre le système tubulaire transverse (tubules T), le réticulum sarcoplasmique et les myofibrilles	20
Fig. 3 :	Organisation des filaments fins et épais au sein d'une fibre musculaire striée squelettique	22
Fig. 4 :	Photomicrographie ($\times 20000$) d'un sarcomère	23
Fig. 5 :	Structure et organisation des globules d'actine	24
Fig. 6 :	Détail et organisation des têtes de myosine au sein du sarcomère	26
Fig. 7 :	Description séquentielle des interactions actine – myosine conduisant à la production de force	31
Fig. 8 :	Localisation de la tropomyosine au sein du filament fin	34
Fig. 9 :	Relation activité ATPasique en fonction de la concentration en têtes S1	37 ; 64
Fig. 10 :	Localisation de la troponine I (en vert) au sein du filament fin	39
Fig. 11 :	Représentation de la structure cristalline de la TnC	43
Fig. 12 :	Description des motifs EF – Hand	44
Fig. 13 :	Résumé des interactions TnI – TnC	50
Fig. 14 :	Schématisation des interactions entre la TnI et la TnC, en absence et en présence de Ca^{2+}	51
Fig. 15 :	Représentation schématique de la TnT squelettique rapide de lapin (TnT2f)	52
Fig. 16 :	Récapitulatif des interactions existantes entre TnT (en bleu), TnC (en rouge), TnI (en vert) et le filament actine – tropomyosine	55
Fig. 17 :	Modèle schématique représentant les trois doubles états ("on" / "off", $+Ca^{2+}$ / $-Ca^{2+}$, "A" / "R") et leurs constantes d'équilibre	61

Fig. 18 : Représentation schématique des analogies entre les états "off" et "on" du filament fin et les états "R" et "T" d'un système type MWC.....	65
Fig. 19 : Détermination des caractéristiques d'activation calciques avec la relation Tension / pCa.....	70
Fig. 20 : Identification de fibres rapides (a) et fibres lentes (b) de soleus de marsupial, à l'aide du critère Δ' ($pCa_{50} - pSr_{50}$).....	74
Fig. 21 : Structure du bépridil et localisation du site d'interaction avec la TnC.....	78
Fig. 22 : Représentation du mécanisme séquentiel d'ouverture du domaine amino-terminal de la TnC cardiaque par la séquence 147 – 163 de la TnI cardiaque ou par le bépridil.....	80
Fig. 23 : Anatomie de la patte postérieure du rat	87
Fig. 24 : Schéma du dispositif de montage d'une fibre musculaire pelée et du dispositif de mesure de la longueur de sarcomère	91
Fig. 25 : Détermination des deux coefficients de Hill n_1 ($P / P_0 > 50 \%$) et n_2 ($P / P_0 < 50 \%$), ainsi que la quantification du déplacement de la relation T / pCa en présence de bépridil (Δ_{10} , Δ_{50} et Δ_{90}).....	94

LISTE DES ABREVIATIONS

BPD : bépridil

CANP : Ca²⁺ activated neutral protease

DTNB : acide 5, 5'-dithio bis-2 nitrobenzoïque

DTT : dithiothreitol

EDTA : acide éthylène diamine tetraacétique

EGTA : acide éthylène glycol bis (β-aminoéthyl éther) N, N, N', N' tetraacétique

IAANS : acide 2-[4'-(iodoacetamide) aniline] naphthalene-6-sulfonique

K Prcp : propionate de potassium

Mg Ac : acétate de magnésium

MOPS : acide 3-(N morpholino) propane-sulfonique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

INTRODUCTION GENERALE

Selon le *petit Robert*, le muscle est "*une structure organique contractile qui assure les mouvements*". Cette description ne reflète cependant aucunement l'importance vitale de cette structure, qui participe aussi bien à l'homéostasie (constance du milieu intérieur, chère à Claude Bernard) qu'à l'action dans et sur l'environnement. Un de nos lointains ancêtres scientifiques, à qui des muscles au travail faisaient penser à des souris s'activant sous la peau, leur a donné le nom de muscles en référence à *mus musculus* ("petite souris"). L'appareil musculaire a d'abord été décrit par les histologistes. La compréhension du mécanisme de fonctionnement des muscles a dû attendre l'avènement des techniques biochimiques (travaux de Bailey et Ebashi notamment, au début des années 60), et c'est un biophysicien du nom d'Huxley qui a proposé en 1971 le premier schéma du mécanisme moléculaire de la contraction musculaire.

La principale caractéristique du muscle est son aptitude à transformer l'énergie chimique en énergie mécanique, c'est à dire sa capacité à produire de la force. Les muscles sont classés en trois catégories : les muscles lisses, qui assurent des fonctions viscérales indépendantes de la volonté, le muscle cardiaque, pompe vitale qui assure la circulation du sang, et les muscles squelettiques que les body-builders exercent et exhibent fièrement. Ces muscles squelettiques sont des tissus hétérogènes hautement structurés, et adaptés à leur fonction : assurer la posture (ils assurent le maintien des articulations du corps en luttant contre la gravité terrestre), ou assurer la locomotion et la manipulation (ils permettent alors le déplacement dans ou l'action sur l'environnement).

Les muscles sont constitués d'un assemblage de fibres musculaires, lentes ou rapides, pouvant être structurellement et fonctionnellement différentes : chaque muscle est unique en ce sens que ses propriétés contractiles résultent de la combinaison des propriétés intrinsèques de

chaque fibre et de la proportion de chaque type de fibre le constituant. Cette diversité dans la structure permet une adéquation avec la fonction et fait du muscle un tissu hautement spécialisé. Malgré cette diversité (dans la structure et dans la fonction), le mécanisme général de la contraction reste le même, et met en jeu l'interaction entre deux protéines contractiles, l'actine et la myosine.

Le muscle de l'individu adulte n'en reste pas moins "plastique". En effet, le tissu musculaire est une structure extrêmement dynamique, en perpétuel remodelage, capable de s'adapter à toute modification de l'environnement ou de l'activité de l'individu. Le polymorphisme des protéines est à la base de cette plasticité. Cette adaptation peut s'effectuer soit par des modifications des proportions des fibres lentes et rapides (transitions $L \leftrightarrow R$) et / ou par des modifications des propriétés (et donc de la structure) des fibres le constituant. C'est ainsi que les haltérophiles ou body-builders peuvent accroître force et masse musculaire en manipulant de la fonte. Les modifications par l'environnement sont, elles, d'autant plus flagrantes que les milieux sont "extrêmes" (milieux auxquels l'Homme est inadapté). De nombreuses études ont montré que des séjours dans l'espace altéraient de nombreuses fonctions physiologiques. Dans les conditions d'apesanteur et de confinement propres aux véhicules spatiaux, les membres inférieurs des individus sont en fait soumis à une absence de support du poids corporel (Hypodynamie), ainsi qu'à une réduction d'activité (Hypokinésie). Dans ces conditions, les fibres musculaires subissent une atrophie fonctionnelle dite de "non-utilisation", qui se manifeste de manière plus marquée sur les muscles lents antigravitaires, comme le soleus, ceux-ci ayant perdu leur fonction. En outre, il a été démontré que les fibres de soleus subissaient en plus un phénomène de transformation, les fibres passant d'un phénotype lent vers un phénotype rapide. On observe ainsi une augmentation de la proportion de fibres

rapides au détriment des fibres lentes au cours de situations d'Hypodynamie-Hypokinésie (H-H).

La protéine la plus étudiée à ce jour au cours d'épisodes d'H-H est la myosine. Les protéines régulatrices de la contraction deviennent aujourd'hui plus largement explorées, compte tenu de leur rôle déterminant dans le réglage fin des propriétés d'activation des fibres musculaires par le calcium. Parmi ces protéines, la troponine C (TnC) est responsable de la détection de la concentration calcique et de l'initiation d'une cascade d'évènements aboutissant à la génération de force par interaction entre myosine et actine. Deux isoformes de TnC existent dans le muscle squelettique ; celles-ci diffèrent par le nombre de sites de fixation du calcium. Il a été démontré que cette protéine intervenait sur les caractéristiques de l'activation calcique, étudiée via la relation entre la tension développée et la concentration calcique (relations Tension / pCa). L'évolution de cette protéine au cours du processus d'H-H est peu documentée sur muscle entier, et aucune donnée n'est disponible sur fibres isolées. Nous avons donc décidé de focaliser notre étude sur l'expression de la TnC et son influence sur les caractéristiques d'activation calcique. Il a fallu pour ce dernier point développer un outil, spécifique de la TnC sur fibres isolées et caractéristique du fonctionnement de chaque isoforme, afin de pouvoir déterminer le comportement de cette protéine dans les fibres coexprimant les deux isoformes (fibres hybrides) et évaluer le rôle de cette protéine dans le processus d'H-H. Nous avons utilisé le bépridil comme outil pharmacologique. Cette molécule possède la propriété de se fixer électivement sur la TnC et de pouvoir moduler l'affinité apparente de celle-ci pour les cations divalents.

Le vol international BION 11 nous a fourni l'opportunité d'étudier les modifications de la TnC après un épisode de microgravité réelle sur le triceps de singe, tandis que le modèle du rat

suspendu, qui mime au sol les effets de la microgravité sur les pattes postérieures de rat, a permis une étude sur les muscles posturaux comme le soleus.

Notre étude portera donc sur l'expression de la TnC et son fonctionnement au cours du processus de transformation induit par H-H consécutivement à une exposition à la microgravité simulée ou réelle.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Le tissu musculaire squelettique, qui constitue environ 40 % de la masse corporelle d'un humain, possède des propriétés fonctionnelles particulières : l'excitabilité, la contractilité, l'extensibilité et l'élasticité. Les propriétés contractiles et élastiques du muscle résultent du degré d'organisation des protéines myofibrillaires. L'évolution des protéines du cytosquelette telles l'actine et la myosine vers une organisation hautement structurée dans les muscles squelettiques et cardiaques, reflétée par l'aspect strié de ces muscles, a permis la stabilité et l'efficacité des contractions, adapté à la fonction musculaire chez les animaux supérieurs. Ces contractions résultent d'un processus conservé basé sur les interactions entre deux protéines contractiles, l'actine et la myosine, sous le contrôle d'un mécanisme fin de variation et de détection de la concentration calcique cytoplasmique par un complexe régulateur. La cohésion de cette structure complexe est assurée par des protéines structurales. Nous décrirons dans un premier temps les principales protéines constitutives (motrices et régulatrices) en détaillant leur polymorphisme (la plupart des protéines constituant les myofilaments existent sous de multiples isoformes, dont les combinaisons sont à la base de la diversité fonctionnelle existant dans les différents muscles). La fonction de chaque protéine sera abordée, et intégrée dans un modèle de régulation calcique de la contraction musculaire. Nous aborderons la modulation de cette régulation autour d'une protéine clé, la troponine C.

I. ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE ET PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

1 - STRUCTURE DU MUSCLE

Les muscles squelettiques sont constitués par une association de fibres. Leur insertion sur les os du squelette est réalisée le plus souvent par des tendons, constitués par le prolongement des

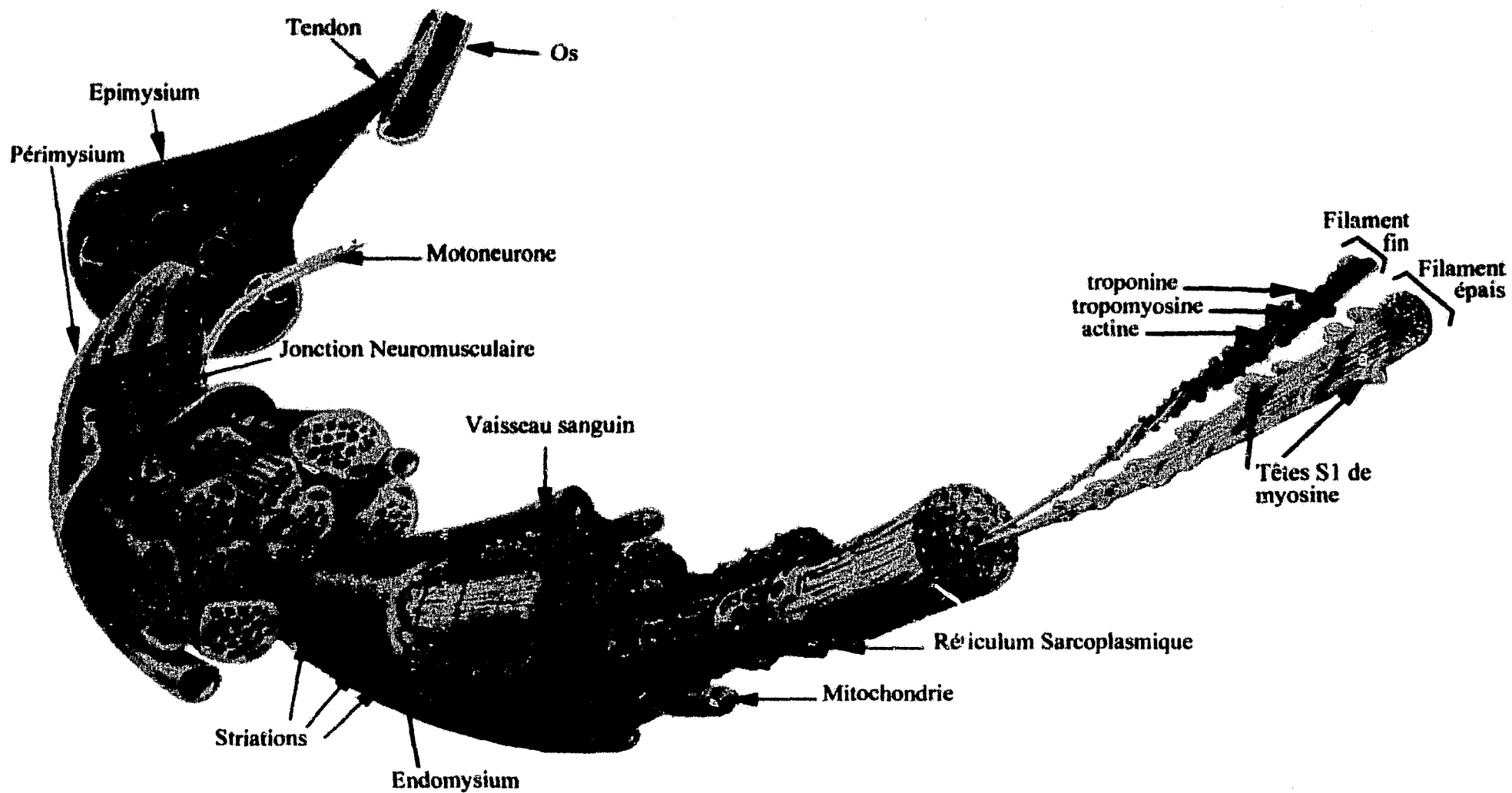


Fig. 1 : Structure d'un muscle strié squelettique.

différentes gaines conjonctives (Fig. 1) : endomysium des fibres, périmysium des faisceaux de fibres, et épimysium entourant le muscle. Ces gaines de tissu conjonctif permettent un maintien de la structure musculaire au repos, et assurent la transmission de force aux articulations par l'intermédiaire des tendons durant la contraction. Par ailleurs, le réseau de tissu conjonctif confère avec d'autres acteurs (protéines telles que la titine ou certaines parties de la molécule de myosine) des propriétés élastiques au muscle.

Le muscle est par ailleurs irrigué par des vaisseaux sanguins qui lui apportent nutriments et oxygène et le débarrassent de ses déchets (CO_2 , lactate).

2 - STRUCTURE DES FIBRES MUSCULAIRES

Le muscle strié squelettique est composé de fibres musculaires (d'un diamètre compris entre 20 et 150 μm), regroupées en faisceaux. Ces fibres musculaires sont des cellules plurinucléées géantes, pouvant mesurer jusqu'à plusieurs centimètres (Fig. 2).

Le sarcoplasme contient essentiellement des myofibrilles (de 1 à 2 μm de diamètre), constitués de myofilaments fins et épais (Fig. 1 et 2). Il contient aussi d'autres organites intracellulaires, telles que les mitochondries (centrales énergétiques de la cellule, cf. Fig. 1 et 2), et le réticulum sarcoplasmique (RS, réservoir à calcium de la cellule). Chaque myofibrille est enveloppée par un réseau membranaire complexe dérivé du sarcolemme, qui s'invagine à intervalles réguliers pour former le système tubulaire transverse (système T). Ces tubules T sont couplés au réticulum sarcoplasmique, formant ainsi des triades (Fig. 2). Le réticulum peut libérer son contenu et recharger le Ca^{2+} : il régule de la sorte la concentration calcique cytoplasmique sous le contrôle nerveux, l'excitation du sarcolemme entraînant la libération de l'ion par le RS par le phénomène de couplage excitation-contraction (Meizer et coll., 1995 pour revue).

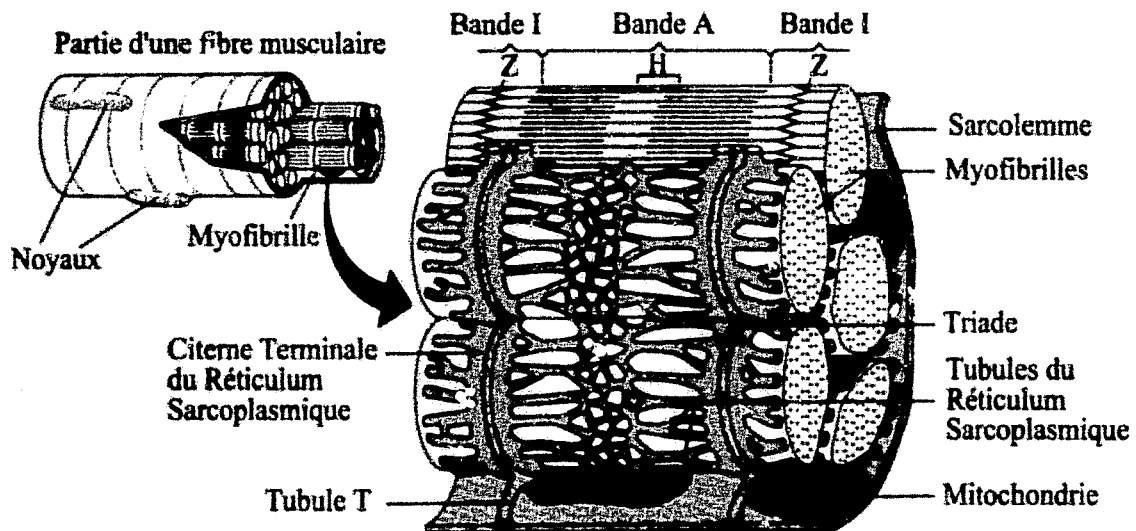


Fig. 2 : Relations entre le système tubulaire transverse (tubules T), le réticulum sarcoplasmique et les myofibrilles au sein d'une fibre musculaire striée squelettique (D'après Marieb, 1993).

Chaque cellule est sous le contrôle d'un seul neurone moteur, (innervation monosynaptique), un motoneurone pouvant innover plusieurs fibres pour former une unité motrice.

3 - STRUCTURE DES MYOFIBRILLES

La striation transversale caractéristique du muscle provient de l'organisation parallèle et alternée des sarcomères, unités anatomo-fonctionnelles de la myofibrille. Un sarcomère est délimité par deux stries Z (Fig. 2 et 3) et se compose principalement de deux types de filaments : le filament fin et le filament épais (Fig. 3c, d). En microscopie électronique, la région de chevauchement de ces 2 filaments apparaît plus sombre : elle représente la bande A (anisotrope), par opposition à la région plus claire (région isotrope) constituée uniquement de filaments fins (Fig. 3e). En fonction de l'état de contraction de la fibre, la bande isotrope est plus ou moins visible, tandis que la bande anisotrope reste constante : la longueur variable des sarcomères rend compte de l'état de contraction du muscle (Fig. 4).

Schématiquement, la contraction fait intervenir des interactions entre les filaments fins et épais entrelacés qui engendrent le coulisement actif (raccourcissement) ou passif (relaxation).

4 - LES PROTEINES CONTRACTILES MOTRICES

α - L'actine

α - Structure

L'actine monomérique est une protéine globulaire (actine G) d'un poids moléculaire de 43 kDa, qui possède quatre sous domaines (Fig. 5a). L'actine possède la propriété de polymériser spontanément en milieu salin. Les globules d'actine forment alors des filaments polaires (actine F, filamenteuse). Dans le sarcomère, les globules d'actine sont empilés de manière à former une hélice serrée, d'un diamètre de 8 nm. Le filament résultant donne une

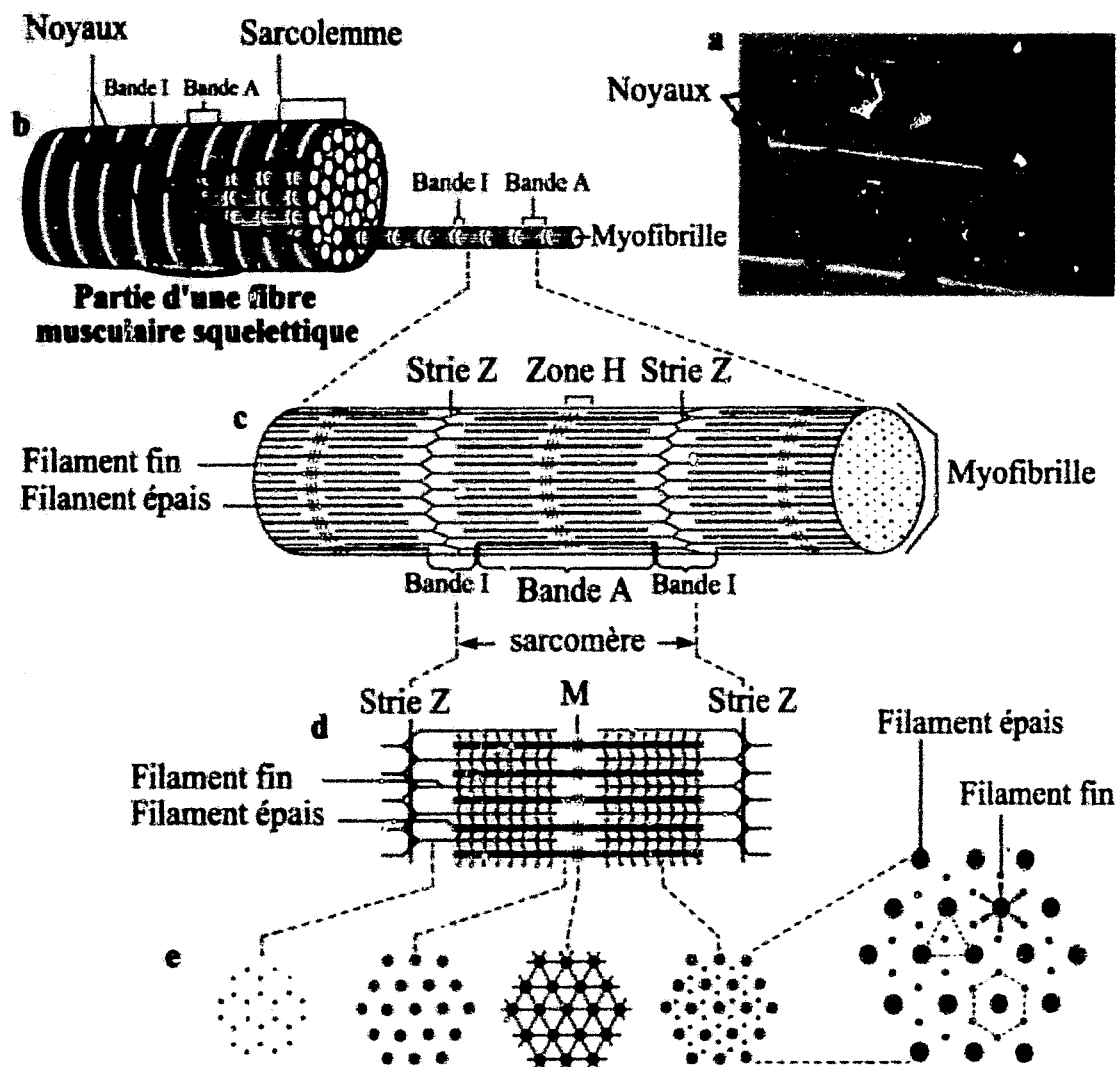


Fig. 3 : Organisation des filaments fins et épais au sein d'une fibre musculaire striée squelettique.

a : photomicrographie d'une portion de deux fibres musculaires isolées (x 250).

b : schéma d'une partie de la fibre composée de nombreuses myofibrilles

c : schéma d'une partie de myofibrille montrant la succession de sarcomères.

d : coupe longitudinale d'un sarcomère montrant la disposition des filaments fins et épais.

e : coupe transversale à différents endroits du sarcomère.

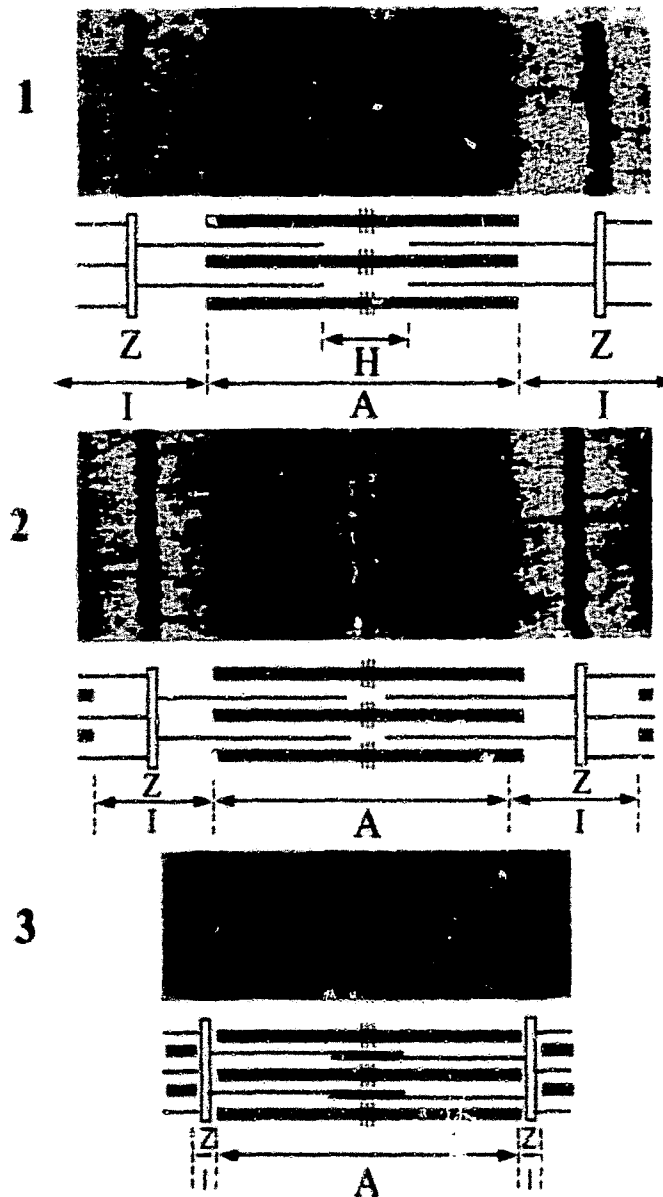


Fig. 4 : Photomicrographie (x 20000) d'un sarcomère au repos (1), en contraction partielle (2) et en contraction complète (3). Les stries Z délimitent le sarcomère. Bande A : bande Anisotrope, sa longueur ne varie pas avec l'état de contraction. Bande I : bande Isotrope, dont la longueur varie en fonction du degré de contraction de la fibre (D'après Marieb, 1993).

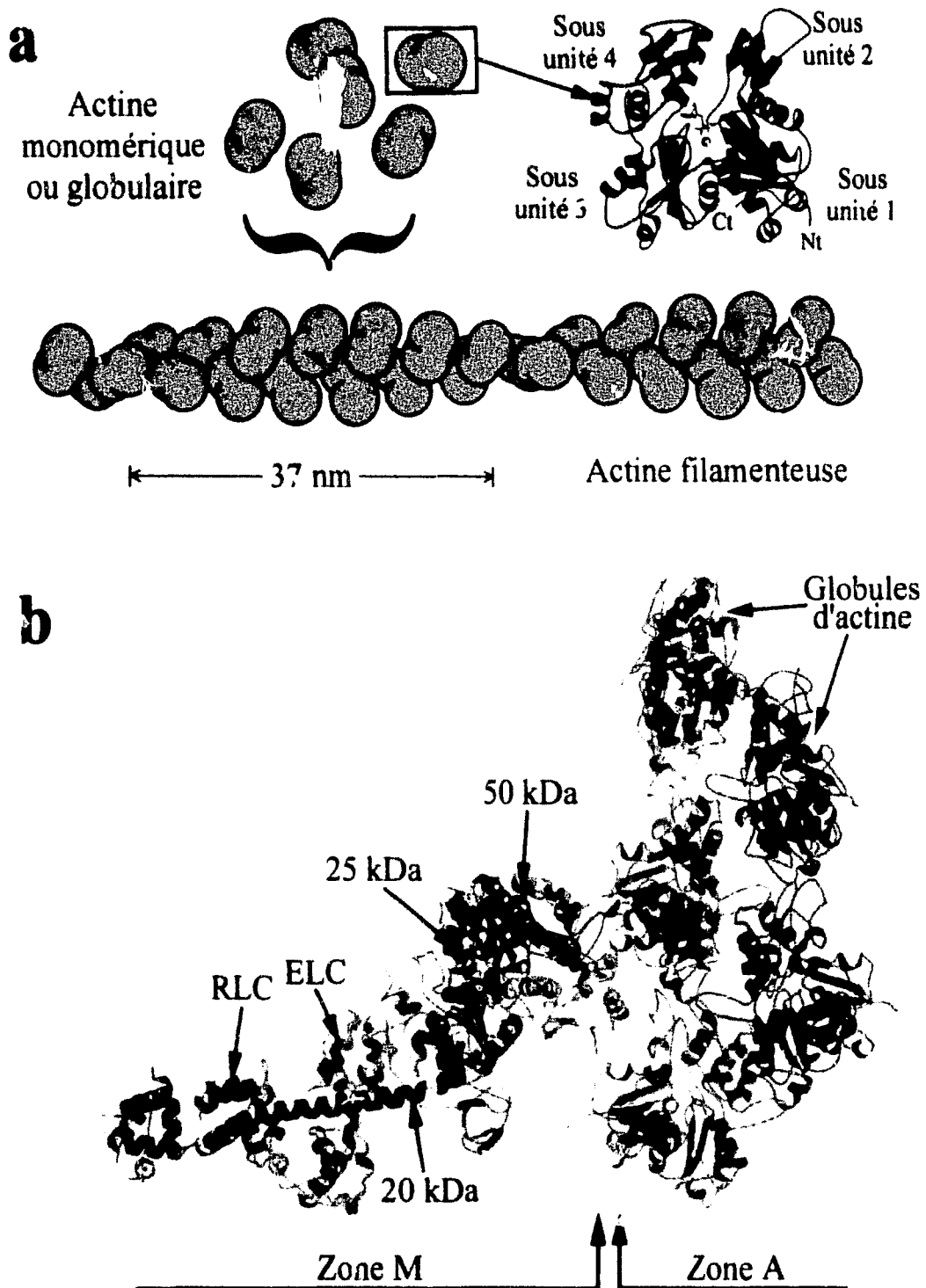


Fig. 5 : Structure et organisation des globules d'actine.

a : Arrangement des molécules globulaires d'actine dans le filament d'actine. L'assemblage des globules forme une hélice de type hélicoïdale (D'après Alberts et coll., 1990). L'agrandissement montre la structure d'un globule d'actine, organisée en quatre sous-unités.

b : Modélisation de l'interaction actine - myosine. A droite (zone A), cinq globules d'actine sont représentés (3 en vert et 2 en bleu). La tête S1 de myosine (à gauche, zone M) fait contact avec deux monomères d'actine adjacents. Les fragments protéolytiques sont colorés de manière différente : les domaines de 25 et 20 kDa sont représentés respectivement en vert et en bleu ; le domaine de 50 kDa est divisé en deux parties : le domaine supérieur (en rouge), et le domaine de liaison à l'actine (en gris). RLC et ELC figurent respectivement en magenta et vert tacheté de rouge.

structure en double hélice (Fig. 5a), les deux brins d'actine tournant l'un autour de l'autre tous les 37 nm.

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 diffèrent seulement de 4 acides aminés sur 374 (Vandekerckhove & Weber, 1979), et sont exprimées simultanément au cours du développement. Dans les muscles adultes, l'isoforme α -squelettique est exprimée dans les muscles squelettiques, tandis que l'isoforme α -cardiaque est exprimée dans le cœur (Vandekerckhove et coll., 1986)

γ - Fonction

L'actine F forme le squelette du filament fin. Chaque globule d'actine possède un site d'interaction (formé par les sous-domaines 1 et 2) pour les têtes de myosine (Holmes et coll., 1990 ; Fig. 5b). Elle représente donc un support architectural indispensable dans le mécanisme de la contraction.

b - La myosine

α - Structure

La myosine est une protéine hexamérique en forme de "club de golf" (Fig. 6a). Elle est constituée de deux chaînes lourdes (MHC, Myosin Heavy Chains) de 200 kDa environ, auxquelles sont associées deux paires de chaînes légères (MLC, Myosin Light Chains), d'un poids moléculaire de 18 à 22 kDa (Warrick & Spudich, 1987). Deux chaînes lourdes sont associés par entrelacement de leurs extrémités carboxy-terminales (encore appelées "queues" de myosine), les deux têtes de myosine étant projetées vers l'extérieur du filament. 300 molécules de myosine associées de manière antiparallèle sont nécessaires pour former un

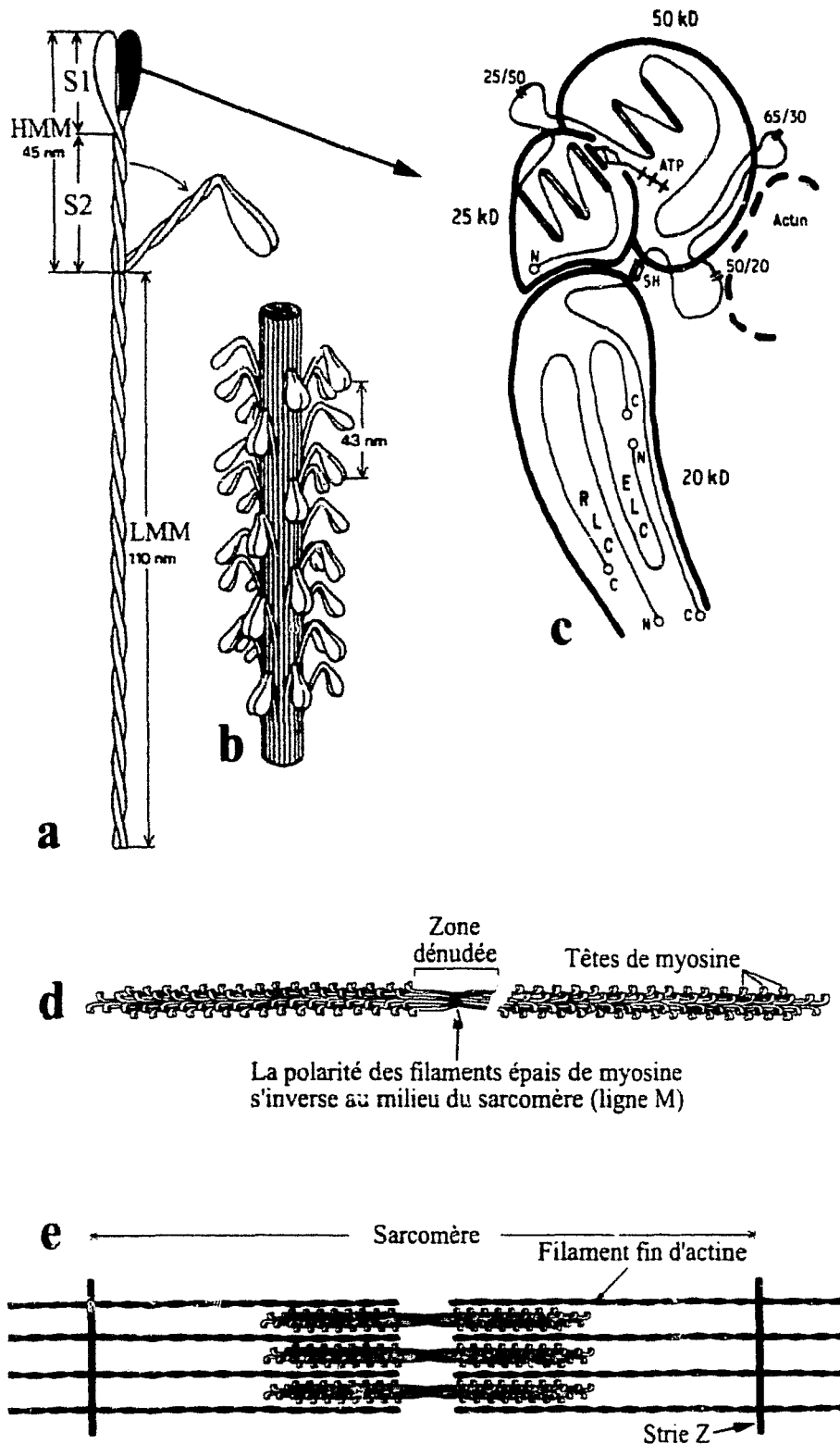


Fig. 6 : Détail et organisation des têtes de myosine au sein du sarcomère.

a: structure de la myosine. Un clivage protéolytique à la trypsine sépare HMM (Heavy Mero-Myosin) et LMM (Light Mero-Myosin). Le fragment HMM peut être séparé en deux parties S1 (tête globulaire) et S2 (fragment élastique reliant S1 au fragment LMM) par clivage à la papaïne. **b:** arrangement des molécules de myosine dans le filament épais. Les têtes S1 font saillie du filament cylindrique. **c:** détail de la tête S1 et de ses trois sous unités de 25, 50 et 20 kDa. (D'après Vibert & Cohen, 1988). **d:** arrangement antiparallèle des molécules de myosine dans le filament épais. Celui-ci est symétrique par rapport à la ligne M. **e:** disposition des filaments épais vis à vis des filaments fins dans le sarcomère.

filament épais d'environ 15 nm de diamètre et de 1.5 μ m de longueur (Huxley, 1963). Dans cette configuration, les têtes de myosine émergent du filament cylindrique (Fig. 6b, d).

Les chaînes lourdes de myosine (MHC) - Un clivage enzymatique par la trypsine (Lowey et coll., 1969) sépare la myosine en une queue fibrillaire (LMM, Light MeroMyosin) et une partie globulaire (HMM, Heavy MeroMyosin). Un clivage à la papaïne de cette partie globulaire donne deux fragments : une tête S1, globulaire, et une portion fibrillaire S2 comprise entre S1 et la queue LMM (Fig. 6a). la tête S1 correspond en réalité à une association de 3 sous unités de 25, 50 et 20 kDa (Fig. 6c). Le domaine moteur et représenté par les sous unités de 50 et 20 kDa : il peut interagir avec l'actine du filament fin. De plus, un site de fixation pour l'ATP se situe dans la gorge délimitée par l'association de ces 2 sous unités. La sous unité de 20 kDa représente le domaine de transmission et fournit un ancrage aux chaînes légères de myosine (Kato & Lowey, 1989).

Les chaînes légères de myosine (MLC) - Deux types de MLC sont décrites : les premières sont appelées chaînes "essentiels" (encore appelées Alkali Light Chains, car dissociables en milieu basique) et correspondent aux MLC1 et MLC3. Les secondes, appelées chaînes "régulatrices" (ou encore DTNB LC, car dissociables par l'acide DiThioNitroBenzoïque (Lowey et coll., 1969)), correspondent aux MLC2. La phosphorylation leur confère un rôle modulateur dans l'activation des fibres striées squelettiques (Sweeney et coll., 1993, pour revue). Sur les muscle lisses, la phosphorylation de ces MLC2 par la protéine kinase A (PKA) est directement responsable de la régulation de l'activation (Persechini et coll., 1985 ; Trybus, 1994).

β - Polymorphisme

MHC et MLC comportent plusieurs isoformes codées par une famille multigénique. On ne dénombre pas moins de 10 isoformes de myosine (cf. Tableau 1). Dans les fibres squelettiques

Type de muscle	Nomenclature	Désignation et distribution
cardiaque (lent)	MHC I α	MHC lente, trouvée dans le tissu cardiaque, les muscles extraoculaires, le diaphragme, le masseter, les fibres intrafusales et les muscles subissant des transitions Lent \rightarrow Rapide (Stevens et coll., 2000) et Rapide \rightarrow Lent (Peuker et coll., 1999)
lent (cardiaque)	MHC I (MHC I β)	MHC lente, trouvée dans les fibres de type I et II. Elle est identique à la MHC β cardiaque (Lompré et coll., 1984)
rapide	MHC IIb	MHC rapides, trouvées dans les fibres de type I et II
	MHC IIa	
	MHC IIc (IIx)	
rapide	MHC _{com}	MHC rapide, trouvée dans les fibres super-rapides des muscles extra-oculaires et des muscles du larynx
rapide	MHC II _m	MHC rapide, trouvée dans les fibres super-rapides des muscles de la mastication (chez les carnivores et primates)
lent	MHC I _{ton}	MHC lente, trouvée dans les fibres intrafusales et les fibres lentes des muscles extra-oculaires et du tympan
embryonnaire	MHC _{emb}	MHC embryonnaire, trouvée dans les myotubes, les fibres musculaires extra-oculaires, les fibres intrafusales, et les fibres en régénération
néonatal	MHC _{neo}	MHC néonatale, trouvée dans les muscles néonataux, les muscles extra-oculaires, le masseter, les fibres intrafusales et les fibres en régénération.

Tableau 1 : Isoformes de chaînes lourdes de la myosine (MHC), identifiées dans les muscles squelettiques lents et rapides de mammifères (d'après Pette & Staron, 1997).

de Mammifères adultes, quatre isoformes sont habituellement rencontrées (Pette & Staron, 1990 ; Schiaffino & Reggiani, 1996) : la MHC lente de type I, présente dans les fibres lentes, et les MHC rapides de types IIa et II_{d/x} et IIb, qui sont caractéristiques des fibres rapides. Les fibres sont ainsi identifiées sur la base de la composition en MHC : les fibres n'exprimant que des isoformes lentes ou rapides sont des fibres pures lentes ou pures rapides, respectivement. Les fibres coexprimant les isoformes lentes et rapides sont des fibres hybrides, et les isoformes exprimées suivent en général un pattern transitionnel (loi du "next neighbour rule", Pette & Staron, 1997) : par exemple, MHC I et IIb ne sont jamais coexprimées seules, sans les isoformes intermédiaires IIa et II_{d/x}.

Les MLC présentent elles aussi un polymorphisme : les MLC1 et 2 possèdent toutes deux des isoformes lentes et rapides. Seule la MLC3 existe uniquement sous forme rapide : elle est en fait codée par le gène de la MLC1f, dont les transcrits subissent un épissage différent (Barton & Buckingham, 1985). La combinaison des différentes isoformes de MHC et de MLC donne des isomyosines. Dans le spectre des possibilités, certaines associations ne sont cependant jamais décrites.

γ - Fonction – Les états "A" et "R" de la myosine

Les observations aux rayons X menées par Reedy et coll. (1965, 1968) sur les muscles spécifiques du vol d'insecte ont montré l'existence de deux types de ponts actine myosine : une configuration à 90° dans un muscle relâché (configuration dite "A"), et une configuration à 45° dans un muscle contracté en absence d'ATP (configuration dite "R" pour "Rigor like"). Selon le modèle original des filaments coulissants (Huxley, 1969 ; Huxley & Simmons, 1971), la rotation rapide des têtes de myosine induirait un changement de l'angle des ponts, qui passerait de 90° (angle préférentiel en état de repos) à 45° (angle préférentiel en contraction), faisant ainsi coulisser le filament fin entre les filaments épais (Fig. 7).

L'affinité entre l'actine et la myosine dépend du nucléotide fixé sur la tête S1 : les complexes [S1 - ATP] ou [S1 - ADP - Pi] présentent une faible affinité pour l'actine, alors que les complexes [S1 - ADP] ou S1 présentent une forte affinité.

La configuration "A", associée à l'angle 90° entre actine et myosine, est un état chargé en énergie potentielle, et peut s'isomériser en configuration "R". Le transfert permet le basculement de la tête, par transformation de l'énergie chimique (ATP) en énergie mécanique.

5 - PRINCIPE GENERAL DU MECANISME DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE – LE CYCLE ATPasique DE LA MYOSINE

La théorie des filaments glissants (Huxley, 1957) est basée sur le coulisement des filaments fins et épais par interactions cycliques entre actine et myosine. L'énergie nécessaire au basculement de la tête S1 de la myosine (90° ↔ 45°) est fournie par l'activité ATPasique de la myosine qui permet de libérer l'énergie contenue dans la liaison du phosphate inorganique en position gamma.

La figure 7 représente une schématisation des étapes du cycle attachement-détachement de la myosine sur l'actine :

- 1 – La liaison de l'ATP sur la tête de myosine induit une dissociation du complexe actine - myosine (AM ↔ A+M.ATP)
- 2 – L'ATP subit un clivage rapide et réversible (M.ATP ↔ M.ADP.Pi), qui permet à la tête de myosine de revenir à un angle de 90°.
- 3 – Le complexe M.ADP.Pi s'associe rapidement à l'actine (état "A" des têtes de myosine, liaison de faible affinité : A+M.ADP.Pi ↔ A-M.ADP.Pi)
- 4 – Le complexe A-M.ADP.Pi subit une isomérisation, et la liaison actine-myosine devient très forte (A-M.ADP.Pi ↔ AM.ADP.Pi). Le phosphate inorganique Pi est

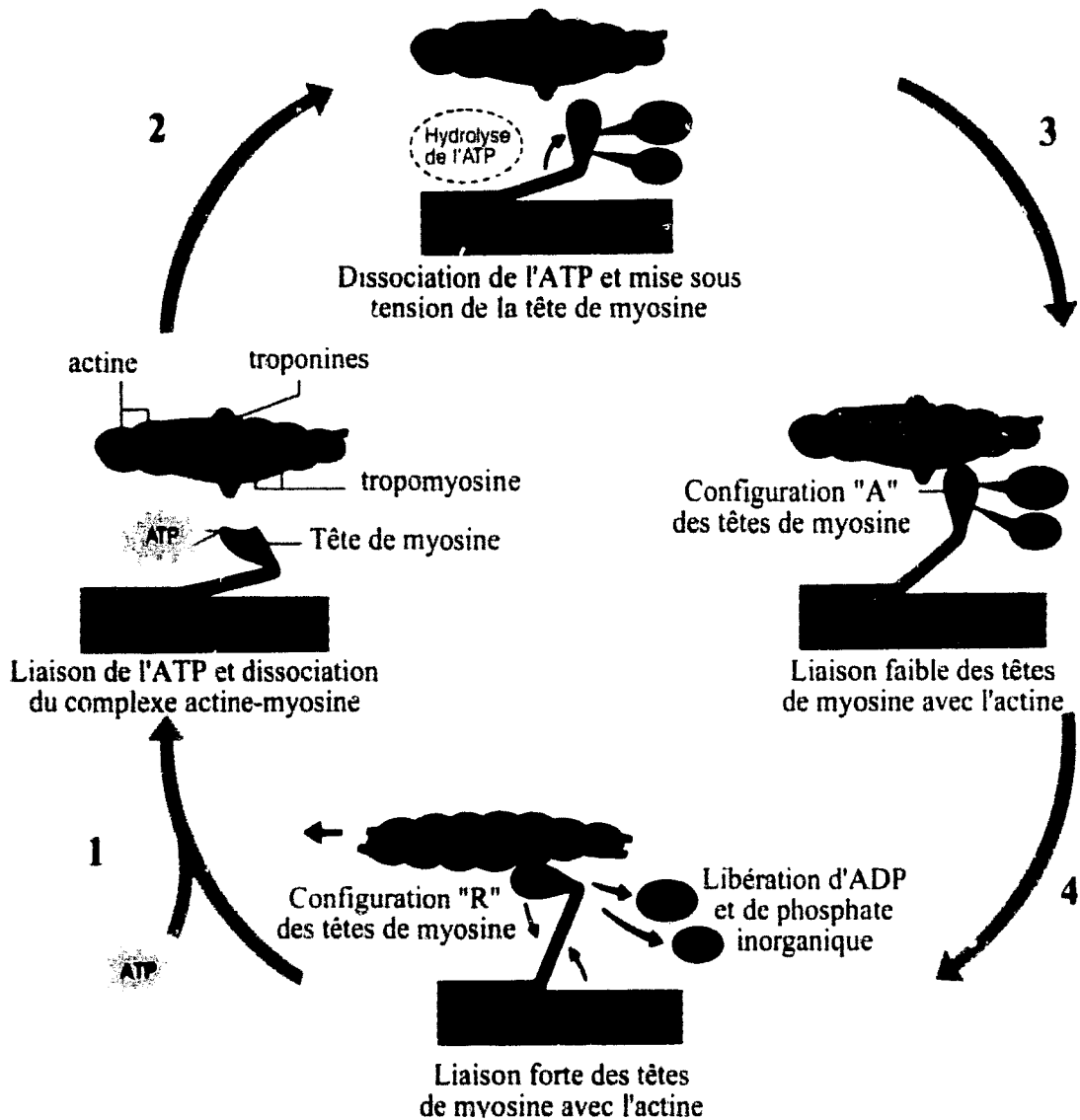


Fig. 7 : Description séquentielle des interactions actine – myosine conduisant à la production de force. Les grandes étapes (de 1 à 4) sont explicitées dans le texte. Modifié d'après Marieb, 1993.

libéré ($A\text{-M.ADP.Pi} \leftrightarrow AM.ADP$) et le pont passe à la configuration "R" (à 90°), générant ainsi la force par coulissement des myofilaments.

Comme suggéré par certains auteurs (Pate & Cooke, 1989 ; Rayment & Holden, 1994 ; Holmes, 1996), cette dernière étape regroupe l'isomérisation "A" → "R", le relargage du Pi et la génération de force. Des expériences sur fibres isolées (Kawai et coll., 1987 ; Millar & Homsher, 1992 ; Geeves & Conibear, 1995) ont permis de suggérer des étapes intermédiaires :

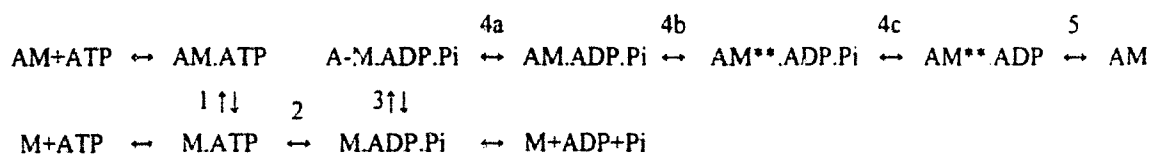
4a – isomérisation $A\text{-M.ADP.Pi} \leftrightarrow AM.ADP.Pi$. C'est cette étape qui serait régulée par le taux de calcium environnant (Ma et coll., 1994). Cette régulation sera abordée dans le chapitre II.

4b – production de force

4c – libération du Pi, qui stabiliserait la conformation génératrice de force (Dantzig et coll., 1992).

L'ADP est ensuite libéré après une dernière isomérisation du complexe $AM.ADP$ (étape 5).

Ces différentes étapes sont récapitulées ci-dessous par le schéma de Gordon et coll. (2000).



II. REGULATION CALCIQUE DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

L'interaction actine-myosine est régulée via la concentration calcique cytoplasmique. La troponine C joue un rôle clé dans cette régulation, étant à l'origine de l'initiation d'une cascade de réarrangements structuraux au sein des protéines régulatrices décorant le filament fin. La structure et la fonction de ces dernières est ici abordée.

I - STRUCTURE ET POLYMORPHISME DES PROTEINES REGULATRICES

a - La tropomyosine

α - Structure

La tropomyosine se présente sous la forme d'un dimère. Les deux sous-unités, de 35 kDa environ chacune (Woods, 1967), sont assemblées en une torsade qui se positionne dans le sillon déterminé par la structure hélicoïdale du filament d'actine (Fig. 8a). Plusieurs dimères s'assemblent par chevauchement (sur 8 ou 9 acides aminés) des extrémités amino et carboxy-terminales (Fig. 8b), pour assurer la continuité du long filament de tropomyosine (Flicker et coll., 1982). Chaque dimère, composé d'une séquence répétitive de 7 acides aminés, est en contact avec 7 monomères d'actine (Cummins & Perry, 1973), et stabilise le filament d'actine (Lees-Miller & Helfman, 1991).

β - Polymorphisme

Deux types de sous-unités sont décrites dans le muscle squelettique : α et β. Le dimère de tropomyosine peut donc se présenter sous la forme d'un homodimère (αα ou ββ), ou d'un hétérodimère (αβ, Stewart, 1975). Les séquences peptidiques des deux sous unités squelettiques présentent une homologie de l'ordre de 86 % (Muthuchamy et coll., 1997). Les isoformes α et β sont exprimées à différents niveaux selon l'espèce animale (Cummins &

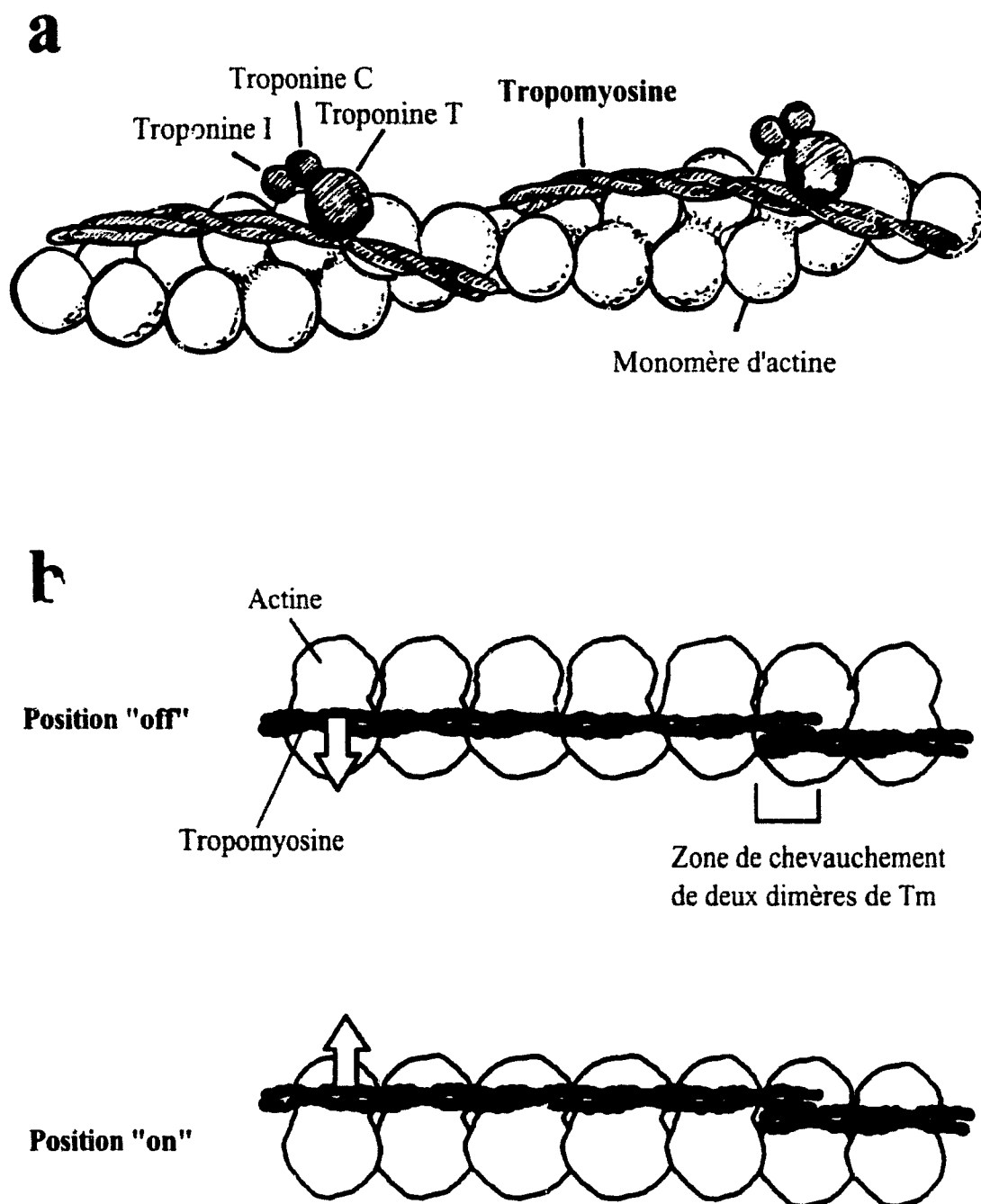


Fig. 8 : Localisation de la tropomyosine au sein du filament fin.

a : représentation schématique du filament fin. La tropomyosine s'insère dans le sillon formé par la structure hélicoïdale du filament d'actine (D'après Jones & Round, 1990).

b : représentation schématique du complexe actine - tropomyosine. Les dimères de tropomyosine se chevauchent par recouvrement de leurs extrémités amino et carboxy-terminales. Les flèches indiquent le sens du déplacement de la tropomyosine sur l'actine dans ses deux positions "off" et "on".

Perry, 1973), et selon le type de muscle (Roy et coll., 1979). L'isoforme α est exprimée préférentiellement dans les fibres rapides à métabolisme glycolytique (Muthuchamy et coll., 1997), tandis que l'isoforme β est exprimée surtout dans les fibres lentes.

γ - Fonction – Les états "off" et "on" de la tropomyosine

Plusieurs études ont démontré une relation entre l'isoforme de tropomyosine et la vitesse de contraction (Bronson & Schachat, 1982 ; Schachat et coll., 1990). Les analyses protéiques permettent d'établir une corrélation entre les proportions des hétérodimères et des homodimères $\alpha\alpha$ avec la vitesse (Schachat et coll., 1987). La Tm joue en effet un rôle important dans la régulation de la contraction. Il a été démontré que la Tm pouvait adopter différentes positions sur l'actine, dont les positions "off" et "on" (Lehman et coll., 1994). Ces positions déterminent l'état d'activation de filament fin. *En position "off"*, la Tm se trouve au bord du sillon d'actine, dans une position de blocage stérique qui n'empêche pas l'interaction faible de la myosine avec l'actine (état "A" des têtes de myosine), mais empêche l'isomérisation "A" → "R" (Geeves & Halsall, 1987) et donc l'interaction forte actine - myosine. *En position "on"*, ou absence d'ATP (conditions de Rigor), la Tm est éloignée de 30° environ de sa position "off" vers l'intérieur du sillon d'actine (Vibert et coll., 1997 ; Xu et coll., 1999). Dans cette conformation "on" (cf. Fig. 8b, 13b), l'inhibition stérique est levée, et l'interaction forte entre l'actine et la myosine est possible. La position de la Tm sur le filament d'actine détermine donc un système à deux états, "on" et "off". Une relation existe par ailleurs entre la position "on" de la Tm et les complexes "R" fortement liés : l'isomérisation "A" → "R" et le passage "off" → "on" sont couplés. Tant que le filament n'est pas dans l'état "on", les têtes S1 ne peuvent pas s'isomériser, et vice-versa : la liaison forte S1 – actine cause une transition coopérative des unités [Tm – actine] adjacentes dans l'état

"on" (Geeves & Halsall, 1987). Le contrôle de cette transition régule la transition "A" → "R" menant à la production de force.

Lehrer & Morris (1982) ont montré que la relation activité ATPasique du complexe [actine - S1 - Tm] en fonction du nombre de têtes S1 est de type sigmoïde (Fig. 9). Ceci montre que la Tm est nécessaire et suffisante pour provoquer un phénomène de coopérativité basique au sein du filament fin, conséquence de l'interaction du dimère de Tm avec sept monomères d'actine et du chevauchement des dimères de Tm pouvant propager le signal (Lehrer, 1994).

La position de la Tm est sous le contrôle d'un complexe régulateur de la contraction, le complexe des troponines (Tn). Régulièrement espacé le long du filament fin (tous les sept monomères d'actine, cf. Fig. 8a), ce complexe est formé de trois sous unités : la troponine I (I pour inhibitrice de la contraction), la troponine C (C pour Ca^{2+} que cette protéine peut fixer), et troponine T (T pour Tropomyosine, à laquelle la TnT rattache le complexe), d'après la nomenclature établie par Greaser et coll. (1972). Ce complexe est au centre de la régulation par le Ca^{2+} (Weber & Murray, 1973).

b - La troponine I

En absence de Ca^{2+} , cette sous unité inhibitrice est liée à l'actine, et maintient de ce fait le complexe [Tn - Tm] dans la position "off".

α - Structure

La TnI est une protéine globulaire basique de 21 kDa (180 acides aminés environ, cf. Perry, 1999 pour revue). La TnI possède des interactions permanentes (i.e. indépendantes du Ca^{2+}), avec la TnC (Sheng et coll., 1992), et la TnT (Chong & Hodges, 1982). Ces interactions sont responsables de l'intégrité structurale du complexe des troponines. La TnI possède aussi des

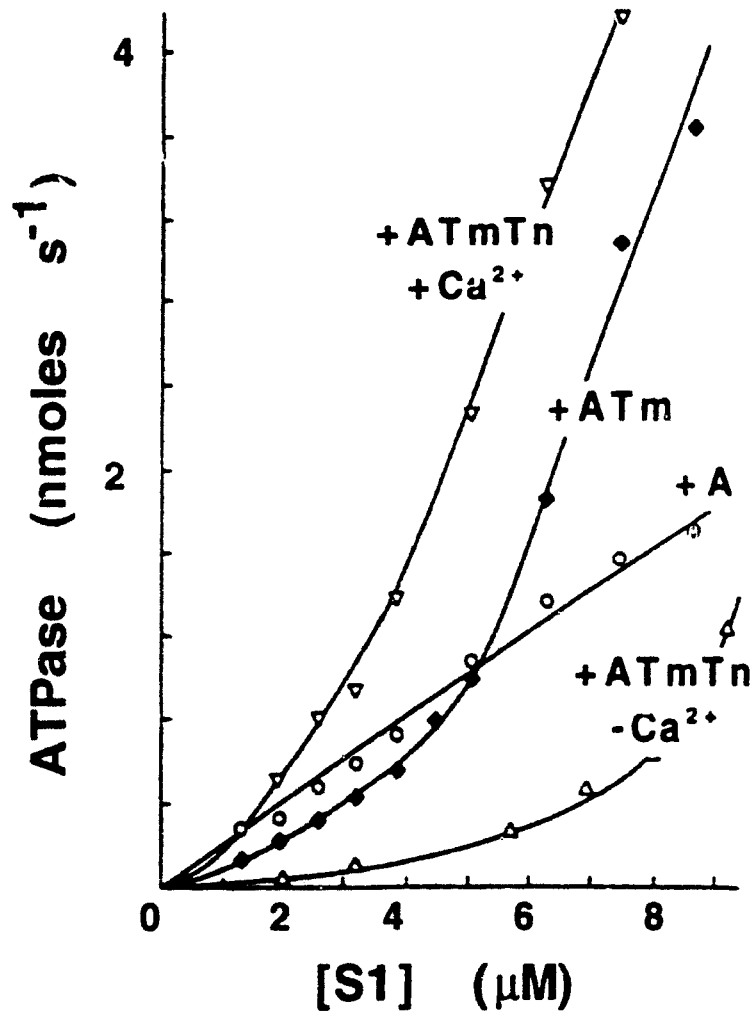


Fig. 9 : Relation activité ATPasique en fonction de la concentration en têtes S1, en présence d'actine (+A); d'actine et de tropomyosine (+ATm); d'actine, tropomyosine et troponines (+ATmTn), en présence de calcium (+Ca²⁺) et en absence de calcium (-Ca²⁺). En absence de Tm, la relation est linéaire (pas de phénomène de coopérativité). La relation indique une coopérativité en présence de Tm. En présence de Tn, l'activité ATPasique est inhibée en absence de Ca²⁺, et potentialisée en présence de Ca²⁺ (D'après Lehrer & Morris, 1982).

interactions dépendantes du Ca^{2+} , à la base de la régulation de la contraction, avec la TnC, l'actine et la Tm (Fig. 10, voir ci-dessous : γ -Fonction).

β - Polymorphisme

Les muscles striés présentent trois isoformes de la TnI : lente, rapide et cardiaque (Hartner & Pette, 1990). Ces isoformes présentent une forte homologie dans le domaine carboxy-terminal, tandis que le domaine amino-terminal est plus variable. Toutes les isoformes des Vertébrés présentent une séquence conservée à 85 %, appelée segment Ip (cf. paragraphe *Fonction de la TnI*). L'isoforme cardiaque présente en plus une extension amino-terminale phosphorylable après stimulation β -adrénergique par la protéine kinase A.

γ - Fonction

La TnI peut se lier à l'actine et inhiber l'activité ATPasique d'un système acto-myosine (Greaser & Gergely, 1973). Son activité inhibitrice est par ailleurs potentialisée par la Tm (Perry et coll., 1972). Le fragment correspondant aux résidus 96-115 de la TnI, contient la séquence minimale nécessaire à l'inhibition de la contraction (Talbot & Hodges, 1981) : le fragment 104 – 115, appelé Ip (Inhibitory peptide). Ce fragment de 12 acides aminés se lie à l'actine de façon dépendante du Ca^{2+} , et possède une activité inhibitrice dont l'efficacité est comprise entre 45 et 75 % de celle de la protéine entière (Syska et coll., 1976 ; Talbot & Hodges, 1981). Takeda et coll. (1997) ont montré, en utilisant la digestion limitée, que les résidus 135-181 (ou 141-181) étaient aussi impliqués dans l'interaction avec le complexe [Tm – actine]. Tripet et coll. (1997) ont démontré que les acides aminés 96 à 148 formaient le plus petit fragment possédant une activité inhibitrice similaire à la TnI intacte. En utilisant des fragments peptidiques de longueurs variables, correspondant à des régions différentes de la TnI (comprises entre 96 et 148), ces auteurs sont parvenus à montrer que la région 140-148 de la TnI correspondait à un second site de liaison au complexe [actine – Tm]. En absence de

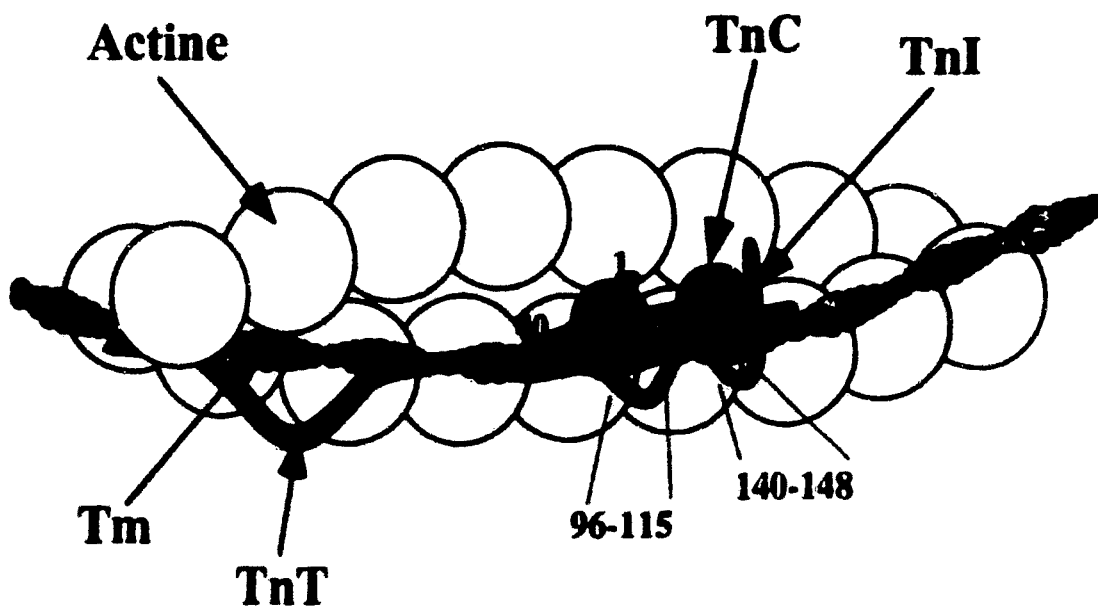


Fig. 10 : Localisation de la troponine I (en vert) au sein du filament fin, en absence de Ca^{2+} : les segments 96 – 115 (contenant la région Ip 104 - 115) et 140 – 148 interagissent avec l'actine. La TnI entre aussi en contact avec la TnC (en rouge) et la TnT (en bleu). D'après Tripet et coll., 1997.

Ca^{2+} , la TnI exerce donc son activité inhibitrice par accrochage au filament d'actine via les régions 104-115 et 140-148 (Fig. 10), et maintient de ce fait le complexe [Tn - Tm] en position de blocage stérique, empêchant le passage du filament de Tm de l'état "off" à l'état "on".

Il existe aussi des évidences en faveur d'une inhibition de l'activité ATPasique du complexe [actine - tête S1 de la myosine] par la TnI (Syska et coll., 1976, Levine et coll., 1988). En absence de Ca^{2+} , la TnI conférerait un rôle additionnel au complexe des Tn : l'inhibition de la liaison faible actine - myosine (état "A" des têtes de myosine), en présence d'une force ionique normale. Ainsi, à force ionique normale et en absence de Ca^{2+} , un sous état de l'état "off" a été défini et appelé état "blocked" (McKillop & Geeves, 1993). En limitant le nombre de têtes de myosine se liant faiblement (conformation "A") à l'actine, cet état bloqué limite en fait le nombre de têtes S1 qui peuvent s'isomériser dans l'état "R".

La région amino-terminale ne serait pas nécessaire pour l'inhibition, mais possède des fonctions importantes (Tableau 2). Le peptide Rp (1-40), qui peut se lier à la TnC en absence de Ca^{2+} , est responsable de l'accrochage de la TnC dans la structure ternaire (Sheng et coll., 1992 ; Farah et coll., 1994 ; Potter et coll., 1995).

En solution, l'activité inhibitrice de la TnI peut être neutralisée par la formation d'un complexe équimolaire avec la TnC en présence de Ca^{2+} (Cachia et coll., 1986 ; Chong et coll., 1983 ; Van Eyk & Hodges, 1988). La formation d'un complexe entre la TnI et la TnC modifie les interactions entre la TnI et le filament fin, de sorte que la TnI rompt sa liaison et se dégage de l'actine (Tao et coll., 1990). Les résidus 104 à 131 seraient impliqués dans les liaisons avec la TnC (cf. Tableau 2) : le premier site correspond à la région Ip (résidus 104-115), et le second site de liaison à la TnC, identifié par Tripet et coll. (1997) correspond aux résidus 116-131.

Région (acides aminés)	Nom	Fonction
1-40	Rp	Rôle structural : fixation de la TnC dans le complexe ternaire en absence de Ca^{2+}
40-96		Interaction avec la TnT. Important pour le renforcement de l'activité ATPasique observée uniquement en présence de la TnT
104-115	Ip	Inhibitory peptide. Responsable en grande partie de l'activité inhibitrice de la TnI. Se fixe sur l'actine en absence de Ca^{2+} et sur la TnC en présence de Ca^{2+} .
116-131		Second site de liaison à la TnC. Se fixe sur la partie aminoterminal de la TnC en présence de Ca^{2+} . Nécessaire pour permettre à la TnC de neutraliser rapidement et complètement l'inhibition. Augmente significativement l'affinité de la région Ip pour la TnC.
140-148		Second site de liaison à l'actine. Ce peptide seul possède une faible activité inhibitrice. Nécessaire en complément de la région Ip pour une inhibition totale.

Tableau 2 : Caractéristiques fonctionnelles des différentes régions de la troponine I.

c - La troponine C

La TnC joue un rôle central dans la régulation calcique de la contraction. Cette protéine du complexe des Tn est capable de détecter les variations du Ca^{2+} cytosolique et de lever l'inhibition causée par la TnI.

α - Structure

La TnC est une protéine acide de 18 kDa (Parmacek & Leiden, 1991, pour revue) appartenant à la famille des CaBP (Ca^{2+} Binding Proteins, Kretsinger, 1980). La TnC possède une structure en forme d'haltère, avec deux têtes globulaires carboxy et amino-terminales, reliées par une hélice α centrale (Herzberg et coll., 1987 ; Satyshur et coll., 1988). Chaque domaine globulaire possède deux sites de fixation calciques de type EF-Hand, numérotés de I à IV dans l'ordre de la structure primaire (Fig. 11a). Chaque motif EF-Hand est constitué par deux hélices α orientées à 90° reliées par un boucle de 12 acides aminés. La structure ressemble à une main droite, le pouce et l'index représentant les deux hélices α et le majeur replié schématisant la boucle (Fig. 12a). Ce motif a d'abord été décrit dans la structure cristalline de la parvalbumine (Kretsinger & Nockolds, 1973), puis trouvé dans 30 groupes de protéines parmi lesquelles figurent, outre la TnC, la calmoduline et les MLC. Six acides aminés sont responsables de la coordination d'un ion Ca^{2+} : leurs positions sont dénommées X, Y, Z, -X, -Y, -Z (Fig. 12b). Cinq d'entre eux font partie de la boucle centrale et ont chacun une chaîne oxygénée libre. Le 6^{ème} résidu (glutamate E41 dans le site I de la TnC squelettique rapide) se situe dans l'hélice α et peut fournir deux oxygènes. Ces sept oxygènes sont capables de coordonner le Ca^{2+} en formant une bipyramide pentagonale (Kretsinger, 1987 ; Strynadka & James, 1989. cf. Fig. 12b). 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,

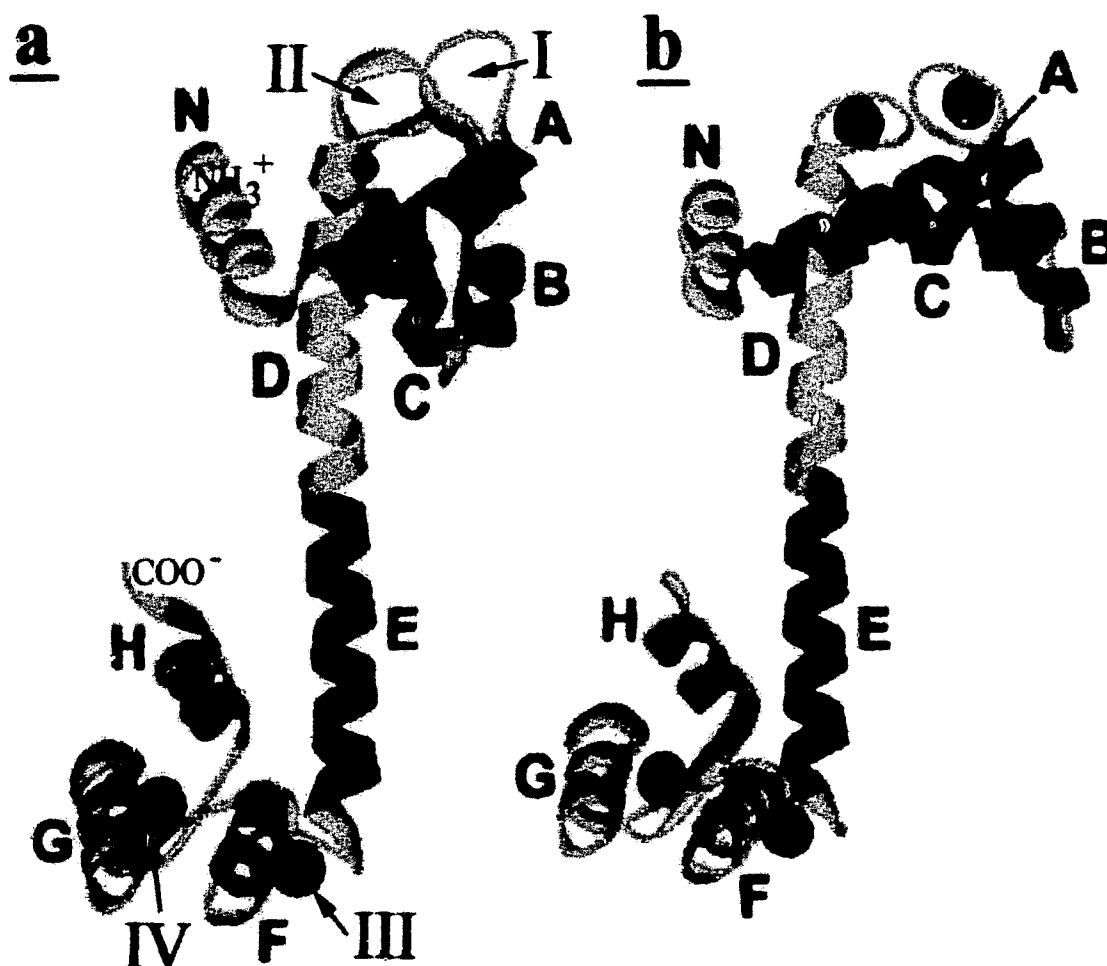


Fig. 11 : Représentation de la structure cristalline de la TnC. Les hélices α (A à H) sont représentées par des couleurs différentes. Les sites de fixation du Ca^{2+} (EF - Hand) sont numérotés de I à IV.

a : TnC squelettique de dindon, avec deux ions Ca^{2+} liés sur les sites III et IV. Le domaine amino-terminal est en conformation fermée.

b : TnC squelettique de lapin. Tous les sites calciques sont occupés. Une réorientation des hélices B et C s'est produite par rapport aux hélices N, A et D : le domaine amino-terminal est en conformation ouverte.

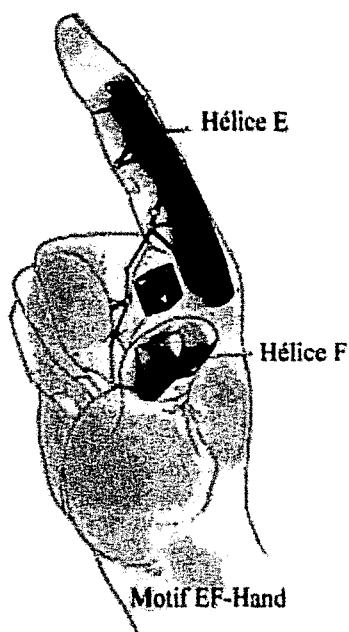
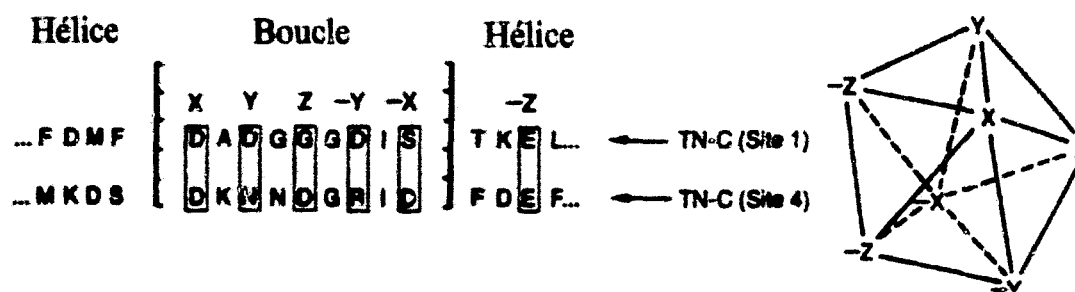
a**b**

Fig. 12 : Description des motifs EF – Hand.

a: Représentation schématique du motif EF – Hand. L'index et le pouce représentent respectivement les deux hélices E et F, et le majeur replié représente la boucle. L'ion Ca^{2+} est piégé au sein d'une structure polyédrique (bipyramide pentagonale).

b: Fragment de la séquence d'acides aminés impliquée dans la coordination du Ca^{2+} dans les sites I et IV de la TnC squelettique rapide (D'après DaSilva & Reinach, 1991).

les quatre motifs EF-Hand ne sont pas identiques. La tête globulaire carboxy-terminale possède deux sites (III et IV) de haute affinité (constante d'association K_{assoc} égale à $2 \cdot 10^{-7}$ M), mais de basse spécificité, qui sont de ce fait occupés par du Mg^{2+} dans le muscle relâché (Leavis et coll., 1978 ; Zot & Potter, 1987). La tête amino-terminale possède quant à elle deux sites (I et II) de basse affinité (K_{assoc} $3 \cdot 10^{-5}$ M) et de haute spécificité pour le Ca^{2+} (Potter & Gergely, 1975). Il a récemment été démontré (Li et coll., 1997) que la liaison du Ca^{2+} sur le site I est énergétiquement moins favorable que sur le site II : ce dernier possède par conséquent la plus grande affinité.

β -Polymorphisme

L'analyse des séquences d'acides aminés des TnC provenant des muscles squelettiques lents et rapides, ainsi que du myocarde a permis de révéler trois isoformes. L'isoforme rapide (TnCf, 160 acides aminés) est exprimée exclusivement dans les muscles squelettiques rapides de Mammifères (Dhoot et coll., 1979). Les isoformes lentes (TnCs) et cardiaques (TnCc) sont identiques (Wilkinson, 1980) et sont exprimées à l'état adulte dans les tissus cardiaques et squelettiques. L'importance de cette protéine est soulignée par le degré de conservation durant 250 millions d'années d'évolution : les TnC murines sont identiques à plus de 95 % à leurs homologues chez le poulet (Parmacek et coll., 1990 ; Gahlman & Kedes, 1990). Les isoformes lentes et rapides sont homologues à plus de 70 %, la plupart des différences se situant dans les quarante premiers acides aminés. Dans l'isoforme lente, une insertion en position 28 et une double substitution d'acides aminés (Leu 29 et Ala 31 au lieu d'Asp 30 et Asp 32, respectivement) rendent le site I non fonctionnel (Van Eerd & Takahashi, 1975 ; Burtnick & Kay, 1977 ; Leavis & Kraft, 1978).

γ - Fonction – Les états $\pm Ca^{2+}$

La TnC agit comme un "sensor" calcique, détectant les variations cytosoliques de Ca^{2+} . En dehors de toute contraction (muscle au repos), la concentration calcique au sein d'une fibre est environ égale à 10^{-5} M. Consécutivement à un influx nerveux, cette concentration peut passer à 10^{-7} M par relargage d'ions hors des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique.

Fixation du Ca^{2+} sur les sites calciques – En présence de concentrations ioniques physiologiques, les sites III et IV de la TnC sont occupés par le Mg^{2+} (cf. paragraphe *Structure de la TnC*). Des expériences de cinétique (Johnson et coll., 1979 ; Iio & Kondo, 1980 ; Robertson et coll., 1981) ont montré que le déplacement du Mg^{2+} de ces sites par le Ca^{2+} était un phénomène trop long pour rendre compte du déclenchement rapide de la contraction (environ 15 ms). Ces deux sites présentent néanmoins une importance structurale : ils sont responsables de la cohésion du domaine carboxy-terminal de la TnC avec les autres sous-unités TnI et TnT (Potter & Gergely, 1975 ; Zot & Potter, 1982). Szczesna et coll. (1996) ont montré que le site III est déterminant dans le maintien de la stabilité structurale de la TnC au sein du filament fin ; le site IV n'apparaît pas essentiel mais contribue toutefois à cette stabilité (François et coll., 1995 ; Szczesna et coll., 1996).

Les sites I et II correspondent aux sites régulateurs de la contraction : la mutation de ces sites réduit ou abolit l'activité régulatrice de la protéine (Putkey et coll., 1989 ; Sweeney et coll., 1990 ; Sheng et coll., 1990 ; Szczesna et coll., 1996). L'étude du rôle fonctionnel de chacun des sites régulateurs a commencé en 1975 (avec Potter & Gergely) et a bénéficié depuis des expériences de mutagenèse dirigée sur les TnC. Sheng et coll. (1990) ont montré que les deux sites régulateurs I et II étaient nécessaires pour l'activité complète de l'isoforme rapide de la TnC. Dans le cas de l'isoforme lente ne possédant pas de site I fonctionnel, Putkey et coll. (1989) ont démontré que la mutation du site II abolissait la contraction, tandis que l'activation

du site I favorisait le processus de coopérativité, suggérant ainsi que le site I ne faisait que moduler le fonctionnement du site II.

Les sites régulateurs et les sites structuraux ne sont pas pour autant totalement indépendants : des interactions ont été suggérées par de nombreux auteurs (Wang et coll., 1983 ; Rosenfeld & Taylor, 1985 ; Grabarek et coll., 1986). L'inactivation des sites III et IV affectent la sensibilité calcique des sites régulateurs, tandis que la mutation des sites I et II diminue l'affinité de la TnC pour le filament fin (cf. Szczesna et coll., 1996).

Réarrangements conformationnels - Selon Herzberg et coll. (1986), la fixation du Ca^{2+} sur les sites régulateurs provoquerait un changement conformationnel de la structure de la TnC. Ces auteurs ont proposé un modèle dans lequel l'occupation des sites de basse affinité entraîne un mouvement des hélices N, A et D par rapport aux hélices B et C (Fig. 11) : il en résulte une ouverture du domaine amino-terminal (rendant la protéine symétrique) avec exposition d'un patch de résidus hydrophobes jusqu'alors enterrés au sein de la conformation fermée. La conformation du domaine amino-terminal saturé en Ca^{2+} présente une affinité pour la TnI. Les données obtenues en résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de confirmer ce modèle et de l'affiner. Il a été démontré que le changement conformationnel de forte amplitude, observé sur l'isoforme rapide de la TnC, était dû au site I (Li et coll., 1997), et plus particulièrement à l'acide aminé glutamate (en position -Z de l'EF-hand), qui agit comme un pivot et ouvre la protéine en établissant la coordination avec le Ca^{2+} à l'aide de deux chaînes oxygénées pour terminer la bipyramide pentagonale (Fig. 12b). Ces auteurs ont proposé un modèle séquentiel, dans lequel le Ca^{2+} se fixe d'abord sur le site II, site ayant la plus grande affinité. La fixation du Ca^{2+} sur le site II serait à l'origine de réarrangements structuraux mineurs, mais déterminants pour la fixation du Ca^{2+} sur le site I. Le Ca^{2+} est alors fixé par les 5 chaînes oxygénées des acides aminés en position X, Y, Z, -X et -Y du site I. Lorsque le 6^{ème}

acide aminé, le glutamate 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" (pas de Ca^{2+} lié) à l'état saturé (tous les sites sont occupés). Ce changement conformationnel entraîne l'exposition de résidus hydrophobes, et induit les interactions TnC – TnI dépendantes du Ca^{2+} . La découverte de l'importance du site I dans les réarrangements structuraux dépendants du Ca^{2+} a des implications fonctionnelles si l'on considère la TnC lente / cardiaque. Le site I de cette isoforme n'est pas fonctionnel, et le domaine amino-terminal de la protéine reste dans une configuration proche de la structure fermée suite à la fixation du Ca^{2+} sur le site II (Sia et coll., 1997). Le mode d'interaction entre la TnI lente et la TnC lente est par conséquent différent du mode d'interaction entre la TnI rapide et la TnC rapide. Li et coll. (1999) ont démontré que le peptide 147-163 de la TnI cardiaque, correspondant au peptide 115-131 de la TnI squelettique (second site de liaison à la TnC, identifié par Tripet et coll. en 1997), se lie au domaine régulateur de la TnC cardiaque et induit une ouverture du domaine amino-terminal de la TnC cardiaque, similaire à celui engendré par la fixation du Ca^{2+} sur la TnC squelettique rapide (Fig. 22).

Sites d'interactions entre la TnC et la TnI – TnC et TnI sont assemblées de façon antiparallèle (Farah et coll., 1994). Les interactions entre ces deux protéines se divisent en deux catégories, selon qu'elles soient dépendantes ou non du calcium. Une seule interaction indépendante du Ca^{2+} existerait entre la région amino-terminale de la TnI et la région carboxy-terminale de la TnC (Farah & Reinach, 1995). Le calcium induit une augmentation de l'affinité entre les deux protéines : les constantes d'affinité sont environ de 10^{-6} M et 10^{-9} M en absence et en présence de Ca^{2+} , respectivement (Wang & Cheung, 1985 ; Cheung et coll., 1987). En absence de Ca^{2+} , le fragment Rp (résidus 1-40) de la TnI serait lié dans la région carboxy-terminale de la TnC. En présence de Ca^{2+} , les fragments 104-115 (Ip) et 115-131 (second site de liaison à la TnC)

se fixent aux régions carboxy-terminale et amino-terminales, respectivement (Fig. 13a ; McKay et coll., 1998 ; Tripet et coll., 1997). Ngai & Hodges (1992) avaient émis l'hypothèse d'un site d'interaction identique des fragments Ip et Rp sur la TnC. Dans le modèle présenté ici, le fragment Ip de la TnI déplacerait compétitivement le fragment Rp (Olah et coll., 1994 ; Tripet et coll., 1997, Mercier et coll., 2000 ; cf. Fig. 13b). Le fragment 115-131 se lierait quant à lui sur le patch hydrophobe aminoterminal disponible après fixation du Ca^{2+} (McKay et coll., 1997).

Les sites d'interactions dépendants du Ca^{2+} sont à la base de la régulation calcique de la contraction musculaire : lorsque la TnC est en conformation fermée, i.e. en absence de Ca^{2+} , la TnI est liée à l'actine (Fig. 14a). En présence de Ca^{2+} , la liaison de la TnI à l'actine est rompue, et la TnI forme un complexe avec la TnC (Fig. 14b). Dans cette configuration, la TnI n'empêche plus la liaison faible des têtes S1 de myosine à l'actine. Cependant, dans un système reconstitué [Myosine – Actine – Tm – TnI – TnC], la TnC neutralise l'activité inhibitrice de la TnI en présence comme en absence de Ca^{2+} (Amphlett et coll., 1976). L'addition de la TnT dans le système [Myosine – Actine – Tm – TnI – TnC] induit un renforcement de l'inhibition de l'ATPase en absence de Ca^{2+} et une augmentation de l'activité ATPasique en présence de Ca^{2+} (Graser & Gergely, 1971 ; Malnic & Reinach, 1994). Pour que le système devienne sensible au Ca^{2+} , la sous unité de TnT est par conséquent nécessaire.

d - La troponine T

α - Structure

La TnT est une protéine asymétrique, de 31 à 36 kDa (250 à 300 acides aminés, cf. Perry, 1998, pour revue). Cette protéine de 18.5 nm (Flicker et coll., 1982) est constituée d'une tête globulaire carboxy-terminale (T1) et d'une partie allongée amino-terminale (T2), séparables à la chymotrypsine (Tanokura et coll., 1981, cf. Fig. 15). Le fragment T1, qui représente les

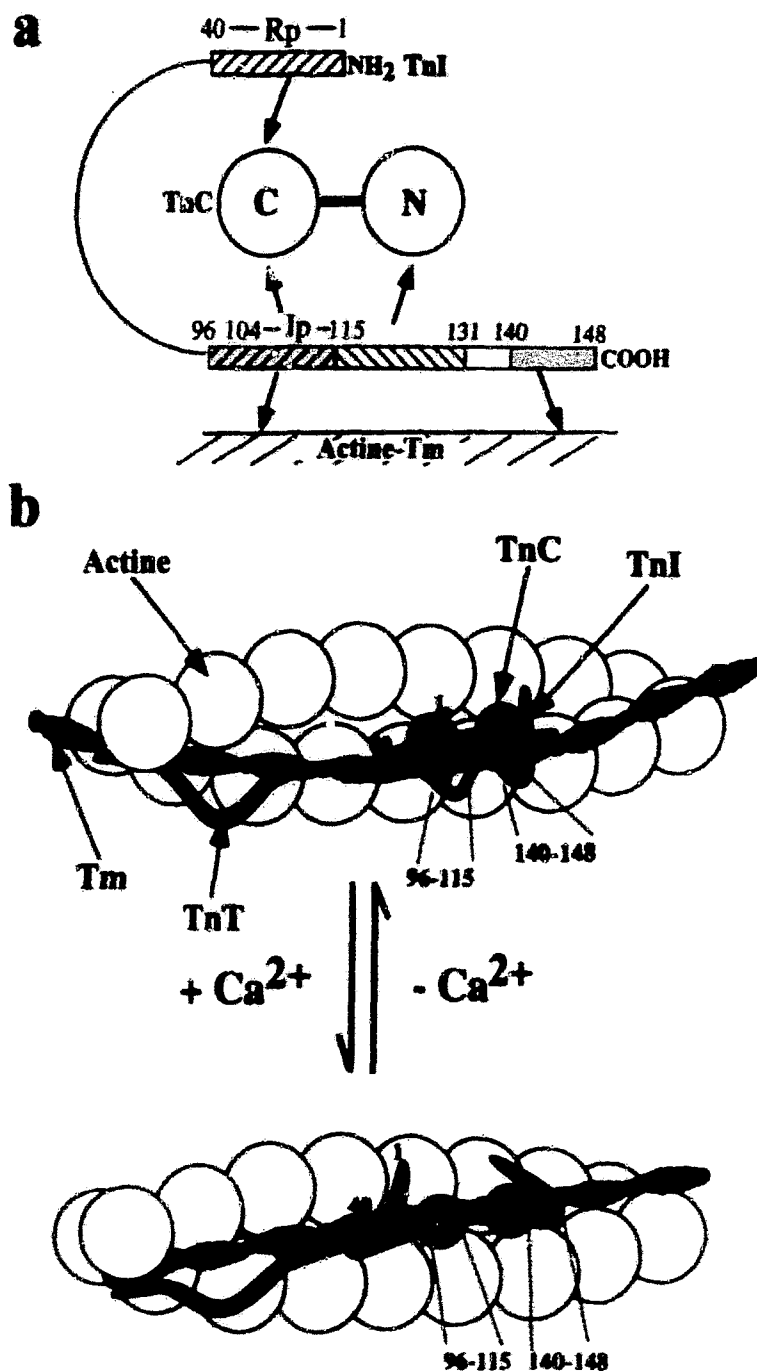


Fig. 13 : Résumé des interactions TnI - TnC.

a : Représentation des interactions entre TnI et TnC et entre TnI et actine. Les zones hachurées de la TnI indiquent les sites de liaison à la TnC. Les zones grisées de la TnI représentent les sites d'interaction avec le complexe actine - Tm (D'après Tripet et coll., 1997).

b : Schématisation des changements conformationnels survenant dans le complexe des troponines en présence de Ca²⁺. En absence de Ca²⁺, les deux fragments hachurés de la TnI (96 - 115 et 140 - 148) interagissent avec le filament d'actine - Tm et provoquent l'inhibition de l'activité ATPasique. En présence de Ca²⁺, le domaine aminoterminal de la TnC s'ouvre et expose des résidus hydrophobes. Les résidus 116 - 131 de la TnI interagissent avec cette région hydrophobe de la TnC, et entraîne le domaine Ip (104 - 115) qui rompt sa liaison avec l'actine pour interagir avec la TnC. La région Ip déplace le fragment Rp (1 - 40). D'après Tripet et coll., 1997.

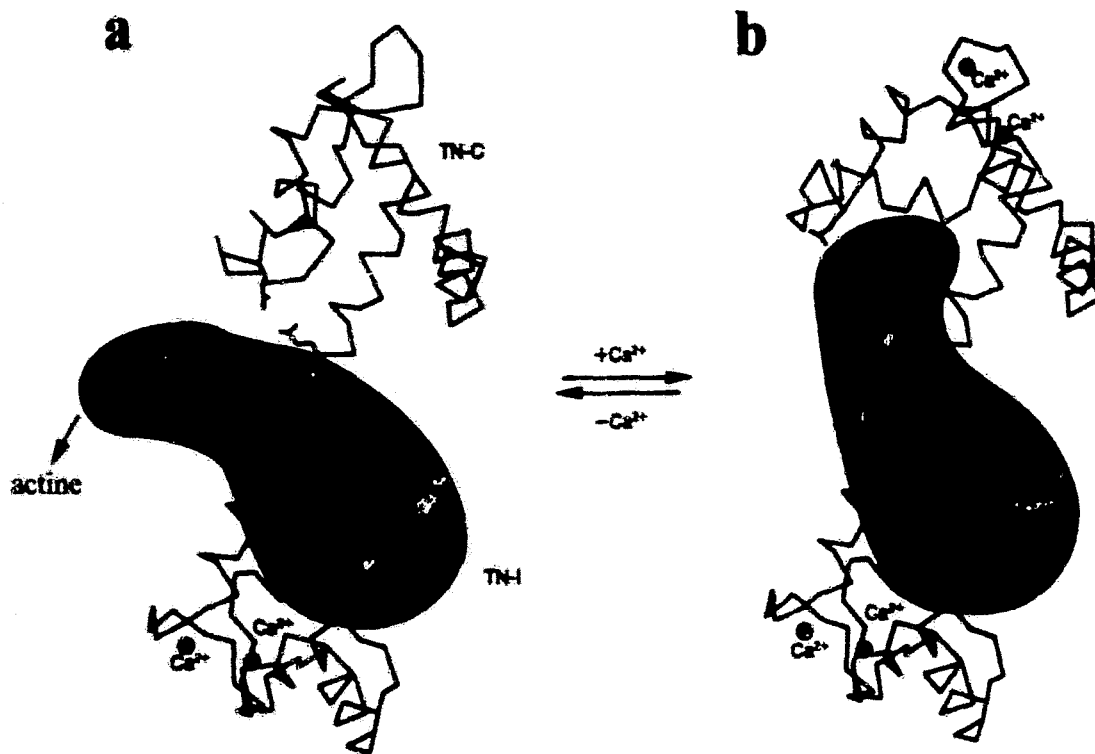


Fig. 14 : Schématisation des interactions entre la TnI et la TnC, en absence et en présence de Ca^{2+} . Les ions Ca^{2+} figurent en rouge dans la structure cristalline de la TnC. La représentation grossière de la TnI (en vert) montre le changement conformationnel de cette protéine en fonction du flux de calcium : en absence de Ca^{2+} (a), la TnI est liée à l'actine. En présence de Ca^{2+} (b), les sites basse affinité de la TnC sont occupés par le Ca^{2+} , et la TnI recouvre le domaine hydrophobique exposé suite à l'ouverture de la protéine (D'après DaSilva & Reinach, 1991).

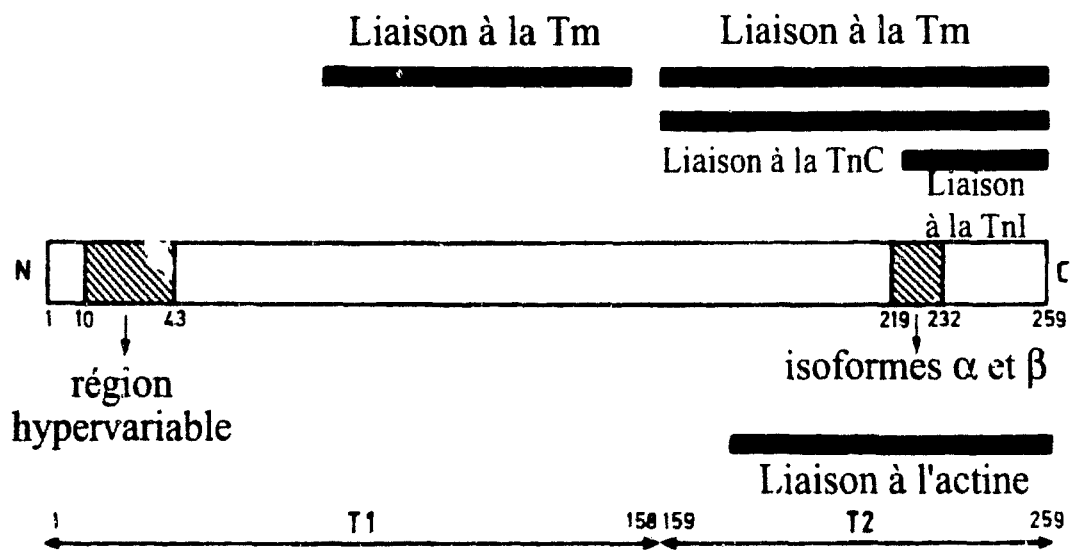


Fig. 15 : Représentation schématique de la TnT squelettique rapide de lapin (TnT20). Les régions hachurées représentent des régions variables. Les lignes épaisses définissent les régions d'interaction de la TnT avec les protéines indiquées. T1 et T2 sont les fragments séparables à la chymotrypsine (D'après Perry, 1998).

3/5^{ème} de la protéine (fragment 1-158 sur les 259 acides aminés de la TnT2f de lapin), possède des interactions indépendantes du Ca^{2+} avec la région carboxy-terminale de la tropomyosine, région qui chevauche la molécule de Tm adjacente (Mak & Smillie, 1981 ; Morris & Lehrer, 1984 ; White et coll., 1987). Le fragment T2 (2/5^{ème} de la protéine, fragment 159-259 de la TnT2f de lapin) peut interagir avec la Tm (Chong & Hodges, 1982 ; Ishii & Lehrer, 1991), l'actine (Hoeley & Smillie, 1988), la TnI (Pearlstone & Smillie, 1985 ; Tanokura & Ohtsuki, 1982) et la TnC (Iio, 1985 ; Potter et coll., 1985). Ce fragment est impliqué dans les changements conformationnels dépendants du Ca^{2+} (Ishii & Lehrer, 1991).

Interactions avec la Tm – La TnT forme un complexe stable avec la Tm, indépendamment de la présence du Ca^{2+} (Van Eerd & Kawasaki, 1973). Deux régions seraient impliquées. Le premier site, correspondant à la région 70 – 158 (Willasdsen et coll., 1992), se lierait à la partie carboxy-terminale de la Tm (Fig. 16). Le second site, situé dans le fragment T2, serait plus sensible à la force ionique environnante que le site I (Ishii & Lehrer, 1991), et se lierait dans les environs de la cystéine 190 de la Tm. L'interaction du second site avec la Tm serait dépendante de la concentration calcique (Pearlstone & Smillie, 1982 ; cf. Fig. 16).

Interactions avec la TnI – Les régions carboxy-terminales 159 – 227 et 159 – 242 de la TnT sont retenues par la TnI sur colonne d'affinité (Tanokura & Ohtsuki, 1982 ; Tanokura et coll., 1983). Cette région est composée de 7 acides aminés répétés, qui peuvent former une structure enroulée avec la TnI (Stefancsik et coll., 1998). Hitchcock-De Gregory (1982) a démontré que la TnT se complexait avec la région 40 – 98 de la TnI (Fig. 13b). Des études plus récentes utilisant des TnI délétées ont montré que la région 1 – 98 était nécessaire à l'incorporation de la TnT dans le complexe des troponines (Farah et coll., 1994 ; Jha et coll., 1996).

Interactions avec la TnC – TnT et TnC migrent en conditions non dissociantes en présence de Ca^{2+} (Jackson et coll., 1975). Il a par ailleurs été démontré que la TnC et la TnT

interagissaient de manière dépendante de la concentration calcique (Heeley et coll., 1987). De nombreux auteurs ont démontré que la partie carboxy-terminale de la TnT interagissait avec la TnC, dans sa partie amino-terminale (Grabarek et coll., 1981 ; Leavis & Gergely, 1984 ; cf. Fig. 16). Leszyk et coll. (1990) ont précisé les régions d'interactions, en montrant que la région de la TnT contenant les acides aminés 175 à 178 interagissait avec la région de la TnC contenant la cystéine 98, région qui interagit aussi avec la TnI. TnI et TnT auraient ainsi un site d'interaction proche ou identique sur la TnC, suggérant une transmission du signal activateur calcique par ces deux protéines (Potter et coll., 1995 ; cf. Fig. 16).

β - Polymorphisme

Il existe trois isoformes distinctes de TnT dans les muscles striés de Vertébrés (Dhoot et coll., 1979), chacun produit par un gène distinct : la TnT squelettique rapide (Breitbart & Nadal-Ginard, 1986), la TnT squelettique lente (Gahlman et coll., 1987) et la TnT cardiaque (Cooper & Ordahl, 1984). De multiples isoformes sont présentes dans les muscles squelettiques lents, squelettiques rapides et cardiaques, et leur présence serait corrélée avec les propriétés physiologiques propres à chaque type de fibre (Wu et coll., 1994). Chacun des trois gènes peut produire une grande variété d'isoformes par épissage alternatif des transcrits (Bandman, 1992), et sont régulés de façon tissu spécifique et selon le stade développemental. Certaines régions sont relativement conservées entre isoformes, alors que d'autres sont hautement variables. A l'extrémité amino-terminale de la plupart des isoformes, les 10 à 15 premiers acides aminés sont très acides (la plupart sont des glutamates) et assez conservés parmi les isoformes. La région voisine, hypervariable, subit un épissage d'exons en 5' et donne naissance à la majorité des isoformes : la variabilité de cette région peut donner 64 isoformes possibles (Breitbart et coll., 1985), voire même 128 isoformes potentielles (Morgan et coll., 1993). Le reste de la protéine est relativement conservé. Seule une région variable existe dans

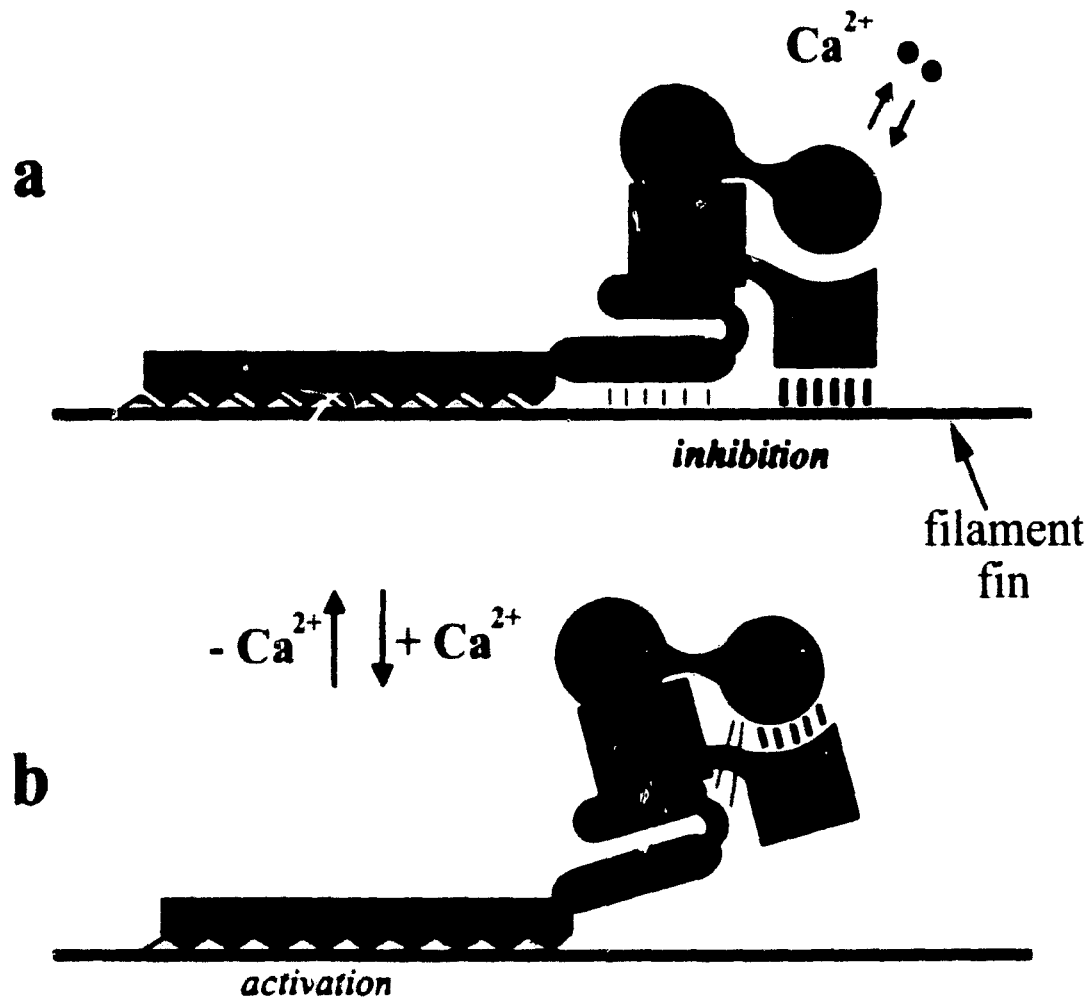


Fig. 16 : Récapitulatif des interactions existantes entre TnT (en bleu), TnC (en rouge), TnI (en vert) et le filament actine – tropomyosine. La région amino-terminale Nt de la TnI (1 – 98) interagit avec le domaine carboxy-terminal Ct de la TnC et le domaine carboxy-terminal de la TnT (216 – 263) ; le fragment T1 de la TnT interagit avec le filament fin. Ces interactions sont indépendantes de la concentration calcique et maintiennent la cohésion structurale du complexe des troponines. Les interactions dépendantes du Ca^{2+} sont représentées par des traits noirs (D'après Malnic et coll., 1998).

la partie carboxy-terminale, pouvant donner deux isoformes par épissage mutuellement exclusif : les isoformes α et β (Medford et coll., 1984 ; Pan & Potter, 1992). Ce domaine comporte beaucoup d'acides aminés polaires favorisant les interactions avec les autres sous unités (Fig. 15).

En dépit du nombre important d'isoformes possibles, seules quatre isoformes rapides majeures (TnT1f, TnT2f, TnT3f, TnT4f) et deux isoformes lentes (TnT1s et TnT2s) ont été identifiées par électrophorèse (Schmitt & Pette, 1988 ; Hartner et coll., 1989).

γ - Fonction

Dans la cohésion structurale - La TnT possède un rôle dans la structure du complexe des Tn et α : l'accrochage de celui-ci sur le filament fin, tous les 38.5 nm, par ses liaisons à la Tm.

Dans la sensibilité calcique - La TnT joue aussi un rôle primordial dans la régulation calcique de la contraction. Plusieurs études ont en effet montré une corrélation entre la composition en isoformes de TnT et la sensibilité calcique dans les fibres squelettiques et cardiaques (Schachat et coll., 1987 ; Reiser et coll., 1992). La TnT confère la sensibilité calcique à un système [Actine-Myosine-Tm-TnI-TnC], en modulant les interactions TnI-TnC. Cheung et coll. (1987) ont montré que l'énergie libre de formation du complexe ternaire [TnC - TnI - TnT] était inférieure à celle calculée d'après les mesures des énergies libres des trois complexes binaires. La TnT réduirait donc l'affinité de la TnC pour la TnI, et permettrait la régulation par le Ca^{2+} de l'activité inhibitrice de la TnI, neutralisée en absence comme en présence de Ca^{2+} quand la TnT fait défaut (Amphlett et coll., 1976).

Dans l'activation de l'activité ATPasique de la myosine - La TnT peut augmenter l'activité ATPasique de la myosine en présence de Ca^{2+} (Fig. 16b ; Greaser & Gergely, 1971 ; Malnic & Reinach, 1994 ; Farah et coll., 1994). Selon Potter et coll. (1995), cette stimulation existe même en absence d'interactions entre la TnI et la TnC, impliquant l'interaction directe de la

TnC avec la TnT. Ces auteurs proposent donc qu'outre la levée de l'inhibition de la TnI, la TnC pouvait activer l'activité ATPasique de la myosine via la TnT. Malnic et coll. (1998) ont montré que la région amino-terminale de la TnT (fragment 1-191) pouvait reconstituer l'activation de l'ATPase en présence de Ca^{2+} . Dans ces conditions, le fragment T1 est le seul à interagir avec le filament d'actine - Tm (Fig. 16) : la dissociation du domaine globulaire libérerait la fonction activatrice du fragment 1-191. En absence de Ca^{2+} , 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). Les trois sous-unités de Tn sont maintenues par une base structurale indépendante du Ca^{2+} entre les domaines carboxy-terminal de la TnC, amino-terminal de la TnI et les 50 derniers acides aminés de la TnT (Fig. 16).

Dans le phénomène de coopérativité – Le complexe des Tn est disposé tous les 7 monomères d'actine. Pourtant, la liaison du Ca^{2+} sur le filament fin s'effectue de manière coopérative (Grabarek et coll., 1983). La Tm peut propager l'information le long du filament fin et assurer une coopérativité basique (cf. paragraphe II, 1, a, α). La TnT semble jouer un rôle dans la propagation de l'effet inhibiteur en absence de Ca^{2+} et dans la propagation du signal activateur en présence de Ca^{2+} (Farah & Reinach, 1995). La présence de la région T1 est indispensable dans la propagation de la coopérativité (Shaertl et coll., 1995). Sa position clé sur la région de chevauchement de deux Tm (White et coll., 1987), région hautement flexible (Phillips et coll., 1986), permet le contrôle de la flexibilité de la Tm (Gordon et coll., 2000). Des études sur fibres pelées ont confirmé que le degré de coopérativité, déterminé par le coefficient de Hill des relations tension / pCa (Brandt et coll., 1984), dépendait des isoformes de TnT (Greaser et coll., 1988 ; Nassar et coll., 1991). Schachat et coll. (1987) ont démontré que les fibres exprimant la TnT2f associée à l' α_2 -Tm possédaient la plus grande coopérativité.

En résumé, les interactions entre les sous-unités de Tn sont soit dépendantes, soit indépendantes de la concentration calcique. En absence de Ca^{2+} , les interactions structurales maintiennent la cohésion du complexe des Tn et son ancrage sur le filament fin d'actine – Tm. Les interactions dépendantes du Ca^{2+} sont responsables de la fonction régulatrice du complexe des Tn : les domaines concernés établissent leurs interactions les plus favorables en fonction de la liaison du Ca^{2+} sur les sites régulateurs de la TnC.

2 - VERS UN MODELE DE REGULATION DE LA CONTRACTION

a - Le modèle de l'inhibition stérique et ses limitations

Sur la base d'études aux rayons X sur muscle intact (Haselgrove, 1973 ; Huxley, 1973 ; Parry & Squire, 1973) et d'observations en microscopie électronique de filaments reconstitués (Wakabayashi et coll., 1975), l'hypothèse du blocage stérique implique qu'une molécule de Tm, sous le contrôle d'un complexe de Tn, réalise un encombrement stérique de l'unité d'actine filamenteuse qui lui est associée. Les sites de liaison de l'actine ne seraient par conséquent pas accessibles pour la myosine. 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). Ce modèle rapidement accepté par l'ensemble des scientifiques montra ses limites au fil du temps (cf. Squire, 1981), bien qu'il ne soit cependant pas totalement dépassé (Squire, 1994). De nombreuses études ont révélé une nature plus complexe du processus régulateur : il a par exemple été démontré que la liaison des têtes S1 de la myosine sur l'actine pouvait survenir en absence de Ca^{2+} à faible force ionique (Brenner et coll., 1984). D'autres auteurs (Wagner & Giniger, 1981 ; Chalovich & Eisenberg, 1982) ont rapporté que l'HMM et sa LC2 intacte se liaient à l'actine régulée en absence de Ca^{2+} , avec toutefois une affinité 3 à 4 fois moins importante qu'en présence de Ca^{2+} . Tous ces résultats,

obtenus à faible force ionique, ont été confirmés à force ionique normale (El-Saleh & Potter, 1985) : ceci prouve que la liaison des têtes S1 ou HMM à l'actine régulée surviendrait malgré le blocage stérique. Ces expériences biochimiques basées sur des critères d'affinité et de liaison suggèrent donc que le complexe [Tm - Tn] pourrait ne pas réguler pas l'interaction actine - myosine par un simple blocage stérique, mais ferait intervenir des contraintes de liaison et de cinétique (El-Saleh et coll., 1986).

En conclusion, malgré l'existence de deux positions "off" et "on" de la Tm et un rôle certain dans le mécanisme de la régulation par effet stérique, de nombreuses évidences biochimiques montrent les insuffisances du modèle original du blocage stérique.

b - Le modèle schématique de Lehrer : les hypothèses cinétiques

Les premières études biochimiques (datant du début des années 70) ont permis une meilleure compréhension des interactions entre les différentes protéines régulatrices et des changements structuraux induits au sein du filament fin par la fixation du calcium et / ou des têtes de myosine. Les modèles de régulation récents tiennent désormais compte du phénomène de coopérativité, et sont pour la plupart de type allostérique, c'est à dire que la fixation du Ca^{2+} (et / ou la liaison forte des têtes de myosine) modifie la structure du filament fin, de sorte que la liaison des têtes de myosine voisines est améliorée. Geeves et coll. ont proposé en 1987 un modèle rapidement accepté par la communauté scientifique (Geeves & Halsall, 1987), amélioré par la suite (McKillop & Geeves, 1991 ; McKillop & Geeves, 1993 ; Geeves & Lehrer, 1994), et légèrement modifié par Lehrer (1994). Le modèle proposé par ce dernier 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 $\pm Ca$ de la TnC. Dans ce modèle, le contrôle de la régulation repose sur la position de la Tm sur l'actine : le contrôle de la transition "off" \rightarrow "on" contrôle la transition de l'état faiblement lié

(configuration "A") vers l'état fortement lié des têtes S1 de myosine à l'actine (configuration "R"). Ce modèle est schématisé à la Fig. 17.

En absence de Ca^{2+} , la Tm inhibe l'isomérisation "A" → "R" des têtes S1 de myosine, mais n'empêche pas la fixation des têtes S1 en configuration "A" sur l'actine. Le nombre de têtes en configuration faiblement liée "A" est cependant limité en absence de Ca^{2+} par un sous-état de l'état "off", appelé état "blocked" (McKillop & Geeves, 1993). La troponine I serait à l'origine de cet état : elle doit pour cela bloquer les 2/3 des sites de liaison à l'actine (McKillop & Geeves, 1993). L'interaction TnI – actine réduit en outre la constante d'équilibre "off" ↔ "on" de la Tm (K_T dans le modèle de Geeves).

En présence de Ca^{2+} , l'état "blocked" n'existe plus (Head et coll., 1995) : la TnI se détache de l'actine, débloquent ainsi les sites de liaison et permettant la fixation d'un plus grand nombre de têtes de myosine en configuration "A". Parallèlement, la transition "off" → "on" de la Tm n'est plus inhibée.

Cependant, en absence de têtes S1, un système [actine – Tm – Tn] est largement dans l'état "off", même en présence de Ca^{2+} (Greene & Eisenberg, 1980 ; Lehrer & Morris, 1982). Les travaux de Kress et coll. (1986) suggèrent que la liaison d'une faible proportion de têtes S1 (sous la forme [S1 – ADP] ou S1) est suffisante pour causer un mouvement apparent de la Tm. La liaison d'un nombre croissant de têtes S1, favorisée par la disparition de l'état "blocked", serait donc en mesure de faire passer la Tm en position "on". En conséquence, la constante d'équilibre K_T est multipliée par un facteur 10, celle-ci passant de 0.02 en absence de Ca^{2+} à 0.2 en présence de Ca^{2+} (Geeves & Halsall, 1987).

Lorsque la Tm se trouve dans l'état "on", les têtes S1 de myosine peuvent s'isomériser (passage de l'état "A" vers l'état "R"). Les ponts cycliques générateurs de force ainsi créés font ainsi coulisser les filaments fins et épais, et permettent le raccourcissement en conditions

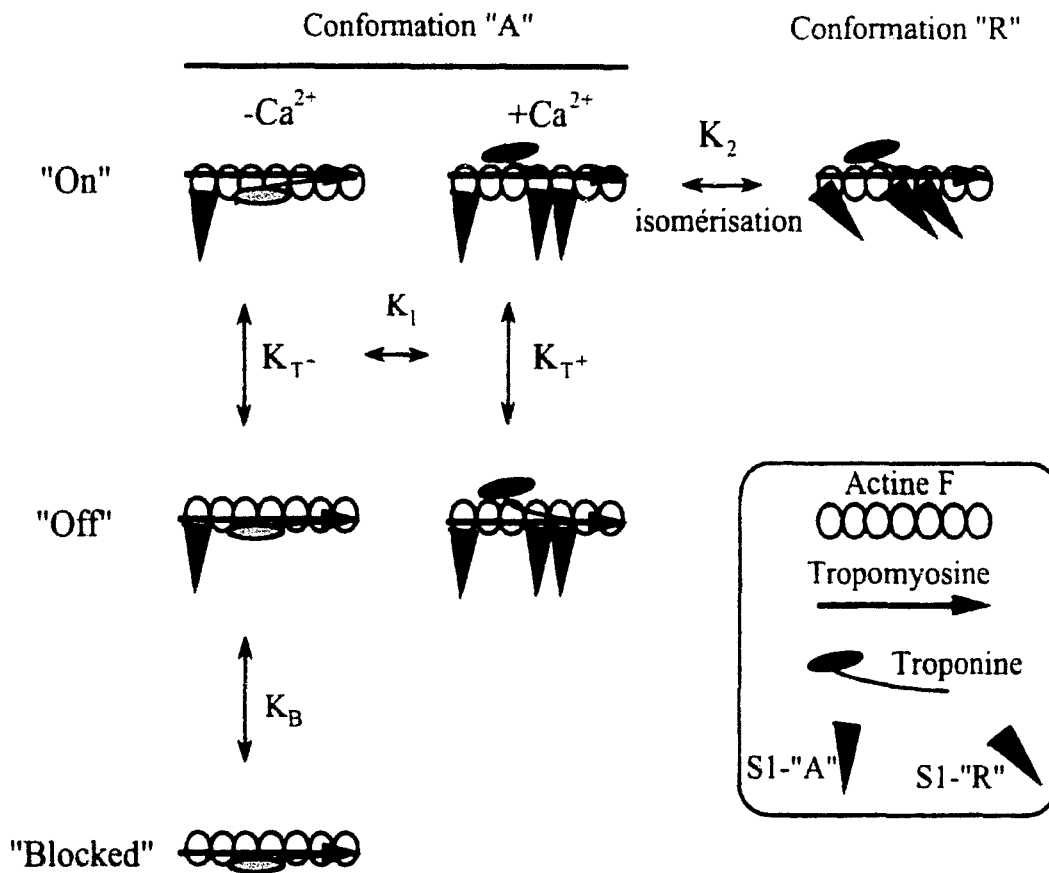


Fig. 17: Modèle schématique représentant les trois doubles états ("on"/"off", $+Ca^{2+}$ / $-Ca^{2+}$, "A" / "R") et leurs constantes d'équilibre. L'état "blocked" est un sous état de l'état "off", K_B représentant la constante d'équilibre "off" \leftrightarrow "blocked". La tropomyosine est schématisée dans deux positions ("off" \leftrightarrow "on"), avec deux constantes d'équilibre K_T (K_T^- en absence de Ca^{2+} et K_T^+ en présence de Ca^{2+}). La position du complexe des troponines est fonction de la présence ou de l'absence de Ca^{2+} . Les conformations "A" et "R" des têtes S1 sont schématisées par des angles différents, K_1 représentant la constante initiale de liaison des têtes S1 de myosine (liaison faible, pas de génération de force), et K_2 la constante d'isomérisation "A" \leftrightarrow "R" des têtes S1 de myosine.

En absence de Ca^{2+} , le système est principalement dans l'état bloqué. K_T^- est égale à 0.02.

En présence de Ca^{2+} , K_T est multipliée par 10 (devenant ainsi égale à 0.2), et la constante K_1 augmente d'un facteur 3 (absence de l'état bloqué).

Schéma modifié d'après Lehrer, 1994.

anisométriques. Il faut noter qu'à concentration élevée en têtes S1, le Ca^{2+} *per se* peut induire la contraction, non pas en augmentant directement la proportion d'unités de Tm en position "on", mais en facilitant la transition "off" → "on" induite par la liaison des têtes S1 de myosine. Ce système est coopératif : si l'on définit "n" comme le paramètre de taille de l'unité coopérative (correspondant au nombre de sous-unités d'actine sous le contrôle d'une tête S1), pour une tête S1 en conformation "R" liée, (n-1) têtes S1 en conformation "A" peuvent s'isomériser. Selon Geeves & Lehrer (1994), "n" serait égal à 12. Maytum et coll. (1999) ont confirmé ce résultat en trouvant une valeur similaire ("n" = 11) : en présence de troponine, l'unité coopérative est par conséquent plus grande que l'unité structurale constituée de 7 monomères d'actine, un dimère de Tm, et un complexe de Tn.

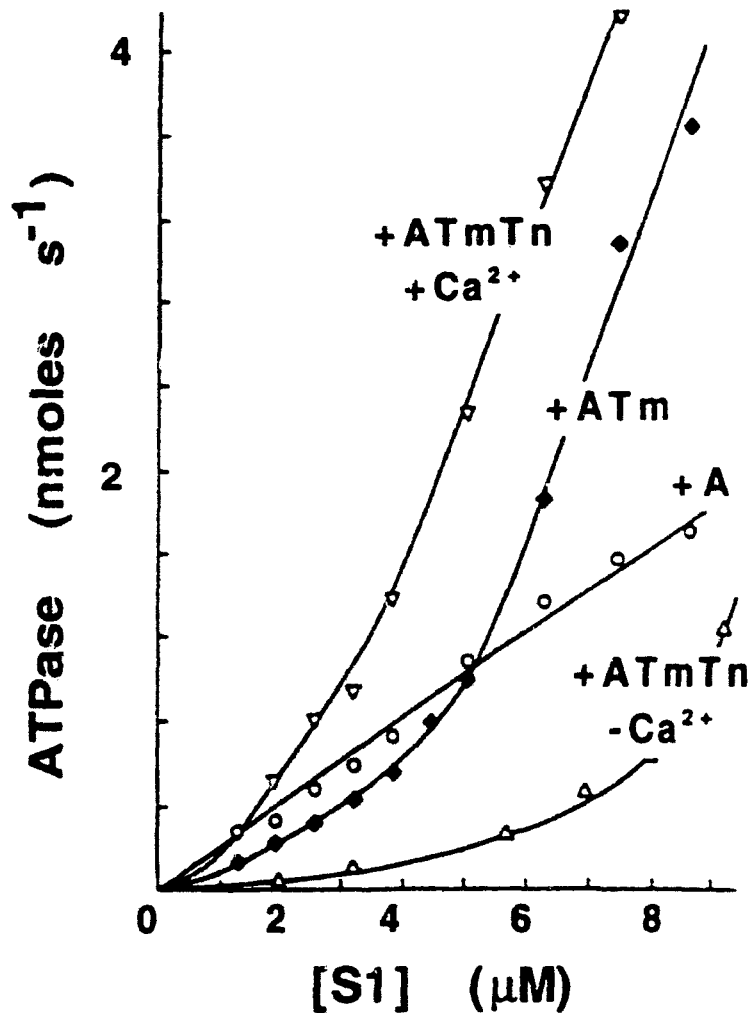
Le retrait du Ca^{2+} , en diminuant progressivement la constante d'équilibre K_T et en empêchant la fixation des têtes dans l'état "A", va conduire à un relâchement en diminuant le nombre de ponts générateurs de force, permettant aux sarcomères de reprendre leur longueur de repos.

c - Le Ca^{2+} en tant que modulateur allostérique de la régulation de la contraction

En solution, dans les expériences mettant en jeu des filaments fins reconstitués et des concentrations variables en têtes de myosine, le calcium n'est ni suffisant, ni nécessaire pour activer les filaments fins (Lehrer & Geeves, 1998). Au contraire, les têtes S1 de myosine seraient nécessaires pour déclencher l'activation de la contraction. De nombreux auteurs ont en effet montré que les têtes S1 de la myosine n'étaient pas seulement douées d'activité enzymatique et aptes à générer de la force, mais étaient aussi impliquées dans le processus de régulation de la contraction (Gordon et coll., 1988 ; Millar & Homsher, 1990 ; Swartz & Moss, 1992). Ceci nous mène apparemment vers un paradoxe : les têtes S1 déclenchent leur propre activité (le Ca^{2+} n'officialie que pour faciliter le processus). Ce paradoxe est en fait

surmontable si l'on considère le filament fin comme un système coopératif / allostérique (Hill et coll., 1980 ; Geeves & Halsall, 1987), du type Monod, Wyman & Changeux (Monod et coll., 1965), acceptant les têtes S1 de myosine comme ligand. Ainsi, même si les têtes de myosine se fixent difficilement sur un filament fin dans l'état "off", elles se lient de manière coopérative au filament fin dans l'état "on" (Fig. 18). En ce sens, il est possible de faire une analogie avec la fixation de l'oxygène (O_2) sur les états "R" ("Relaxed") et "T" ("Taut") de l'hémoglobine (Perutz, 1989 ; cf. Tableau 3). Selon la définition classique de la réaction catalytique, l'actine peut être considérée comme l'enzyme, et le complexe [S1 - n de] ([S1 - ATP] ou encore [S1 - ADP - Pi]) peut être considéré comme le substrat. En absence de Tm, l'actine se comporte comme une enzyme non-coopérative (Fig. 9, rappelée à la page suivante), similaire à l'hémoglobine dissociée (Mills et coll., 1976) : l'actine représente donc la sous unité catalytique du système régulateur enzymatique du filament fin. En présence de Tm, le système devient coopératif (Fig. 9) : le complexe [actine - Tm] représente donc le système coopératif de base, avec les états "off" et "on" comparables aux états "R" et "T" de l'hémoglobine. Pour la plupart des systèmes coopératifs / allostériques, le substrat est aussi l'activateur (e.g. O_2 pour l'hémoglobine). Or, dans le cas présent, le substrat ([S1 - ATP] ou [S1 - ADP - Pi]) ne se lie que faiblement et de façon non coopérative à l'actine (Chalovich & Eisenberg, 1982). En revanche, la liaison du substrat à l'actine entraîne le relargage du Pi, et c'est le produit intermédiaire ([S1 - ADP] ou encore S1) qui représente le ligand.

Dans ce système, le Ca^{2+} cause un déplacement de la courbe [activité ATPasique] = f [concentration en têtes S1] (Fig. 9), tout comme le 2,3-diphosphoglycerate déplace la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. L'activateur allostérique de notre système enzymatique est par conséquent le Ca^{2+} (Lehrer & Geeves, 1998), qui change la constante d'équilibre K_T , et détermine le degré de facilité avec lequel la myosine peut activer



Rappel de la Fig. 9 : Relation activité ATPasique en fonction de la concentration en têtes S1, en présence d'actine (+A) ; d'actine et de tropomyosine (+ATm) ; d'actine, tropomyosine et troponines (+ATmTn), en présence de calcium (+Ca²⁺) et en absence de calcium (-Ca²⁺). En absence de Tm, la relation est linéaire (pas de phénomène de coopérativité). La relation indique une coopérativité en présence de Tm. En présence de Tn, l'activité ATPasique est inhibée en absence de Ca²⁺, et potentialisée en présence de Ca²⁺ (D'après Lehrer & Morris, 1982).

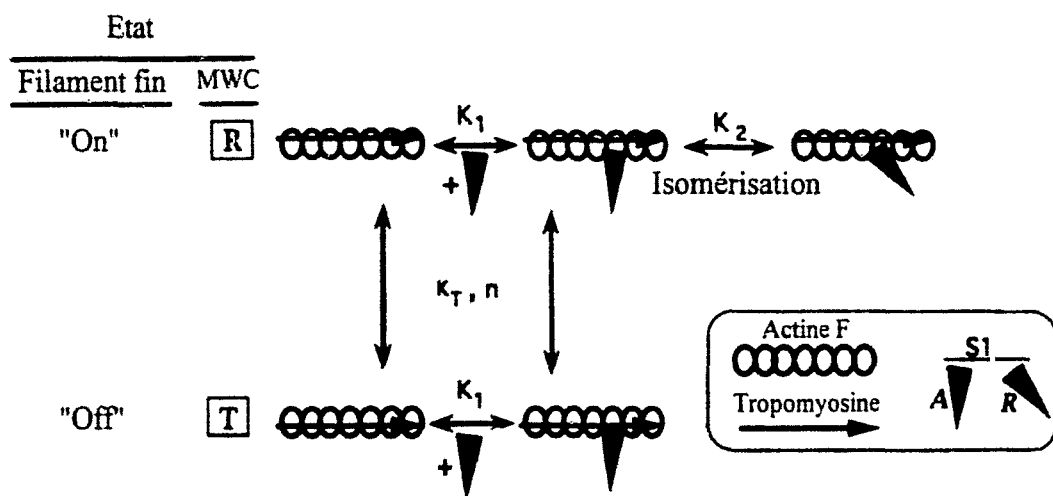


Fig. 18 : Représentation schématique des analogies entre les états "off" et "on" du filament fin et les états "R" et "T" d'un système type MWC (Monod, Wyman et Changeux).

K_1 : constante initiale de liaison des têtes S1 de myosine (dans l'état "A"), indépendante de l'état "off" ou "on".

K_2 : constante d'isomérisation "A" ↔ "R", dépendante de l'état "on" du filament fin.

K_T : constante d'équilibre "off" ↔ "on"

n : taille de l'unité coopérative.

D'après Lehrer & Geeves, 1998.

	Hb	ATCase	Actine-Tm
Fonction(s)	transport de l' O_2	voie de synthèse du CTP	contrôle l'ATPase de la myosine et la contraction
Nombre de sous-unités	4	6 catalytiques / 6 régulatrices.	7 catalytiques / 1 régulatrice
Etats	T \leftrightarrow R [R] / [T] \ll 1	T \leftrightarrow R [R] / [T] < 1	off \leftrightarrow on [on] / [off] < 1
Substrat (ligand)	(O_2)	asp/cbm-Pi	S1-ATP, S1-ADP-Pi
Produit (ligand)	(O_2)	cbm-asp	S1-ADP, S1
Activateurs	O_2	asp, cbm-Pi	S1-ADP, S1
activateurs allostériques		(ATP)	(Tn + Ca^{2+})
Inhibiteurs allostériques	DPG, H^+	CTP	Tn- Ca^{2+} , TnI
Taille de l'unité coopérative (n)	~4	~6	~11

Tableau 3 : Comparaison entre les propriétés du système actine-tropomyosine et les systèmes coopératifs / allostériques tels que l'hémoglobine (Hb) et l'aspartyl transcarbamylase (ATCase). asp : acide aspartique ; cbm-asp : acide carbamylaspartique ; cbm-Pi : carbamyl-phosphate ; DPG : 2, 4-diphosphoglycérate. Modifié d'après Lehrer & Geeves, 1998.

le filament fin. Il faut cependant préciser que dans les fibres musculaires, à la différence des études en solutions, la concentration en têtes de myosine est fixée par l'arrangement géométrique. Dans ce cas, la contraction est déclenchée par le Ca^{2+} . Par ailleurs, les travaux de certains auteurs suggèrent qu'en absence de myosine, le Ca^{2+} peut induire le mouvement de la Tm (Kress et coll., 1986 ; Poole et coll., 1995). Des recherches sont donc nécessaires pour clarifier les rôles respectifs de la TnC en présence de Ca^{2+} et des têtes S1 dans l'activation du filament fin sur fibres isolées. Néanmoins, on retiendra que la liaison du Ca^{2+} sur la TnC et la formation de ponts actine – myosine agissent en synergie pour activer le filament fin (Williams et coll., 1988 ; Popp & Maeda, 1993).

d - Le couplage TnC – têtes S1 de myosine

La TnC change de structure secondaire suite à la fixation du Ca^{2+} , et la cascade de réarrangements conformationnels qui s'ensuit provoque la formation de ponts cycliques entre l'actine et la myosine. Ainsi, les changements structuraux de la TnC consécutifs à la liaison du Ca^{2+} sont associés à l'interaction actine – myosine. Inversement, il existe à l'évidence une relation entre l'interaction actine – myosine et l'affinité calcique de la TnC. Bremel & Weber (1972) ont montré qu'en absence d'ATP, la création de ponts de "rigor" entre l'actine et la myosine augmentait l'affinité calcique de la TnC. Sur la TnCf, cette augmentation serait de l'ordre d'un facteur 2 (Güth & Potter, 1987). La formation de ponts cycliques améliorent davantage l'affinité des sites régulateurs de la TnCf vis-à-vis du Ca^{2+} , l'affinité de ces sites étant multipliée par au moins 10 lorsque le muscle passe de l'état relâché à l'état contracté en présence de MgATP (Güth & Potter, 1987). Des résultats similaires ont été obtenus sur la TnC cardiaque (Hofmann & Fuchs, 1987). Les travaux de Zot & Potter (1989) ont démontré qu'outre la liaison du Ca^{2+} sur les sites régulateurs, des changements dans la structure amino-terminale de la TnC pouvaient être dus à la liaison forte des têtes de myosine sur l'actine,

concluant ainsi à un couplage réciproque entre la formation de ponts actine – myosine de type "R" et changements structuraux de la TnC. Toujours selon ces auteurs, la TnC existerait sous un nombre important de conformations et pas seulement dans une conformation fermée et une conformation ouverte. Utilisant la résonance paramagnétique électronique, Li & Fajer (1994) ont effectivement décrit de multiples réorientations de la TnC en fonction du ligand activateur de la contraction (Ca^{2+} sur les sites spécifiques de la TnC ou ponts actine – myosine cycliques), avec un effet croissant $[\text{Ca}^{2+}] < [\text{ponts actine - myosine}] < [\text{Ca}^{2+} + \text{ponts actine - myosine}]$ sur l'amplitude des réorientations. Ainsi, La TnC détecterait les changements structuraux de la myosine durant la génération de la force (Li & Fajer, 1998).

Ces considérations biochimiques soulignent l'aspect dynamique d'un système de régulation complexe basé sur une somme d'interactions (parfois réciproques) entre les différents composants de la machinerie contractile, par opposition à l'aspect figé qu'entraîne la théorie du blocage stérique, avec une position "off" où le système serait gelé, et une position "on", où le système manifesterait au contraire une intense activité.

III. MODULATION DE LA REGULATION DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE. ROLE DE LA TROPONINE C.

Les caractéristiques d'activation calcique des fibres musculaires pelées sont classiquement étudiées via la tension développée par la fibre en fonction de la concentration calcique (relations Tension / pCa, avec $pCa = -\log [Ca^{2+}]$, cf. Fig. 19). 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 calcique nécessaire à induire 50 % de la tension maximale P_0 , est un indicateur de l'affinité calcique ;
- la pente de la sigmoïde, donnée par l'équation de Hill (cf. Fig. 19), traduit le degré de coopérativité entre les sites régulateurs de la TnC et les protéines régulatrices du filament fin.

Fibres lentes et fibres 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. Ainsi, les fibres lentes ont un seuil d'activation inférieur (meilleure sensibilité) par rapport aux fibres rapides, tandis que ces dernières possèdent une coopérativité supérieure (coefficients de Hill plus élevés). Des différences entre les valeurs de pCa_{50} de fibres lentes et rapides sont décrites de façon moins systématique. Ainsi, de nombreux auteurs ont trouvé des valeurs de pCa_{50} non significativement différentes entre des fibres lentes et des fibres rapides (Takagi & Endo, 1977 ; Stephenson & Forrest, 1980 ; Laszewski-Williams et coll., 1989 ; Stevens et coll., 1993). Lorsque des différences

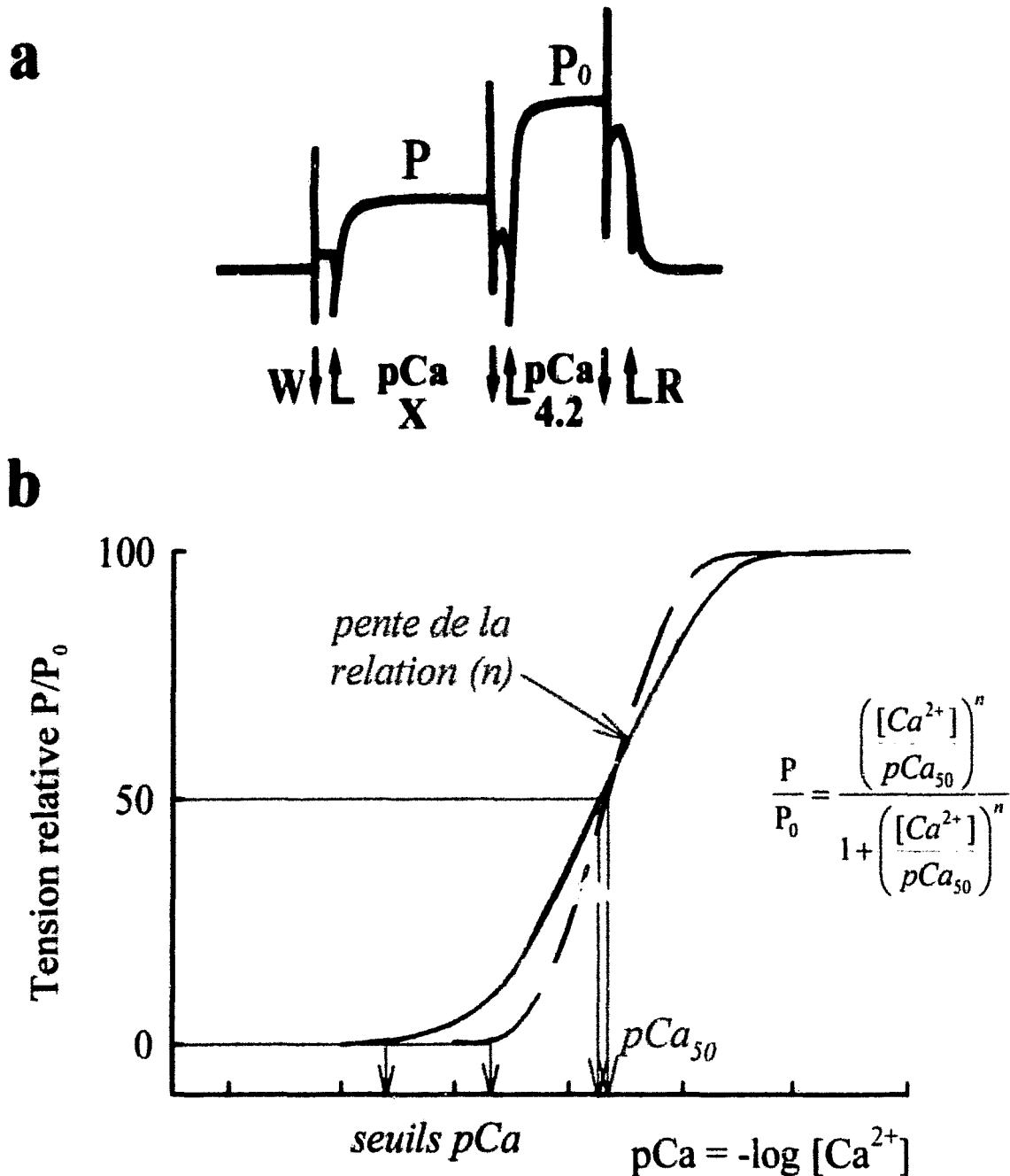


Fig. 19 : Détermination des caractéristiques d'activation calciques avec la relation Tension / pCa.

a : tracé d'enregistrement de tensions isométriques développées par une fibre. L'application d'une solution de concentration pCa X (donnant un niveau de tension sous-maximal P) est suivie par l'application d'une solution saturante en calcium (pCa 4.2, induisant un niveau de tension maximal P_0). Les déflections rapides correspondent au retrait (flèches pointées vers le bas) ou à l'ajout (flèches pointées vers le haut) de solutions. W : solution de lavage, R : solution relaxante.

b : relations Tension / pCa d'une fibre lente (trait plein) et d'une fibre rapide (trait discontinu). Le rapport P/P_0 est reporté en fonction de la concentration calcique exprimée en pCa. La pente de la relation (en vert) est ajustée à l'aide de l'équation de Hill (donnée en encart), qui donne les valeurs de seuil, pCa_{50} et pente (n).

significatives sont décrites, les pCa_{50} des fibres rapides sont toujours inférieures aux pCa_{50} des fibres lentes (Gardetto et coll., 1989 ; Danieli-Betto et coll., 1990).

1 - MODULATION PAR LES SITES REGULATEURS DE LA TROPONINE C

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 (cf. Matériel et Méthodes). De nombreux auteurs ont ainsi pu montrer 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 TnC lente ne possède pas de site I fonctionnel, et la mutation de l'unique site fonctionnel (site II) abolit la contraction (Putkey et coll., 1989). En dépit de son incapacité à lier le Ca^{2+} , le site I serait impliqué dans le processus de déclenchement de la contraction (Gulati et coll., 1992). La restauration de la fonction du site I confère des propriétés d'activation similaires à celles des fibres rapides (Sweeney et coll., 1990), mais la contraction ne peut s'effectuer si le site I est le seul site régulateur fonctionnel (Putkey et coll., 1989 ; Sweeney et coll., 1990).

Dans les fibres rapides, après la réincorporation d'un mutant dont la fonction du site I est abolie, la tension est reconstituée à 25 % seulement (Sheng et coll., 1990). L'activation par le site I uniquement est possible, mais la tension que la fibre est capable de générer n'est plus que de 50 % (Sheng et coll., 1990), voire de 20 % (Putkey et coll., 1991) de la tension maximale en présence de la TnC d'origine. Par conséquent, chaque site régulateur est capable

de faire fonctionner partiellement la TnC rapide, mais les deux sites régulateurs (I et II) sont nécessaires à son fonctionnement optimal (Shen, et coll., 1990)

2 - MODULATION PAR LES CATIONS DIVALENTS

a - Sr/Ba/Cd/Pb

L'activation physiologique du muscle s'effectue par la fixation de Ca^{2+} sur la TnC. Néanmoins, il a été démontré que d'autres cations divalents pouvaient activer la machinerie contractile. Fuchs (1971) a ainsi montré que les ions Sr^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} et Mn^{2+} pouvaient déplacer du Ca^{2+} lié à la TnC par compétition. Les cations pouvant réellement activer la production de force dans les fibres isolées sont (outre Ca^{2+}) : Sr^{2+} (Kasai & Oosawa, 1968 ; Donaldson & Kerrick, 1975), Ba^{2+} (Saito et coll., 1992), et Cd^{2+} (Stephenson & Thieleczek, 1986). En utilisant des fibres isolées et pelées de grenouille, Stephenson & Thieleczek (1986) ont montré que l'activation par ces cations était réversible et donnait des tensions maximales sensiblement équivalentes. Les relations T/pBa et T/pCd sont cependant aplaties par comparaison aux relations T/pCa et T/pSr. Par ailleurs, les concentrations ioniques nécessaires pour obtenir 50 % de la force maximale (pCa_{50}) sont respectivement de 6.09, 5.30, 4.59, 3.15 pour les ions Ca^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} et Ba^{2+} . Les concentrations ioniques nécessaires pour l'activation à un niveau donné ne sont donc pas identiques pour tous les cations. Il semblerait que l'efficacité de liaison d'un ion sur les sites de la TnC soit dépendante du rayon ionique (Fuchs, 1971), dont la valeur optimale doit être proche de l'angström (0.99 Å pour le Ca^{2+} , 1.12 Å pour le Sr^{2+}). Sur fibres pelées, l'activation par le strontium présente un intérêt dû à la sensibilité différentielle des fibres lentes (ou cardiaques) et rapides pour cet ion. Il est en effet démontré que les fibres lentes ou cardiaques sont 5 à 10 fois plus sensibles au Sr^{2+} que les fibres rapides (Kitazawa, 1976 ; Kerrick et coll., 1980). Cette différence d'activation par le

Ca^{2+} et le Sr^{2+} sont donc exploitables sur fibres pelées afin d'identifier rapidement et de manière fiable le typage des fibres étudiées (Takagi et coll., 1978 ; Hoar & Kerrick, 1979 ; Fink et coll., 1986 ; Stevens et coll., 1993). La figure 20 montre les relations entre les tensions développées en fonction de la concentration en Ca^{2+} (T/pCa) ou en Sr^{2+} (T/pSr). Le critère Δ' (représentant la différence $\text{pCa}_{50} - \text{pSr}_{50}$) traduit l'affinité relative des fibres : il est ordinairement inférieur à 0.3 pour les fibres lentes, et supérieur à 1 pour les fibres rapides.

b - Bases de la sensibilité au Strontium

Les expériences d'extraction - remplacement de la TnC désignent cette protéine comme responsable de la sensibilité différentielle pour les deux cations : après substitution de la TnCs par la TnCf, les fibres lentes sont beaucoup moins sensibles au Sr^{2+} (Morimoto & Ohtsuki, 1988), tandis qu'après remplacement de la TnCf par la TnCs, les fibres rapides acquièrent une meilleure sensibilité au Sr^{2+} (Babu et coll., 1987 ; Babu et coll., 1989). Des expériences de mutagenèse des sites calciques ou de constructions de chimères ont confirmé ces résultats : l'activation du site I de la TnC lente rend les fibres lentes moins sensibles au Sr^{2+} (Sweeney et coll., 1990 ; Gulati & Rao, 1994). Si l'on substitue les 41 premiers acides aminés de la TnC rapide par les 41 premiers acides aminés de la TnC lente, cette chimère réincorporée dans l'environnement cardiaque confère une sensibilité au Sr^{2+} caractéristique des fibres lentes (Gulati et coll., 1992). Ces données montrent donc que les 41 premiers acides aminés sont suffisants pour imprimer la sensibilité vis à vis de l'ion Sr^{2+} . Toutes ces données suggèrent que la TnC est responsable de la sensibilité différentielle des fibres lentes et rapides vis à vis du Sr^{2+} . Kerrick et coll. (1985) ont rapporté le seul cas où la sensibilité au Sr^{2+} n'était pas modifiée après une expérience d'extraction - remplacement, en réincorporant de la TnC cardiaque dans des fibres rapides de lapin.

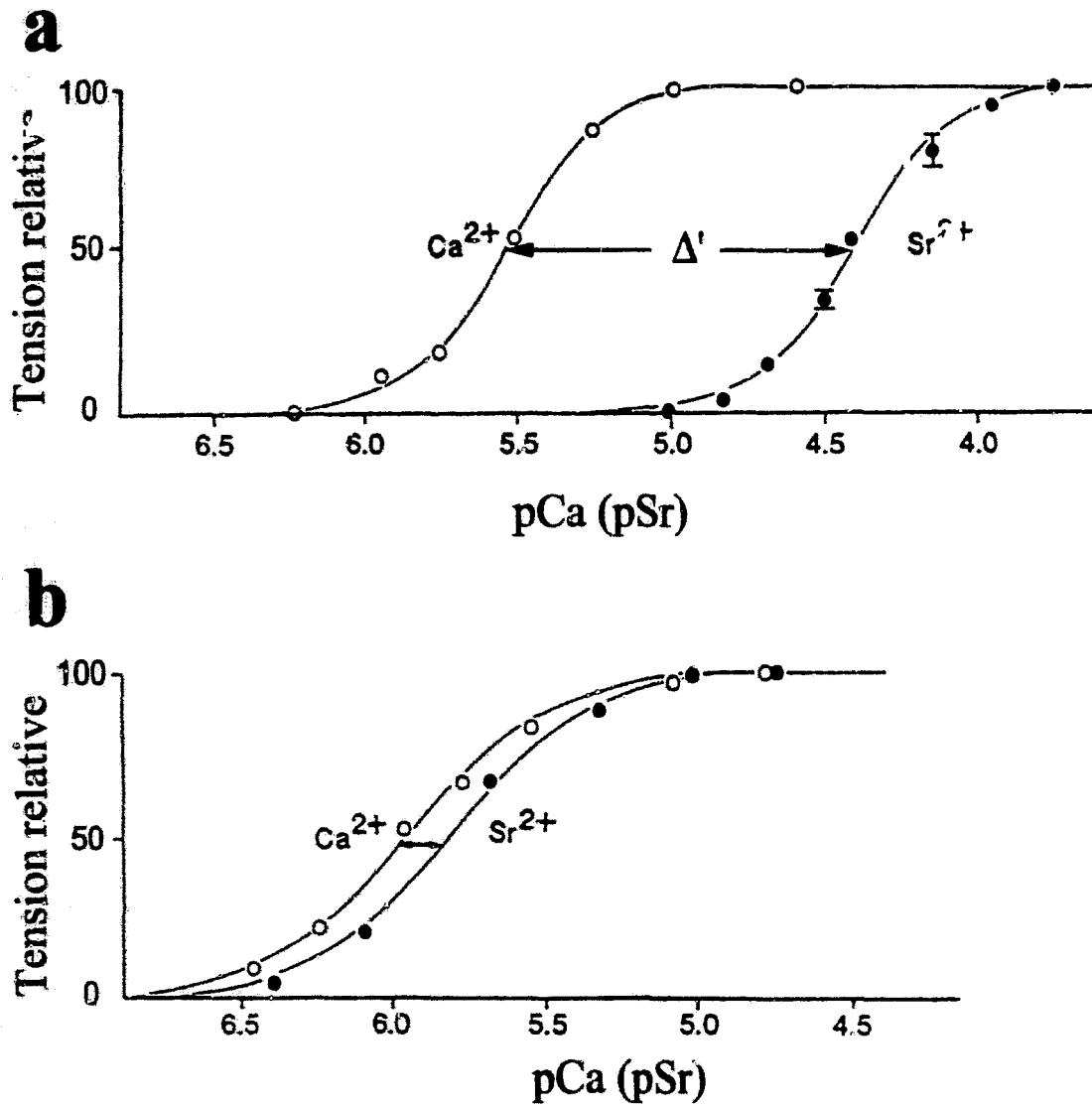


Fig. 20 : Identification de fibres rapides (a) et fibres lentes (b) de soleus de marsupial, à l'aide du critère Δ (pCa₅₀ - pSr₅₀). D'après Wilson & Stephenson, 1990.

3 - MODULATION PHARMACOLOGIQUE

a - Bases et intérêts

Certains composés pharmacologiques peuvent moduler la régulation de la contraction musculaire (i.e. améliorer l'efficacité de cette contraction), et offrir une solution thérapeutique aux défaillances pathologiques de la machinerie contractile, comme l'insuffisance cardiaque. De tels composés sont ainsi capables d'augmenter la concentration calcique mobilisée durant la contraction (e.g. la digitaline), ou d'augmenter l'affinité calcique de la machinerie contractile ("calcium sensitizers"). Ces "calcium sensitizers" présentent l'avantage de ne pas provoquer de surcharge calcique pouvant être fatale aux cellules (Herzig & Quast, 1992). La TnC représente une cible de choix pour de tels composés, même si certaines molécules sont capables d'agir dans le processus de régulation en aval de la TnC. Il a ainsi été suggéré que l'effet du calcium sensitizer EMD 53998 (dérivé de la thiadiazinone) serait d'empêcher l'action inhibitrice de la TnI, en interférant avec l'interaction TnI - actine (Barth et coll., 1995).

Selon Ovaska & Taskinen (1991), les composés qui augmentent l'affinité calcique de la troponine C doivent stabiliser la conformation ouverte du domaine amino-terminal. Il a été démontré que la trifluoropérazine (Kurebayashi & Ogawa, 1988), le bépridil (Solaro et coll., 1986), le lévosimendane (Haikala et coll., 1995), le pimobendane (Fujino et coll., 1988) et le calmidazolium (El-Saleh & Solaro, 1987) étaient effectivement capables de se lier à la TnC et d'effectuer une telle stabilisation, entraînant ainsi une sensibilisation calcique du système contractile. La plupart de ces drogues ont toutefois des effets multiples. Sur des fibres musculaires de grenouille, la trifluoropérazine (classe des phénothiazines), qui se lie à la TnC de la même manière que le bépridil (MacLachlan et coll., 1990), possède un effet rémanent, ainsi qu'un effet inverse (diminution de l'affinité calcique) aux concentrations supérieures à

100 μM (Kurebayashi & Ogawa, 1988 ; données personnelles). Dans les paragraphes suivants, nous focaliserons notre attention sur le bépridil qui, sur fibres musculaires isolées et pelées, devrait avoir une action ciblée sur la TnC (ce que nous vérifierons). L'étude des effets du bépridil sur fibres pelées a été effectuée uniquement sur le tissu cardiaque, présentant l'isoforme lente de la TnC. Compte tenu des différences structurales et fonctionnelles existant entre les deux isoformes lentes et rapides de la TnC, nous avons émis l'hypothèse d'un effet différent du bépridil sur fibres lentes et rapides, comme cela avait été démontré pour le calmidazolium (El-Saleh & Solaro, 1987). Dans le cas où cette hypothèse serait vérifiée, ce composé présenterait l'avantage de nous renseigner sur le comportement de la TnC, d'accéder à son fonctionnement, ce que ne permet pas la relation $T / p\text{Ca}$ seule qui reflète l'activation calcique de la machinerie contractile dans son ensemble.

b - Le bépridil

c - Structure moléculaire et fonctions in-vivo

Le bépridil ([[(N-benzyl phénylamino)-2 isobutoxy-3 propyl]-1 pyrrolidine chlorhydrate) est une molécule polycyclique hydrophobe (Fig. 21). Cette molécule, utilisée cliniquement pour ses propriétés anti-angor et anti-arythmique, possède de nombreux effets aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des cellules. Son effet *in vivo* résulterait par conséquent d'effets intégrés (Solaro et coll., 1986).

Action en surface - De nombreuses études électrophysiologiques ont montré que le bépridil avait une action inhibitrice sur les canaux ioniques des fibres cardiaques. Ainsi, le bépridil inhibe le canal entrant lent calcique (diminution de l'amplitude du courant I_{Ca}) et le canal sodique rapide des cellules myocardiques (Vogel et coll., 1979, Yatani et coll., 1986), ce qui entraîne un effet inotrope négatif. Un effet inhibiteur sur les courants potassiques a aussi été mis en évidence sur les fibres de Purkinje de mouton (Berger et coll., 1989).

Action intracellulaire - Il a été démontré que le bépridil pouvait entrer dans les myocytes (Cramb & Dow, 1983). Il exerce une action inhibitrice sur la calmoduline (Lugnier et coll., 1984 ; Itoh et coll., 1984) : son action inotropique négative pourrait donc aussi impliquer l'inhibition d'enzymes dépendantes de la calmoduline, telles que la phosphodiesterase et la phosphorylation du phospholambane dans le réticulum sarcoplasmique cardiaque. Il exerce aussi une action sur l'affinité calcique de la troponine C (cf. paragraphe suivant). In vivo, l'effet global du bépridil sur les myocytes cardiaques serait la résultante de ces différentes actions. Son effet inotrope négatif serait en partie occulté par son effet sensibilisateur calcique sur les protéines régulatrices (Ozaki et coll., 1999).

β - Effet sur l'affinité calcique de la troponine C

L'action du bépridil sur l'affinité calcique du système contractile peut s'étudier sur des fibres pelées (cf. Matériels et Méthodes), où l'on s'affranchit de toute autre cible d'action connue (Herzig & Quast, 1992). Il a été démontré que le bépridil induisait une augmentation des forces isométriques sous maximales (Solaro et coll., 1986). Johnson et coll. (1980) ont montré que la TnC marquée avec l'acide 2-[4'-(iodoacetamide) aniline] naphthalene-6-sulfonique (IAANS) devenait sensible à l'occupation des sites régulateurs. En étudiant la fluorescence de la TnC marquée avec l'IAANS, Solaro et coll. (1986) ont démontré que le bépridil se fixait sur la TnC. Des expériences en résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que le bépridil se fixait sur la TnC saturée en Ca^{2+} (Fig. 21b), et ne possédait qu'une affinité négligeable pour cette protéine en absence de Ca^{2+} (MacLachlan et coll., 1990). Les changements conformationnels de la TnC sont par conséquent nécessaires à la fixation du bépridil. Pour la TnC squelettique rapide, ces changements conformationnels sont provoqués par la fixation du Ca^{2+} sur le site I (cf. paragraphe II, 1, c, γ). Il en va autrement pour l'isoforme lente, ne présentant pas de site I fonctionnel : l'ouverture de la protéine est forcée

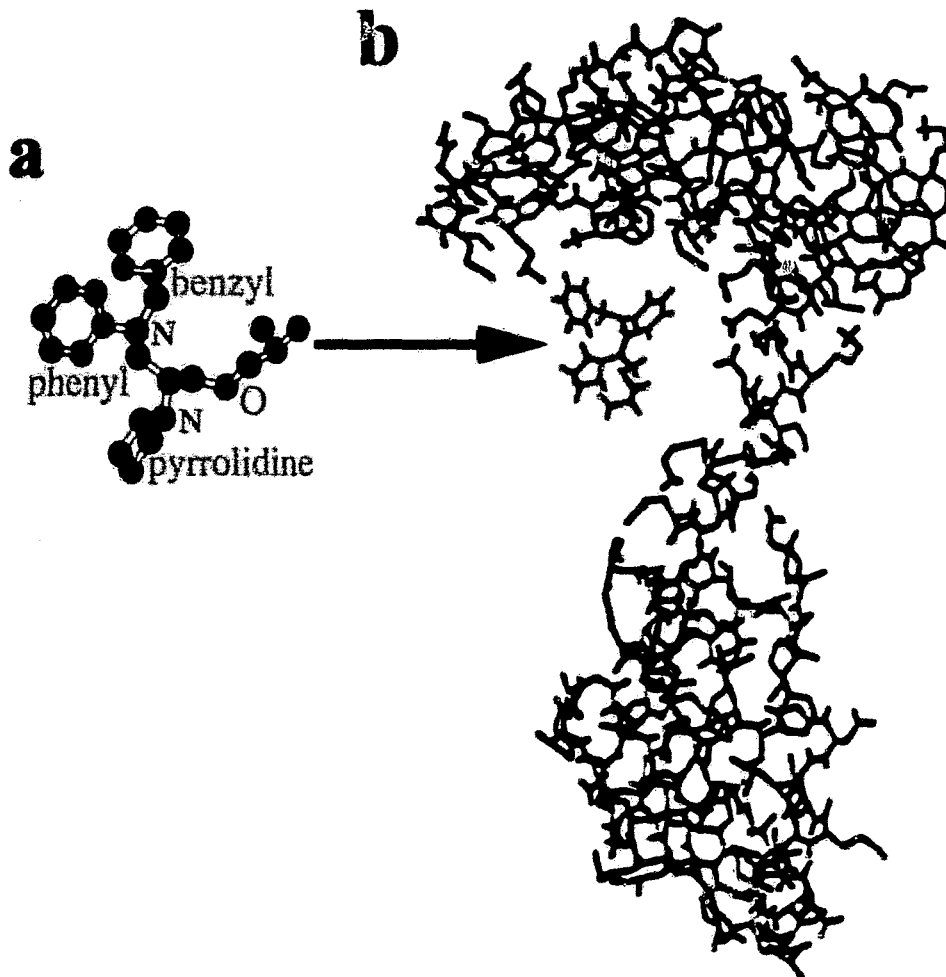


Fig. 21 : Structure du bépridil et localisation du site d'interaction avec la TnC.

a : structure moléculaire polycyclique du bépridil

b : Schématisation grossière du site d'interaction [bépridil - TnC] (d'après MacLachlan et coll., 1990). Une localisation plus précise des interactions TnC - bépridil est représentée à la figure 22.

par l'association TnC - TnI en présence de Ca^{2+} (Li et coll., 1999). Cependant, il a été démontré récemment qu'en présence de Ca^{2+} , le bépridil pouvait induire une ouverture du domaine aminoterminal de l'isoforme cardiaque (i.e. lente) de la TnC (Fig. 22d, Li et coll., 2000).

La conformation ouverte du domaine régulateur présente des patches hydrophobes (Gariépy & Hodges, 1983 ; Drabikowski et coll., 1985). La localisation précise du (ou des) site(s) de fixation dans le domaine aminoterminal a été étudiée en RMN (Kleerekoper et coll., 1998 ; Li et coll., 2000). Il existe trois sites de fixation sur lesquels le bépridil peut se fixer de manière non covalente (Bép 1, Bép 2 et Bép 3, cf. Tableau 4). Le premier concerne des acides aminés situés exclusivement dans la partie amino-terminale, tandis que les deux autres concernent à la fois le domaine aminoterminal et le domaine carboxyterminal. Ces deux derniers sites ne peuvent cependant pas jouer un rôle dans l'effet sensibilisateur calcique du bépridil, car ils sont aussi impliqués dans la liaison à la TnI : le bépridil ne peut donc pas se fixer sur ces sites en présence de Ca^{2+} et de la TnI (Li et coll., 2000). Le site "Bép 1" représente donc le site de liaison le plus probable.

Bases de l'effet sensibilisateur – La fixation du bépridil (Fig. 22d) stabiliserait la conformation ouverte de la protéine, s'opposant aux interactions hydrophobes intraprotéiques qui tendent à maintenir le domaine aminoterminal dans une conformation fermée. Des études cinétiques d'association-dissociation du complexe [TnC - Ca^{2+} - bépridil] ont été effectuées en fluorescence (MacLachlan et coll., 1990 ; Smith & England, 1990). En présence de bépridil, la constante de dissociation du Ca^{2+} des sites régulateurs est réduite, tandis que la constante de dissociation du Ca^{2+} des sites carboxyterminaux n'est pas affectée. Cette réduction de la constante de dissociation entraîne une augmentation de l'affinité calcique apparente ; $100 \mu\text{M}$

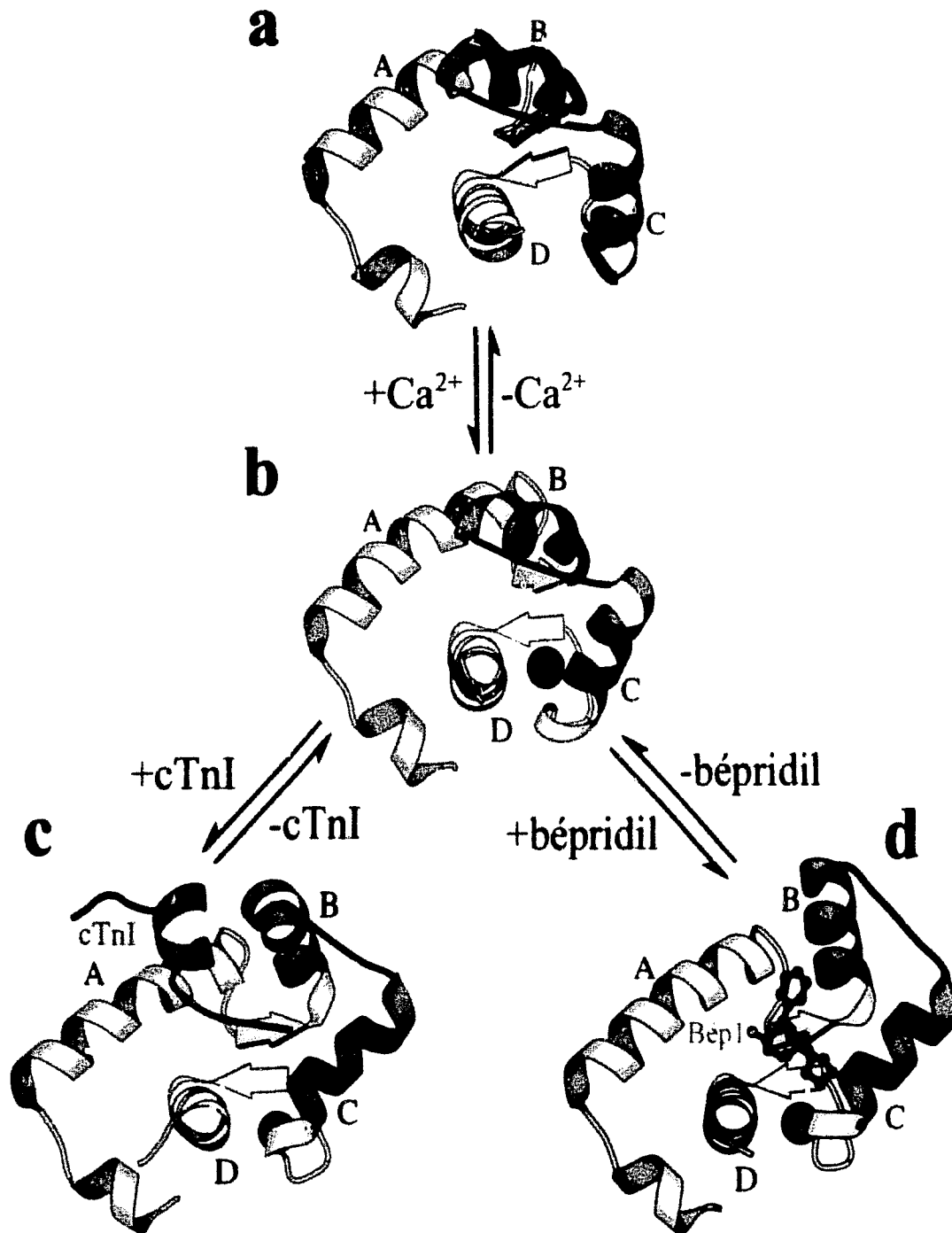


Fig. 22 : Représentation du mécanisme séquentiel d'ouverture du domaine amino-terminal de la TnC cardiaque par la séquence 147 - 163 de la TnI cardiaque ou par le bépridil.

Le lobe amino-terminal de la TnC cardiaque est représenté **a**) en absence de Ca^{2+} sur le site II, **b**) en présence de Ca^{2+} (point violet) dans le site II, **c**) en présence du fragment 147 - 163 de la TnI cardiaque (cTnI), équivalant au domaine 115 - 131 de la TnI squelettique, et **d**) en présence du bépridil. Les ions Ca^{2+} sont représentés sous la forme de sphères violettes. Les régions charnières, représentées en rouge, apparaissent en jaune lorsque leur conformation est modifiée (d'après Li et coll., 2000).

Molécule	Région	Résidus
Bép 1	lobe Nt	F27, I36, L41, V44, M45, L48, M60, I61, V64, V72, F77, M80, M81, S84
Bép 2	lobe Ct	E96, L97, L100
	lobe Nt	F20, A23, I26, F27, F77, M81
	lobe Ct	L100, F104, I112, L117, M120, L136, F153, F156, M157
Bép 3	lobe Nt	M45, M50, P52, E56, M60
	lobe Ct	E96, D99, L100, R102, M103

Tableau 4 : Résidus de la TnC impliqués dans l'interaction avec le bépridil (contacts < 4.5 Å). Nt : amino-terminal ; Ct : carboxy-terminal ; A : alanine ; E : acide glutamique ; F : phénylalanine ; I : isoleucine ; L : leucine ; M : méthionine ; P : proline ; R : arginine ; S : sérine ; V : valine (D'après Li et coll., 2000).

de bépridil produisent une augmentation de 4 fois de l'affinité du site II de la TnC (Solaro et coll., 1986).

Spécificité – Le bépridil n'a pas d'effet sur les cinétiques de contraction, caractérisées par le paramètre k_{tr} , constante de re-développement de tension (Brenner, 1988), aussi bien à des niveaux de tension sous-maximales qu'à des niveaux de tension maximales. Ces données suggèrent que le bépridil n'a pas d'effet direct sur les ponts actine-myosine (Wahr & Metzger, 1999). Ces auteurs ont montré par ailleurs que le paramètre V_{max} , vitesse maximale de contraction, et la relation force-vitesse n'étaient pas modifiés en présence de bépridil. Le bépridil induit donc spécifiquement une augmentation de l'affinité calcique de la TnC, augmentant ainsi la transition de l'état "blocked" à l'état "off" du filament fin (Wahr & Metzger, 1999).

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Deux espèces animales ont été retenues dans le cadre du présent travail : le rat et le singe Rhésus. Des rats ont été soumis à des conditions de microgravité simulée, tandis que des singes ont subi des conditions de microgravité réelle ou d'immobilisation au sol.

1 - SINGE (MACACA MULATTA)

Dans le cadre de l'expérience internationale BION 11, onze singes, d'un poids moyen de 3.7 à 4.8 kg, ont été sélectionnés. Des biopsies de triceps ont été prélevées sur ces animaux contrôles (Cont) 5 mois avant le vol spatial, réalisé en janvier 1997. Trois groupes ont ensuite été constitués à partir des 11 singes Cont :

- un premier groupe "Flight" (n = 2 singes) a subi 14 jours de vol spatial dans le bio satellite BION 11,
- un deuxième groupe "Growth" (n = 4) a été sélectionné pour évaluer un éventuel "effet croissance" sur les résultats, 5 mois séparant la sélection initiale du vol spatial.
- un troisième groupe "Immo" (n = 3) a été soumis au sol à une immobilisation, réalisée dans une capsule où les conditions de vol (sons, température, etc.) ont été artificiellement simulées. Ces animaux ont été immobilisés dans un siège, et la partie supérieure de leur bras droit était maintenue près du corps. Le but de cette immobilisation du bras, concernant aussi bien le groupe Immo que le groupe Flight, était d'obliger les animaux à accomplir différentes tâches avec leur bras gauche pour enregistrer l'activité électromyographique (EMG) résultante. Le bras droit des singes Flight était donc soumis à la fois aux conditions d'immobilisation et de microgravité réelle.

2 - RATS (*SOUCHE WISTAR*)

Des rats mâles d'un poids moyen de 300 grammes ont été sélectionnés. Les muscles soleus, gastrocnemius et tibialis anterior ont été prélevés sur des rats contrôles (Cont) et sur des rats soumis au modèle de microgravité simulée. Ces rats ont été suspendus pendant 14 jours, selon le modèle de Morey (Morey et coll., 1979). A l'aide d'un sparadrap, la queue de l'animal est attachée à une potence, de sorte que ses pattes postérieures ne supportent plus le poids de son corps. Cette technique permet au rat de se déplacer librement sur ses pattes antérieures et d'avoir accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Ce modèle permet de mimer les effets de la microgravité, notamment un déplacement vers la partie thoraco – céphalique des liquides de l'organisme, ainsi qu'un état d'hypodynamie / hypokinésie affectant les pattes postérieures. Dans la suite de l'exposé, les muscles ou les fibres musculaires issues de ces animaux seront dénommés "Susp".

3 - *MUSCLES ETUDIÉS*

Chez le singe, seul le triceps brachii (caput medialis) a été étudié. Ce muscle du membre antérieur est un extenseur de l'avant bras, et possède l'avantage de présenter une hétérogénéité dans sa composition en fibres. Il comporte en effet :

- des fibres lentes à fonction posturale, dans la partie attenante à l'humérus,
- des fibres rapides à fonction exclusivement motrice,
- des fibres hybrides en proportions non négligeables (i.e. coexprimant les myosines lentes de type I et rapides de type II).

Les biopsies ont été obtenues dans la partie profonde de la zone médiane du muscle. Dans des conditions normales, cette partie contient une majorité de fibres lentes, ce qui a été vérifié par le Dr. D. Desplanches (Lyon). En utilisant la technique de coloration ATPasique, il a été montré que les muscles prélevés sur les 11 singes Cont étaient constitués en moyenne

88.33 ± 3.45 de fibres lentes (73 à 99 %). Plus particulièrement, les biopsies des 2 singes ayant volé dans l'espace par la suite étaient constituées de 82.4, 14.8, 2.8 et 88, 10, 2 % de fibres de type I, IIa et IIb, respectivement.

Chez le rat, les muscles soleus, gastrocnemius et tibialis anterior ont été prélevés (Fig. 23). Le typage histochimique (coloration ATPasique) de chacun de ces muscle est reporté dans le Tableau 5. *Le soleus* assure l'extension de la cheville (ou flexion plantaire). C'est un muscle lent, impliqué dans le maintien de la posture, et résistant à la fatigue. L'étude des fibres de ce muscle sera privilégiée dans notre travail car sa fonction est directement altérée par les conditions d'hypodynamie / hypokinésie induites par la suspension (Gardetto et coll., 1989 ; Stevens et coll., 1990).

Le tibialis anterior est un muscle rapide, fléchisseur de la cheville et antagoniste du soleus.

Le gastrocnemius assure l'extension de la cheville. Un chef de ce muscle possède en outre une fonction de type posturale. Il est composé de trois parties histochimiquement distinctes (les parties rouge, mixte et blanche). La composition en MHC de ces trois parties est détaillée dans le tableau 5. Les prélèvements ont été effectués dans la partie blanche du gastrocnemius (Fig. 23b), qui contient essentiellement des fibres de type IIb.

4 - PRELEVEMENTS

Singes - Les prélèvements ont été réalisés à l'IPEM (Institut des Problèmes Biologiques et Médicaux, Moscou) par l'équipe de chirurgiens de la NASA. Les singes sont anesthésiés par une injection intramusculaire de kétamine (Kétamine-HCl, 10 mg.kg⁻¹), l'anesthésie étant maintenue par de l'isoflurane gazeux (1.25 %) dans de l'oxygène pur délivré par une sonde oro-trachéale. Les biopsies sont effectuées dans la partie profonde du triceps (attenante à l'humérus).

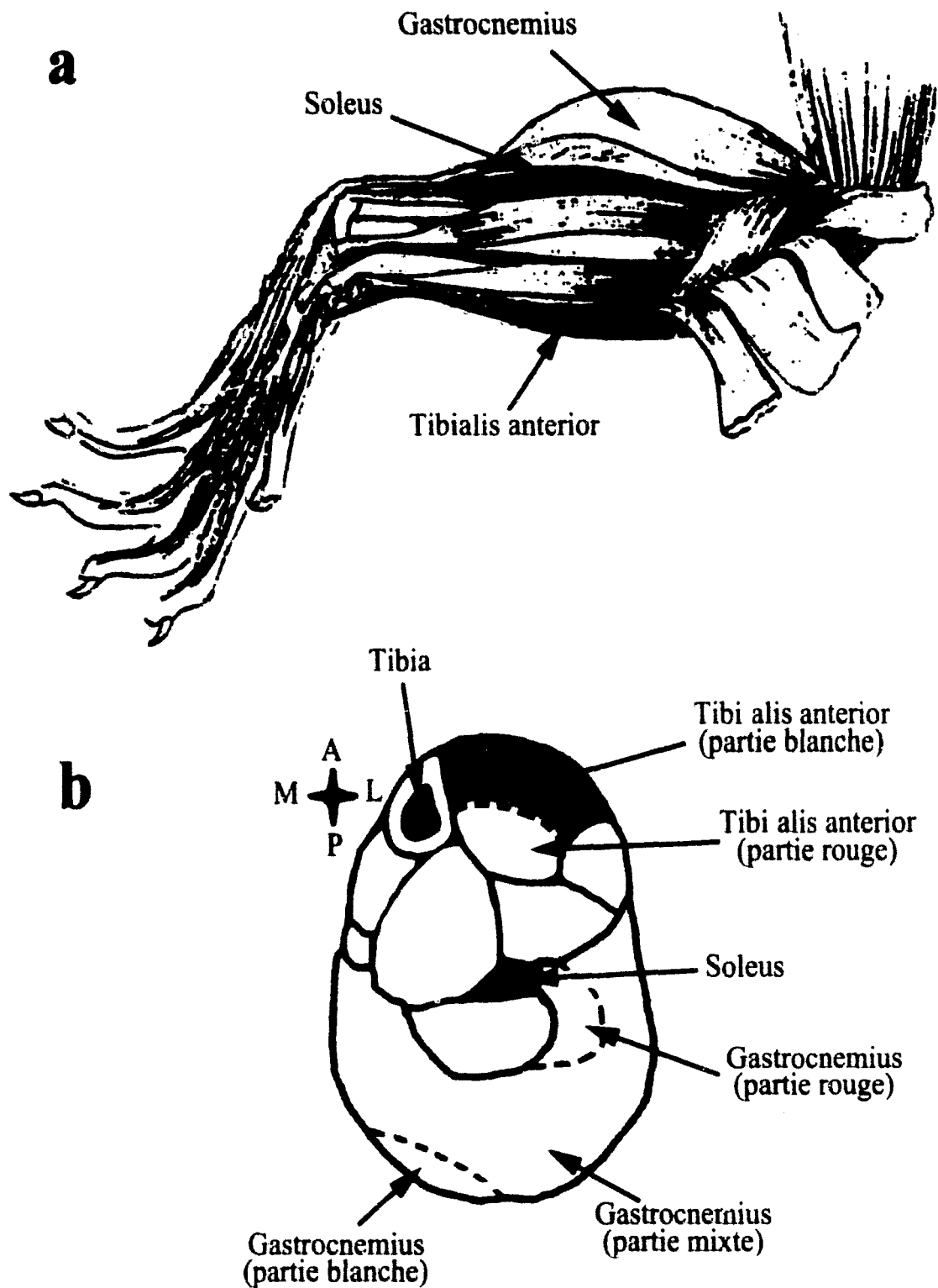


Fig. 23 : Anatomie de la patte postérieure du rat.

a : écorché de la patte (d'après Green, 1968)

b : coupe transversale de la patte (d'après Armstrong & Phelps, 1984).

	<i>Soleus</i>	<i>Tibialis anterior</i>		<i>Gastrocnemius</i>		
		Partie rouge	Partie blanche	Partie rouge	Partie mixte	Partie blanche
I	84 ± 6	7 ± 2	2 ± 1	51 ± 4	3 ± 2	0
IIa	7 ± 0	30 ± 3	18 ± 5	35 ± 3	6 ± 1	0
II d/x	9 ± 6	37 ± 7	34 ± 2	13 ± 7	34 ± 7	8 ± 4
IIb	0	26 ± 1	46 ± 8	1 ± 1	57 ± 8	92 ± 4

Tableau 5 : composition en chaînes lourdes de myosine des muscles de rat considérés dans ce travail. La composition des chefs étudiés figure en grisé (D'après Delp & Duan, 1996).

Rats - Les rats Cont ou Susp sont anesthésiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (3 mg.kg^{-1}). Les muscles soleus, tibialis et gastrocnemius lateralis sont prélevés avant de sacrifier les animaux par dose létale d'anesthésique.

5 - TRAITEMENT DES BIOPSIES

Une fois prélevées, toutes les biopsies sont découpées en faisceaux selon l'orientation longitudinale des fibres, et soumises au protocole de pelage.

II. DETERMINATION DES RELATIONS TENSION / pCa (T/pCa)

1 - PROTOCOLE DE PELAGE

Le "pelage" d'une fibre musculaire isolée permet d'avoir libre accès aux protéines contractiles et régulatrices. Il implique donc l'élimination des membranes (sarcolemme) qui maintiennent une cohésion forte entre les fibres. Cette technique présente deux intérêts majeurs : elle permet de s'affranchir de la commande motrice (l'activation se faisant par application externe de Ca^{2+}), et permet une analyse du contenu protéique d'une cellule unique. Le pelage des fibres peut s'effectuer de manière "mécanique" (le sarcolemme est enlevé à l'aide d'aiguilles), cette technique convenant particulièrement aux fibres de gros diamètre. Le pelage "chimique", consistant à hyper perméabiliser les membranes, présente l'avantage supplémentaire de traiter simultanément l'ensemble des fibres, et l'isolement ultérieur d'une fibre, quelle que soit sa position, est grandement facilité. Cette technique est plus adaptée aux fibres de petits diamètres, comme les fibres de mammifères (Wood et coll., 1975). Pour cela, les biopsies sont traitées par une solution contenant de l'EGTA (Ethylène Glycol N, N, N', N' tétra-acétique). En chélatant le Ca^{2+} , ce composé va déstructurer les membranes et le système tubulaire transverse sans altérer les protéines contractiles sous-jacentes (Eastwood et coll., 1979), et

sans modifier la sensibilité calcique des protéines (Reuben et coll., 1977) qui seront ainsi accessibles. Le protocole de pelage utilisé (Mounier et coll., 1989) est dérivé de la technique de Wood et coll. (1975).

Les biopsies fraîchement prélevées sont immédiatement placées dans une solution relaxante (R) à 4°C, contenant 5 mM d'EGTA. Quatre heures plus tard, les biopsies sont rincées, puis replacées dans le R pour une durée totale de traitement de 24 heures. Les biopsies sont ensuite placées dans une solution de conservation C contenant du glycérol et de la leupeptine. Le glycérol permet une conservation des biopsies à -20°C, et la leupeptine empêche une perte de force pouvant survenir par dégradation des protéines, sans avoir d'effet sur l'activation calcique des fibres traitées (Kasuga & Umazume, 1990). Les biopsies sont ainsi conservées jusqu'à deux mois.

2 - ISOLEMENT DES FIBRES

L'isolement des fibres s'effectue sous loupe binoculaire (x 80), avec des pinces fines. Une fibre est isolée de la biopsie (6 à 8 mm). Un fil de soie (Sherwood Medical, St Louis, USA) est noué à chaque extrémité d'un segment de 2 à 2.5 mm. Ceci permet de monter la fibre dans une cuve expérimentale contenant une solution R, entre une pince fixe et un capteur de force (Fort 10, WPI, Aston, Angleterre). Un système d'aspiration sous vide permet l'évacuation des solutions de la cuve expérimentale. Le diamètre de la fibre est déterminé à l'aide d'un micromètre intégré à l'oculaire. La longueur des sarcomères est déterminée à l'aide d'un faisceau laser Hélium / Néon perpendiculaire à l'axe de la fibre (Fig. 24). En traversant la fibre, ce faisceau est diffracté par les sarcomères, dont l'arrangement caractéristique est assimilable à un réseau de fentes. Les bandes de diffraction de premier ordre sont visualisées sur un écran calibré placé derrière la fibre, et permettent la lecture directe de la longueur de sarcomère de repos. La fibre est ensuite étirée à 120 % de sa longueur de sarcomère de repos,

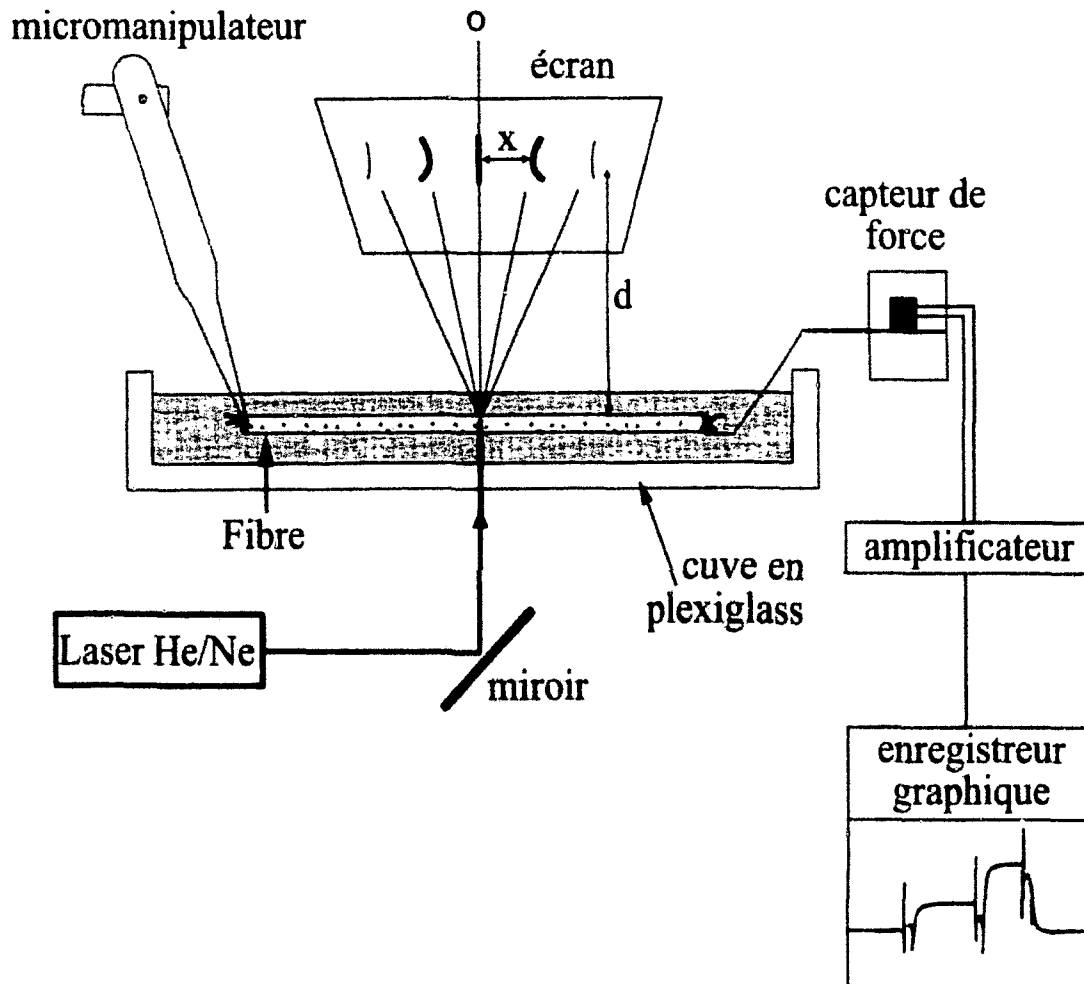


Fig. 24 : Schéma du dispositif de montage d'une fibre musculaire pelée et du dispositif de mesure de la longueur de sarcomère.

La longueur de sarcomère est donnée par l'équation : $LS = \frac{\lambda}{\frac{\sqrt{d^2 + x^2}}{x}}$, avec LS : longueur

de sarcomère, λ : longueur d'onde (632 nm), d : distance entre la fibre et l'écran et x : distance entre le centre de l'écran et la première frange de diffraction (Modifié d'après Goubel & Lenseil-Corbeil, 1998).

ce qui assure un chevauchement des myofilaments d'actine et de myosine permettant le développement d'une force isométrique optimale.

Enfin, pour éliminer un éventuel effet du réticulum sarcoplasmique (RS) sur les paramètres d'activation calcique, la fibre est soumise à un traitement au Brij 58 (2 % dans la solution R). Le Brij est un détergent cétonique non ionique, qui élimine irréversiblement la capacité du RS à emmagasiner et à relarguer du Ca^{2+} , sans altérer le système contractile (Orentlicher et coll., 1974).

Les solutions de la cuve expérimentale sont agitées en permanence pour faciliter l'accès et l'homogénéisation des solutés au sein de la fibre.

3 - ENREGISTREMENT DES TENSIONS ISOMETRIQUES

Le capteur de force permettant de détecter des tensions isométriques est relié à un amplificateur (10 V/g). Les tensions sont ensuite transcrites sur un enregistreur graphique (Gould, modèle 6120). L'activation des fibres s'effectue par des solutions de concentrations calciques croissantes. Pour éliminer toute trace d'EGTA issue de la solution R, la cuve est rincée avec une solution de rinçage W. On applique ensuite une solution de pCa (avec $\text{pCa} = -\log[\text{Ca}^{2+}]$) ou pSr (avec $\text{pSr} = -\log[\text{Sr}^{2+}]$) donnée. Une fois la tension P résultante stabilisée, on applique une solution saturante en calcium (pCa 4.2) ou en strontium (pSr 3.4). Ce protocole (cf. Fig. 19) permet de normaliser les tensions sous-maximales P à la tension maximale P_0 que la fibre peut développer. Ceci permet de s'affranchir de la variabilité possible de la P_0 d'une fibre à l'autre et de la perte de force éventuelle qui survient progressivement au cours des activations successives. Cette perte de force se produit naturellement en raison des contraintes mécaniques (déstructuration) consécutives aux activations maximales répétées, mais aussi en raison de l'action de la CANP (Ca^{2+} Activated Neutral Protease), protéase activée par le Ca^{2+} qui pourrait rester dans la cellule malgré le

pelage (Kasuga & Umaume, 1990). Le rapport P/P_0 est établi pour des concentrations calciques allant de pCa 7.0 à pCa 4.2 (pSr 6.2 à pSr 3.4), avec un pas de 0.2 unité pCa. Les tensions normalisées P/P_0 sont reportées en fonction de la pCa, pour constituer les relations Tension / pCa (et Tension / pSr), établies en absence et en présence de 100 μ m de bépridil.

4 - EXPRESSION DES RESULTATS

La sensibilité et l'affinité de la machinerie contractile seront respectivement déterminées par le seuil d'activation et le critère pCa_{50} . La coopérativité au sein des myofilaments sera évaluée par les deux coefficients de pentes (coefficients de Hill n_1 et n_2 , Fig. 25). Un seul coefficient de Hill (n_H) est utilisé lorsque les courbes sigmoïdes sont symétriques par rapport au point P correspondant à la pCa_{50} . Cependant, Moss et coll. (1983) ont montré que la détermination de 2 coefficients (n_1 pour $P/P_0 > 50\%$ et n_2 pour $P/P_0 < 50\%$) permet une meilleure adéquation des points expérimentaux avec la courbe théorique décrite par l'équation de Hill lorsque la sigmoïde n'est pas régulière.

En présence de bépridil, nous avons défini deux paramètres permettant de quantifier i) l'effet de cette drogue sur l'affinité calcique du système contractile et ii) l'effet sur la coopérativité au sein des myofilaments. Ainsi, l'amplitude du renforcement de l'affinité calcique est obtenue par le paramètre Δ_{50} , égal à la différence entre la pCa_{50} obtenue en présence de bépridil et la pCa_{50} obtenue en absence de bépridil (Fig. 25). L'effet du bépridil sur la coopérativité est évalué par le paramètre Δ_{90-10} ($\Delta_{90} - \Delta_{10}$) : la coopérativité en présence de bépridil est d'autant moins affectée que le paramètre Δ_{90-10} est proche de zéro (Fig. 25).

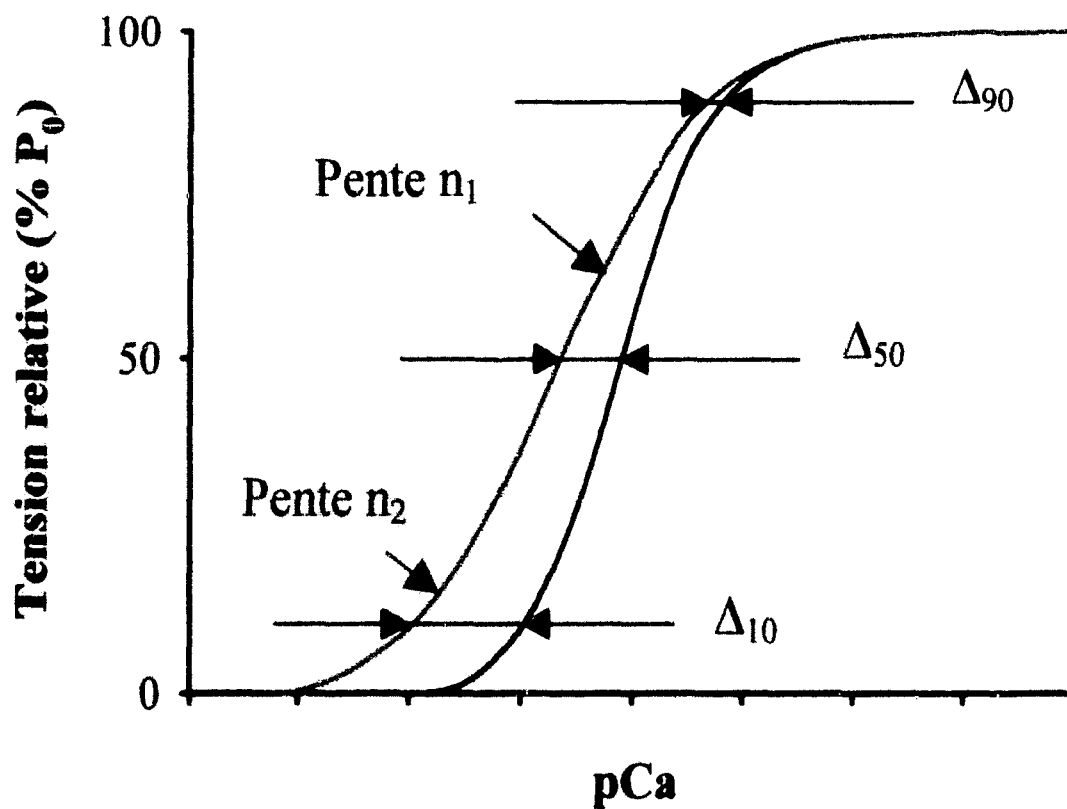


Fig. 25 : Détermination des deux coefficients de Hill n_1 ($P/P_0 > 50\%$) et n_2 ($P/P_0 < 50\%$), ainsi que la quantification du déplacement de la relation T/pCa en présence de bépridil (Δ_{10} , Δ_{50} et Δ_{90}).

5 - CRITERES FONCTIONNELS DE DISTINCTION ENTRE FIBRES LENTES ET RAPIDES

La méthode employée pour discriminer les fibres lentes des fibres rapides se base sur les différences d'activation de ces deux types de fibres vis à vis du strontium (Fig. 20). Il a en effet été démontré que les fibres lentes possédaient une affinité au Ca^{2+} et au Sr^{2+} quasiment identiques, à la différence des fibres rapides, qui ont des relations T/pCa et T/pSr très décalées (Kerrick et coll., 1980). Pour toutes les fibres étudiées, pour lesquelles la T/pSr n'a pas été déterminée entièrement, deux points pSr ont été judicieusement choisis dans la portion linéaire de la sigmoïde, de façon à pouvoir accéder à la pSr_{50} . Lorsque le paramètre Δ' ($\text{pCa}_{50} - \text{pSr}_{50}$) est inférieur ou égal à 0.3 unité pCa, la fibre est considérée comme lente, tandis qu'elle est considérée comme rapide lorsque ce paramètre Δ' est supérieur ou égal à 1.

6 - EXTRACTION / REMPLACEMENT DES TROPONINES C

Pour ces expériences, des fibres de 7 à 8 mm ont été isolées, et séparées en trois segments (Cont, Ext et Rec) de 2 à 2.5 mm. Le premier segment est immédiatement dissout dans un tampon de dissolution (cf. 7 - *Composition des solutions*), et sert de fragment contrôle (Cont). Chacun des deux autres fragments est monté dans une cuve expérimentale. T/pCa et pSr_{50} sont déterminés sur un des segments (Rec). Les deux segments Ext et Rec subissent ensuite un protocole d'extraction de leur TnC. D'une manière générale, les différentes procédures d'extraction sont dérivées du protocole de Cox et coll. (1981), et consistent à utiliser une solution de faible force ionique, pas ou peu tamponnée, et contenant uniquement de l'EDTA (Ethylène Diamine N, N, N', N' Tetra-Acétique). L'utilisation de l'EDTA permet de chélater les ions divalents, notamment le Mg^{2+} qui occupe les sites carboxy-terminaux de la TnC et qui sont responsables de l'ancrage de celle-ci sur le filament fin.

L'extraction de la TnC est plus ou moins difficile à réaliser selon les espèces animales (Hoar et coll., 1989), la température utilisée (Babu et coll., 1986), la présence ou non de tampon, et le pH de la solution d'extraction (Mess et coll., 1985). L'extraction de l'isoforme lente de la TnC est toujours plus ardue que l'extraction de l'isoforme rapide. Le protocole adopté dans le cadre du présent travail dérive de celui de Sheng et coll. (1990) : une solution d'extraction non tamponnée, à 2.5 mM d'EDTA a été utilisée à température ambiante, pour les deux types de fibres. La solution d'extraction est renouvelée toutes les 5 minutes pendant 15 à 20 minutes (cas des fibres rapides) ou jusqu'à 2h30 (cas des fibres lentes), de manière à obtenir une tension résiduelle comprise entre 5 et 10 % de la P_0 obtenue avant extraction. La quantité de TnC résiduelle est ensuite évaluée par immunoblot (cf. Section III *Analyse structurale*). Une tension résiduelle de 5 % est conservée, afin d'éviter d'éventuels problèmes inhérents à une extraction trop poussée.

Une TnC recombinante est ensuite substituée à la TnC endogène. Les fibres lentes de soleus ont été reconstituées avec de la TnC rapide de poulet (0.1 mg.ml^{-1}), tandis que des fibres de tibialis ont été reconstituées soit avec de la TnC cardiaque de souris (0.2 mg.ml^{-1} de R), soit avec de la TnC mutante "VG2" (1 mg.ml^{-1} de R). VG2 ne possède que le site I fonctionnel, le site II ayant été muté, mais peut néanmoins induire la contraction musculaire de fibres rapides (Sheng et coll., 1990). Toutes les fibres ont été incubées 10 minutes à température ambiante, quelle que soit la TnC employée. Des temps d'incubation plus longs ou des concentrations supérieures à celles employées n'améliorent pas l'amplitude des tensions reconstituées, évaluées par une pCa 4.2.

Une fois le protocole d'extraction – remplacement réalisé, les relations T/pCa et T/pSr ont été établies, en absence et en présence de $100 \text{ }\mu\text{M}$ bépridil.

7 - COMPOSITION DES SOLUTIONS

Les produits chimiques entrant dans la composition des solutions proviennent de Sigma Chemicals (St Louis, USA). La composition de toutes les solutions a été établie à l'aide du programme de Fabiato (1988), en utilisant les constantes d'association données par Orentlicher et coll. (1977) pour le Ca^{2+} , et par Moisescu & Thieleczeck (1979) pour le Sr^{2+} . La force ionique est fixée à 200 mM, le pH ajusté à $7,00 \pm 0,02$. La concentration en ATP est constante (2.5 mM), excepté pour la solution d'extraction.

La composition des solutions C, R et W (en mM) est donnée dans le tableau suivant (Tableau 6).

	Solution de pelage ou relaxante (R)	Solution de conservation (C)	Solution de lavage (W)
Propionate de potassium	170	170	185
Acétate de magnésium	2.5	2.5	2.5
K_2EGTA	5	5	-
MOPS	20	20	20
Glycérol		50 % (v/v)	

Tableau 6 : composition des solutions R, C et W.

Les solutions activatrices sont confectionnées à partir des mêmes composants que la solution W. Le calcium libre est tamponné par du K_2EGTA et du CaEGTA (ou SrEGTA) additionnés en proportions adéquates pour obtenir des concentrations comprises entre pCa 7.0 et pCa 4.2 (ou pSr 6.2 et pSr 3.4).

La solution mère de bépridil (20 mM) est préparée extemporanément aux manipulations en le dissolvant dans de l'éthanol, lequel n'exerce aucun effet propre sur l'activation aux quantités utilisées (Solaro et coll., 1986 ; données personnelles). La concentration finale dans les solutions activatrices pCa est de 100 μ M.

8 - ANALYSE STATISTIQUE

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leurs erreurs standard ($X \pm \text{ESM}$). Les différences sont estimées par :

- un test *t* de Student dans le cas de fibres appartenant à des groupes différents ;
- un test *t* de Student pour séries appariées dans le cas de fibres soumises à deux conditions différentes ;
- une ANOVA 2 dans le cas de la dose réponse.

Une probabilité $p \leq 0.05$ est considérée comme significative.

III. ANALYSE STRUCTURALE DES MUSCLES ET DES FIBRES MUSCULAIRES

Les isoformes des protéines musculaires contractiles et régulatrices des muscles entiers ou des fibres isolées ont été séparées par électrophorèses monodimensionnelles dénaturantes sur gels de polyacrylamide, selon deux méthodes :

- une méthode de séparation des isoformes lourdes de myosine (MHC) sur gel de 7.5 %, selon le procédé de Wada et coll. (1995);
- une méthode de séparation des isoformes légères de myosine (MLC) et des troponines (TnT, TnI et TnC) sur un gradient linéaire de 10-20 %, selon la méthode de Salviati et coll. (1982)

Les fibres musculaires isolées, testées ou non pour leurs propriétés d'activations par le Ca^{2+} ou le Sr^{2+} , sont dissoutes dans un eppendorf par 20 μl de tampon de solubilisation (62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 10 % glycérol (v/v), 2 % SDS (p/v), 5 % bleu de bromophénol (p/v)). L'échantillon est ensuite soumis à une température de 90°C pendant 3 minutes dans un bain-marie, ceci assurant une bonne solubilisation des protéines. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à l'analyse électrophorétique.

Les coupes de muscles entiers sont dissoutes dans une solution d'EDTA (6.34 mM, pH 7.0). L'échantillon est alors centrifugé à 13000 tours / mn pendant 10 mn à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec une solution de KCl 50 mM, puis dissout dans le tampon de solubilisation avant passage au bain-marie (90°C pendant 3 mn). La quantité de protéines est estimée grâce à la méthode de Lowry (1951). La conservation est également assurée à -80°C.

1 - ANALYSE DES MHC

Séparation - La séparation des isoformes lourdes de myosine (200 kDa) est assurée par migration sur un gel de concentration de 4.5 % et un gel de séparation de 7.5 % (Wada et coll., 1995). Le tampon de migration, dont la température est réglée à 12°C, est composé de 190 mM de glycine, 25 mM de Tris et 0.1 % SDS (p/v). La migration est réalisée pendant 24 h à voltage constant (180 V). L'intensité est de 10 mA dans le gel de concentration, et de 13 mA dans le gel de séparation (pour une plaque d'épaisseur de 0.75 mm). Pour le muscle entier, 1 μg de protéines est déposé par puits. Pour les fibres, la quantité déposée est calculée en volume de fibre et non en concentration de protéine, l'estimation par la méthode de Lowry étant rendue impossible par la faible quantité de certains échantillons, notamment les fibres Susp.

Coloration - Les gels MHC sont colorés par une solution d'argent ammoniacal, permettant la détection de 2 à 5 μg de protéines par puits. Après migration, le gel est fixé en deux étapes :

d'abord dans un bain contenant 50 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique, puis dans une solution à 5 % de méthanol et 7 % d'acide acétique. Il est ensuite transféré pour une nuit dans une solution de glutaraldéhyde (10 % v/v), qui améliore la rétention des protéines de faible poids moléculaire, notamment la LC3 et les TnC (Moss et coll., 1985). Des rinçages à l'eau pure (toutes les 20 mn pendant 3 h) assurent l'élimination de l'excès de glutaraldéhyde.

Les gels contenant des échantillons de fibres sont immergés 30 mn dans une solution à 5 µg / ml de dithiothreitol (DTT), à l'abri de la lumière. Ce procédé accentue la détection des protéines faiblement concentrées.

Les gels sont ensuite colorés pendant 20 mn à l'abri de la lumière dans une solution contenant 0.5 % (v/v) d'ammoniaque, 0.075 % (v/v) de soude et 0.8 % (p/v) de nitrate d'argent.

Après 5 rinçages d'environ 1 mn chacun, la révélation est initiée par un bain de citrate de sodium (0.5 % p/v) et de formaldéhyde (0.18 % v/v). La révélation est arrêtée par un bain d'acide acétique 1 % (v/v) pendant 5 mn. Le gel est ensuite photographié.

2 - ANALYSE DES MLC ET TROPONINES.

Séparation - La séparation des isoformes légères de myosines et des troponines est assurée par dépôt sur un gel de concentration à 5 % et un gel de séparation en gradient linéaire 10-20 % de 1.5 mm d'épaisseur (Salviati et coll., 1982). Le tampon de migration Tris / glycine, maintenu à 12°C, est identique à celui employé pour les MHC. La migration est réalisée pendant 8 h environ (correspondant à 1h30 de migration supplémentaire après la disparition du front de migration dans la cuve), à intensité constante (20 µA par plaque dans le gel de concentration et 26 µA par plaque de 1.5 mm dans le gel de séparation).

Coloration - Les protéines contenues sur le gel sont colorés de façon réversible par le Sypro Orange (Molecular Probes, Eugene, USA), qui permet la détection des différentes isoformes sous ultraviolet, et permet un transfert ultérieur des protéines, celles-ci n'étant pas fixées.

Après la migration, le gel est rincé pendant 10 mn dans le tampon de transfert (190 mM glycine, 25 mM Tris), puis coloré une heure dans 100 ml d'une solution de Sypro Orange (40 µl de Sypro concentré dans 100 ml de tampon de transfert). Après un rinçage d'une heure dans le tampon, le gel est placé sur une table UV (longueur d'onde 315 nm) et photographié à l'aide d'un film noir et blanc 100 ASA (Ilford Delta 100) avec un filtre photographique spécifique (Molecular Probes, Eugene, USA).

Transfert - Le transfert s'effectue sur une feuille de nitrocellulose de porosité 0.2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne), à voltage constant (60 V pendant 4 h), selon la méthode de Towbin et coll. (1979).

Après le transfert, les sites non spécifiques de la membrane sont saturés avec une solution de PBS (pH 7.4) contenant 5 % (p/v) de poudre de lait écrémé et 0.02 % (p/v) d'azide de sodium, pendant 2 h. La membrane est ensuite incubée durant une nuit avec un anticorps monoclonal anti TnC (NCI Trop-C, Novocastra). La membrane est ensuite rincée (3 x 15 mn dans du PBS), incubée avec un second anticorps marqué à la biotine (anti IgG de souris, Sigma B6398), rincée (3 x 15 mn dans du PBS), puis incubée avec un substrat extravidine / peroxidase (Sigma E8386, dilué au 1/500).

La détection est assurée par l'emploi d'un kit ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham, Little Chalfont, Angleterre). Les bandes ainsi détectées impressionnent un film ECL (Hyperfilm ECL, Amersham) dans une cassette autoradiographique. Le film est développé et fixé par des produits dédiés (Sigma).

3 - ANALYSE DENSITOMETRIQUE

L'intensité de la coloration est quantifiée par un densitomètre laser (GS-700 Imaging Densitometer, Biorad). Les proportions relatives des isoformes localisées suivant les données de la littérature ou des poids moléculaires (MLC), ou encore par anticorps sont alors

déterminées (pourcentage d'expression). Les proportions des différentes isoformes visualisées par chemiluminescence (issus des immunoblots) sont exprimées en pourcentage du signal total.

RESULTATS

I. PREMIERE PARTIE : EFFETS DU BEPRIDIL SUR LES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES : CARACTERISATION D'UN OUTIL PHARMACOLOGIQUE.

Les relations Tension / pCa reflètent les caractéristiques d'activation calcique de la machinerie contractile dans son ensemble.

Afin d'accéder au comportement de la troponine C via la relation Tension / pCa, il a fallu caractériser un outil pharmacologique, le bépridil (cf. Données bibliographiques, paragraphe III, 3b). Nous avons donc étudié son action sur les fibres lentes (soleus) et rapides (tibialis anterior et gastrocnemius), exprimant respectivement les TnC lentes et rapides.

Les résultats de cette étude ont donné lieu à la publication suivante : "Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles".



Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles

*¹P. Kischel, ¹L. Stevens & ¹Y. Mounier

¹Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

1 Bepridil (BPD) is a pharmacological compound able to bind to the Ca²⁺ sensor protein troponin C (TnC), which triggers skeletal muscle contraction upon Ca²⁺ binding. BPD can thereby modulate the Ca²⁺-affinity of this protein.

2 The Ca²⁺-sensitizing action of bepridil was investigated on slow and fast isoforms of TnC from skinned slow and fast skeletal muscle fibres, activated by either Ca²⁺ or Sr²⁺ ions.

3 Bepridil did not modify the Ca²⁺ maximal tension of slow and fast fibres, suggesting that binding of the drug to TnC did not induce a change in the number of α - β -bridges involved in maximal tension.

4 Sr²⁺ ions induced lower maximal tension than Ca²⁺ ions. However, in fast fibres, these lower Sr²⁺ maximal tensions could be reinforced by bepridil, suggesting an effect of bepridil on the function of site I of fast TnC.

5 Under submaximal tension, bepridil induced an increase in Ca²⁺ affinity of TnC in both slow and fast fibres. However, slow fibres were more drug reactive than fast fibres, and the increase in tension appeared to be modulated by the Ca²⁺ concentration.

6 Thus, bepridil exerted a differential effect on slow and fast fibres. Moreover, the results suggest that bepridil was more effective when activation conditions were unfavourable.

Keywords: Ca²⁺-sensitizers; bepridil; troponin C; skeletal muscles; skinned fibres

Abbreviations: BPD, bepridil; EGTA, ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether) N, N, N', N' tetraacetic acid; K Prop, potassium propionate; MgAc, magnesium acetate; MOPS, 3-(N morpholino) propanesulphonic acid

Introduction

Contraction of skeletal and cardiac muscle *in vivo* is elicited by a transient rise in the cytosolic calcium level. This variation is detected by the calcium sensor protein troponin C (TnC). This protein is one of the three subunits of the regulatory troponin complex (with TnI and TnT), regularly spaced along the thin filament composed of two actin and two tropomyosin strands.

Some pathologies, like heart failure, are characterized by a decrease in the contractile response. In this case, to improve muscular contraction, Herzig & Quast (1992) suggested that rather than raising intracellular Ca²⁺ concentration, with attendant danger of calcium overload, increasing Ca²⁺ sensitivity would be a more causative approach. This could be achieved by increasing the calcium affinity of TnC. This dumbbell shaped protein is composed of two heads, each including two Ca²⁺ EF Hand sites, linked by a central α -helix (Grabarek *et al.*, 1992; Farah & Reinach, 1995; Tobacman, 1996; for review). The two high affinity carboxy-terminal sites III and IV keep the TnC bound to the thin filament (Zot & Potter, 1982), while the two low affinity amino-terminal sites I and II regulate the muscular switch (Potter & Gergely, 1975). There are two TnC isoforms, with tissue dependent expression (Van Eerd & Takahashi, 1975). The slow isoform is expressed in slow skeletal muscles and in the myocardium (termed in this case the cardiac isoform), and has a defunct site I (Burtneck & Kay, 1977; Leavis & Kraft, 1978). In contrast, the two regulatory sites are functional in the fast isoform, which is expressed in fast skeletal muscles. Since the introduction of the Herzberg-Moult-James model, based on studies of fast TnC, it

has been established that calcium fixation on regulatory sites induced conformational changes at the origin of muscular contraction (Herzberg *et al.*, 1986).

Among various cardioactive compounds able to improve the Ca²⁺ affinity of TnC (called 'Ca²⁺ sensitizers'), bepridil (BPD) is a polycyclic molecule that can attach hydrophobic parts of TnC buried in close conformation ('apo' state), but accessible to solvent upon Ca²⁺ fixation. As a result, BPD is believed to stabilize the conformational changes, causing an increase in apparent affinity by decreasing the Ca²⁺ off-rate (Mac Lachlan *et al.*, 1990). This mechanism is believed to be the same whichever the target isoform, since slow and cardiac isoforms were expected to undergo an opening of the structure upon Ca²⁺ binding similar to that of fast TnC.

However, it has recently been demonstrated that site I was responsible for the great conformational change that occurred in fast skeletal TnC (Sia *et al.*, 1997), and that slow skeletal and cardiac TnC underwent much smaller changes of conformation because of their defunct site I (Spyracopoulos *et al.*, 1997). This gave particular significance to a comparative study of the functional effects of bepridil on slow and fast TnC in skinned fibres. Since many papers reported the effect of BPD on the cardiac muscle (Herzig & Quast, 1992; Solaro *et al.*, 1986), we decided to compare the functional effects of BPD on slow and fast skeletal muscles to check out the hypothesis of a differential action on the two structurally and functionally distinct TnC isoforms. Moreover, activation of slow and fast fibres was differently modulated by another divalent cation, strontium. Indeed, a much greater affinity of Sr²⁺ for slow fibres compared to fast fibres has previously been demonstrated (Kerrick *et al.*, 1980), the TnC isoform being the main

*Author for correspondence.

determinant in establishing such differential Sr^{2+} sensitivity (Balu et al., 1987). Therefore, the aim of this study was to examine the effects of BPD as a function of the TnC isoform activated by Ca^{2+} and Sr^{2+} ions.

Methods

Animals and muscle preparation

Experiments were performed on skinned fibres of soleus, gastrocnemius lateralis and tibialis anterior obtained from three adult male rats (IFFA CREDO, l'Arbresle, France) weighing about 310 g. According to myosin ATPase activity, the relative proportion of I, IIa, IIc and IIb fibres was, respectively: soleus: 84, 7, 9, 0; gastrocnemius lateralis: 0, 0, 8, 92 and tibialis anterior: 2, 18, 34, 46 (Delp & Duan, 1996). Moreover, the soleus and the gastrocnemius should be considered as muscles involved in position bearing. The experiments, as well as the maintenance conditions of the animals received authorizations from the Ministry of Agriculture and the Ministry of Education (veterinary service of health and animal protection, authorization 03805). The animals were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of pentobarbital sodium (3 mg kg^{-1}), and muscles were immediately removed, before the animals were euthanized with lethal i.p. injection of pentobarbital. After removal, the biopsies were immediately chemically skinned by exposure to a skinning solution (Mounier et al., 1989). This procedure permeabilized the sarcolemmic and transverse tubular membranes and allowed the application of activating solutions of various calcium concentrations (pCa, with $\text{pCa} = -\log[\text{Ca}^{2+}]$) directly to the contractile proteins. The skinned muscles were stored at -20°C in a 50/50 glycerol/skinning solution (storage solution) for up to 2–3 months (Wood et al., 1975). Protease inhibitor leupeptin was added to the storage solution ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) to prevent loss of contractile proteins and preserve the fibre tension (Reiser et al., 1988).

Solutions

All reagents were provided by Sigma (St Louis, U.S.A.). The composition of all solutions was calculated by the Fabiato computer program (Fabiato, 1974). The program calculation was used with stability constants listed for Ca^{2+} (Orentlicher et al., 1977) and for Sr^{2+} (Moisescu & Thieleczek, 1979), to keep final ionic strength at 200 mM. pH was adjusted to 7.0 and ATP at 2.5 mM was added in each solution. The skinning solution was made up of (mM) MOPS, 10; K Prop, 170; MgAc, 2.5; and K, EGTA, 5. The following solutions were used for the experimental procedure: a washing solution (W) composed of (mM) MOPS, 10; K Prop, 185; and MgAc, 2.5; a relaxing solution (R) identical to the skinning solution; pCa or pSr activating solutions consisting of W solution + various concentrations of free Ca^{2+} or Sr^{2+} from CaCO_3 or SrCl_2 , respectively, buffered with EGTA and added in proportions to obtain the different pCa values (7.0 to 4.2) or pSr values (7.0 to 3.0). In order to eliminate a hypothetical influence of the sarcoplasmic reticulum (SR) on the tension developed by the myofilaments, each fibre was bathed for 20 min at the beginning of an experiment in a Brij solution made up of R solution with 2% Brij 58 (polyoxyethylene 20 cetyl ether). The non-ionic Brij 58 detergent irreversibly eliminated the ability of the SR of skinned muscles to sequester and release Ca^{2+} , without altering the actomyosin system (Orentlicher et al., 1974).

Experimental protocol

For each experiment, a 2–2.5 mm single fibre segment was isolated from the skinned biopsy. A silk thread was tied at each extremity, allowing the mounting of the fibre in an experimental chamber with constant stirring, initially filled with R (Relaxing) solution. The fibre was held at one end by small fixed forceps and at the other end by a clamp connected to a strain-gauge (force transducer Fort 10 (World Precision Instruments), sensitivity 10 V/g). The mounted fibre was viewed through a high magnifying binocular ($\times 80$) with a micrometer, allowing fibre diameter measurements, assuming the cross-section was circular. Fibres with a high degree of ellipticity were discarded. The resting sarcomere length was measured by means of a Helium/Neon laser (Spectra Physics) directed perpendicular to the long axis of the fibre. Then, the fibre was stretched to approximately 120% of resting length to allow maximal isometric tension development upon ionic activation. The resulting sarcomere length ($2.6 \pm 0.04 \mu\text{m}$) was subsequently regularly controlled, and readjusted if necessary. The output of the force transducer was amplified and recorded on a graph recorder (Gould, model 6120) and simultaneously analysed by a computer software.

Force measurements

All experiments were performed in a thermostatically controlled room ($19 \pm 1^\circ\text{C}$). At the beginning of each experiment, a maximal tension (P_0) was induced by applying a pCa 4.2 solution that contained enough calcium to saturate all TnC sites. An experimental sequence was defined as follows: the fibre was bathed in W solution which eliminated EGTA traces from the previously applied R solution. Then, the fibre was activated at a level P in a given pCa (pSr) solution, immediately followed by a maximum contraction P_c ensured by pCa 4.2 (pSr 3.0) solution. This procedure allowed the calculation of the relative tension P/P_0 . Finally, the fibre was relaxed in R solution. For dose response determination, similar sequences were successively performed with 50, 100, 200, 400 and 800 μM BPD added in the pCa 6.0 solution. For the T/pCa (T/pSr) relationships determination, a unique sequence with 100 μM BPD in the previous pCa (pSr) solution was performed. A new set of P/P_0 determination was then defined (same pCa (pSr), with and without BPD), with a step ordinarily equal to 0.2 pCa units. A complete experiment included a series of sequences as described above from pCa 7.0 or 6.4 to 4.2 (for slow or fast fibres, respectively), and from pSr 7.0 or 5.8 to 3.0 (for slow or fast fibres, respectively). BPD was prepared fresh each day and used as a 20 mM stock solution in absolute ethanol. At concentrations used, ethanol itself had no effect on the developed tension. Fibres were rejected if force declined during a sustained contraction or decreased by more than 20% during the whole experiment, and if T/pCa and T/pSr series (with and without BPD) were not completely achieved. Data from three fibres at least were kept from each muscle biopsy. For dose response determination, fibres were removed from each soleus biopsy ($n=12$) or tibialis anterior biopsy ($n=12$).

Identification of fibre type

The criterion for functional fibre identification was based on the difference of Ca^{2+} and Sr^{2+} activation characteristics between fast and slow fibres (Leavis & Kraft, 1978). Indeed, it is generally assumed that fast muscle fibres are less sensitive to Sr^{2+} than slow fibres. T/pCa and T/pSr relationships

provided information about the affinity of the contractile apparatus for Ca^{2+} and Sr^{2+} , respectively. From these curves, pCa_{50} and pSr_{50} values (50% of maximal Ca^{2+} and Sr^{2+} tension responses, respectively) were deduced. The difference between pCa_{50} and pSr_{50} was used to functionally discriminate slow fibres ($\text{pCa}_{50} - \text{pSr}_{50} < 0.3$) and fast fibres ($\text{pCa}_{50} - \text{pSr}_{50} > 1$).

Two other important parameters could be extracted from the T/pCa relationship: the threshold for activation by Ca^{2+} as an indicator of the calcium sensitivity of the contractile system, and the steepness of the T/pCa which reflects the cooperativity between the different regulatory proteins within the thin filament. Fast type fibres could be distinguished from slow type ones by a higher Ca^{2+} threshold (lower pCa value) and a steeper T/pCa curve. The steepness of the T/pCa was determined by the Hill coefficients n_1 and n_2 , calculated according to the following equation (Brandt *et al.*, 1982): $P/P_0 = (([\text{Ca}^{2+}]/K)^{n_1}) / (1 + ([\text{Ca}^{2+}]/K)^{n_1})$, where P/P_0 is the normalized tension and K is the apparent dissociation constant ($\text{pK} = -\log K = \text{pCa}_{50}$). n_1 corresponded to $P/P_0 > 50\%$; and n_2 to $P/P_0 < 50\%$.

Moreover, to quantify the shift that occurred when bepridil was added to the activating solution, we defined a ΔX_n , where Δ represented the shift expressed in pCa (or pSr) units, X the nature of the activating ion, and n the percentage of relative tension at which Δ is determined. Thus, in our analyses, we measured ΔX_{10} , ΔX_{50} and ΔX_{90} , X being Ca^{2+} or Sr^{2+} .

Statistical analysis

All the data were reported as means \pm s.e.mean. The statistical significance of the difference between means was determined using the Student's *t*-test or paired *t*-test when data were obtained from the same fibre in different experimental conditions. Difference at or above the 95% confidence level were considered significant.

Results

Dose response

Dose response curves were determined for slow and fast fibres from the soleus and tibialis anterior, respectively (Figure 1). They were established at pCa 6.0. This concentration was chosen for two reasons. First, it caused the development of a tension the amplitude of which was similar in slow and fast fibres (around pCa_{50}), and secondly, it permitted a clear estimation of the tension reinforcement as it occurred in the presence of BPD. Figure 1A shows typical records of submaximal tensions obtained for the soleus muscle at pCa 6.0 followed by the maximal tension elicited in pCa 4.2 solution. Three records were presented and corresponded to tensions without (No BPD) and with two different BPD concentrations (100 and 800 μM). The amplitude of the submaximal tension was found to be increased in the presence of BPD and dependent on its concentration. In contrast, the maximal tension was similar without and with BPD. The curves in Figure 1B reported the dose response with BPD concentrations in the range 25–800 μM of fibres from slow (soleus) and fast (tibialis anterior) muscles. BPD induced larger reinforcement in fast fibres than in slow ones. From these curves we chose a concentration of BPD equal to 100 μM for all our other experiments since this concentration corresponded for both fibre types to approximately half the maximal effect obtained with 800 μM .

Calcium activation

The maximal isometric tension P_0 was recorded in the saturating pCa 4.2 solution (Table 1). Fast fibres from the tibialis anterior exhibited significant higher P_0 absolute values (in μN) than slow fibres from the soleus. When expressed per cross sectional area, fibres from both fast muscles showed identical normalized P_0 , which were significantly higher than those obtained for the slow soleus fibres. This was observed also in control conditions as well as in the presence of BPD. Moreover, for the three muscles, the P_0 values were not

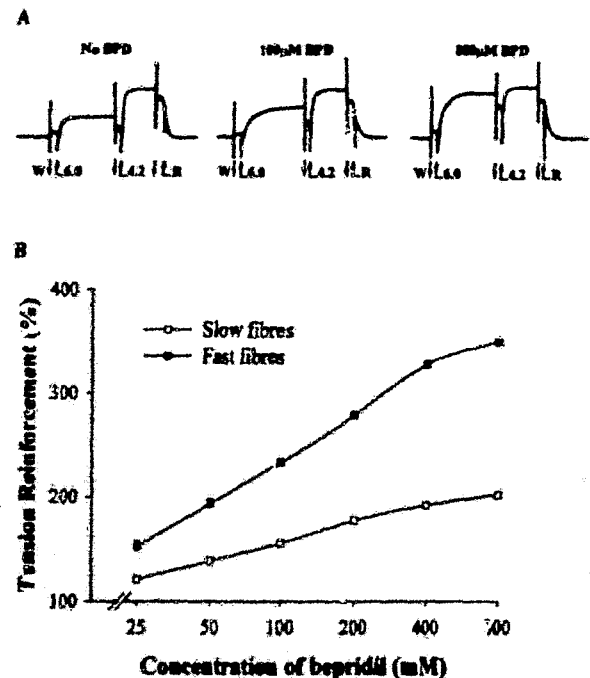


Figure 1 Effects of bepridil on Ca^{2+} activated force in skinned muscle fibres. (A) Submaximal contraction records obtained for the soleus muscle at pCa 6.0 followed by maximal tension elicited by pCa 4.2 solution. The records corresponded to tensions without (No BPD) and with 100 μM or 800 μM BPD. Fast transient peaks on the records and the transient shift of the base line were produced by the changes of the solutions. Upward arrows represented the application of a new solution, while downward arrows indicated withdrawal of the previously applied solution. (B) Tension reinforcement at pCa 6.0 as a function of drug concentration (logarithmic scale). The reinforcement was expressed relative to the tension at pCa 6.0 without BPD. Slow fibres ($n=12$, open squares) and fast fibres ($n=12$, filled squares) were obtained from the soleus and tibialis anterior, respectively. s.e.m. were not reported when they merged with the mean points.

Table 1 Effect of 100 μM bepridil on the P_0 characteristics of soleus, gastrocnemius and tibialis anterior fibres

	Soleus ($n=18$)	Gastrocnemius ($n=18$)	Tibialis ($n=18$)
$\text{pCa}_{50} - \text{pSr}_{50}$	0.25 ± 0.02	$1.21 \pm 0.01^*$	$1.22 \pm 0.01^*$
Diameter (μm)	85.0 ± 3.2	78.75 ± 2.7	87.1 ± 2.4
No P_0 (μN)	650.5 ± 58.3	757 ± 50.1	930.5 ± 51.1
BPD P_0 ($\text{kN}\cdot\text{m}^{-2}$)	115 ± 10.4	$156.8 \pm 9.9^*$	152.2 ± 9.9
With P_0 (μN)	650 ± 58.3	716.5 ± 39	874.5 ± 17
BPD P_0 ($\text{kN}\cdot\text{m}^{-2}$)	115.1 ± 10.5	$138.7 \pm 7.9^*$	$142.8 \pm 6.9^*$

n represented the number of fibres. *indicated significant difference between slow soleus fibres and fast fibres from either gastrocnemius or tibialis anterior. The type of each fibre was controlled by the value of the difference $\text{pCa}_{50} - \text{pSr}_{50}$.

modified by BPD, neither for the slow soleus muscle fibres nor for the fast gastrocnemius and tibialis anterior muscle fibres (Table 1).

The T/pCa relationships of the soleus, gastrocnemius and tibialis anterior muscle fibres were illustrated in Figure 2A, C and D, respectively. For the three muscles in control

conditions (without BPD), the curves exhibited classic profiles. Thus, pCa values for Ca activation threshold (Figure 2 and Table 2) were significantly higher for the slow soleus fibres (pCa 6.69) than for the fast gastrocnemius (pCa 6.41) or tibialis anterior fibres (pCa 6.36). The pCa₅₀ values were not significantly different for the soleus and gastrocnemius fibres

Table 2 Calcium, and strontium activation characteristics of 18 fibres from the three muscles, without (No BPD) and with 100 μ M BPD

		Soleus		Gastrocnemius		Tibialis Anterior	
		Ca ²⁺	Sr ²⁺	Ca ²⁺	Sr ²⁺	Ca ²⁺	Sr ²⁺
No BPD	pCa _{threshold}	6.69 ± 0.03	6.62 ± 0.07	6.41 ± 0.05**†	6.36 ± 0.06*	6.36 ± 0.02**†	6.40 ± 0.03*
BPD	pCa (Sr) ₅₀	5.89 ± 0.02†	5.64 ± 0.03	5.92 ± 0.03†	4.70 ± 0.04*	5.82 ± 0.03†	4.61 ± 0.04*
	n ₁	1.81 ± 0.10†	1.53 ± 0.06	2.53 ± 0.21**†	1.85 ± 0.13*	2.18 ± 0.07**†	1.76 ± 0.07*
	n ₂	2.39 ± 0.13†	2.04 ± 0.09	4.93 ± 0.42**†	3.51 ± 0.18*	4.01 ± 0.22**†	2.63 ± 0.10*
With BPD	pCa _{threshold}	7.20 ± 0.05§	7.15 ± 0.08§	6.64 ± 0.04**†§	5.67 ± 0.05*§	6.59 ± 0.02**†§	5.73 ± 0.06*§
	pCa (Sr) ₅₀	6.09 ± 0.03†§	5.89 ± 0.03§	6.07 ± 0.03†§	4.96 ± 0.03*§	5.96 ± 0.03**†	4.88 ± 0.03*§
	n ₁	1.44 ± 0.07§	1.29 ± 0.05	2.19 ± 0.15**†	1.67 ± 0.12*	2.14 ± 0.07**†	1.56 ± 0.05*
Δ	n ₂	1.79 ± 0.10†§	1.62 ± 0.09	4.03 ± 0.22**†	2.96 ± 0.11*	3.55 ± 0.20**†	2.55 ± 0.06*
	Δ _{1/10}	0.31 ± 0.01†	0.39 ± 0.01	0.19 ± 0.02**†	0.31 ± 0.01*	0.18 ± 0.01**†	0.29 ± 0.01*
	Δ _{1/50}	0.20 ± 0.01†	0.25 ± 0.02	0.14 ± 0.01**†	0.27 ± 0.01	0.14 ± 0.01**†	0.27 ± 0.01
	Δ _{1/90}	0.05 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.02†	0.24 ± 0.02*	0.09 ± 0.01†	0.23 ± 0.02*
	Δ _{1/90-10}	-0.26 ± 0.02	-0.26 ± 0.03	-0.11 ± 0.02*	-0.07 ± 0.03*	-0.09 ± 0.02*	-0.06 ± 0.02*

Δ represents the difference between two curves (with and without BPD) for a specific ion (X being Ca²⁺ or Sr²⁺) at the relative tension shown in indice. * Indicates significant difference between slow soleus fibres and fast fibres from either gastrocnemius or tibialis anterior. † Indicates difference between Ca²⁺ and Sr²⁺ activation of same muscle fibres (symbols reported on Ca²⁺ values) § Indicates significant difference between No BPD and With BPD conditions (symbols reported on 'With BPD' values).

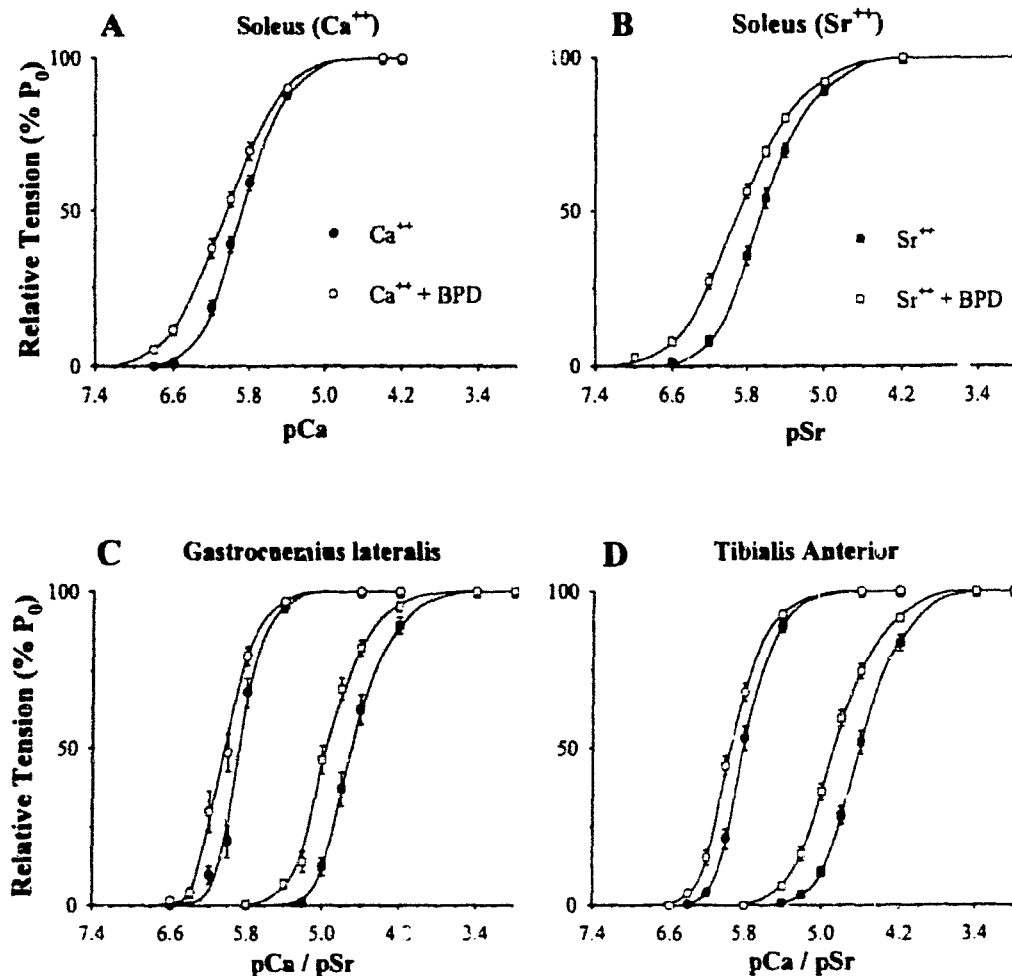


Figure 2 T/pCa and T/pSr relationships of single skinned fibres from soleus (A and B), gastrocnemius (C), and tibialis anterior (D). BPD was used at a concentration of 100 μ M. Curves were fitted with the Hill parameters (n₁ for P/P₀ > 50% and n₂ for P/P₀ < 50%).

and slightly lower for the tibialis anterior. The slopes of the curves (n_1 and n_2 parameters) were significantly higher for fast gastrocnemius or tibialis anterior than for slow fibres.

In the presence of BPD, the T/pCa relationships were shifted towards higher pCa values for the three muscles. However, the shift was significantly larger for the slow soleus fibres (Table 1: $\Delta_{C_{a,50}} = 0.20$) than for the fast gastrocnemius or tibialis anterior fibres ($\Delta_{C_{a,50}} = 0.14$ for both muscles).

Another difference between the sensitivity of slow and fast fibres to BPD was evidenced by the $\Delta_{C_{a,10}}$ and the $\Delta_{C_{a,90}}$ analysis (Table 1). In the slow fibres, there was a large difference between $\Delta_{C_{a,90}}$ and $\Delta_{C_{a,10}}$ values (-0.26 ± 0.02), which reflected a flattening of the T/pCa curve in the presence of BPD, as shown by the significantly lower n_1 and n_2 parameters, when compared with control values (No BPD). In the fast fibres, the difference between $\Delta_{C_{a,90}}$ and $\Delta_{C_{a,10}}$ values was lower and equal to -0.11 ± 0.02 and -0.09 ± 0.02 for the gastrocnemius and tibialis anterior, respectively, and the two T/pCa relationships (with and without BPD) appeared almost parallel. No significant differences were found for the n_1 and n_2 parameters of the curves established in the absence or in the presence of BPD.

Strontium activation

Maximal tensions P_0 were elicited using Sr^{2+} ions (pSr 3.4 or 3.0 solutions) instead of Ca^{2+} ions (pCa 4.6 or 4.2 solutions). However, these P_0 (Sr) tensions appeared significantly lower than the P_0 (Ca) ones, the decrease in force being equal to 7, 20 and 20% for the soleus, gastrocnemius and tibialis anterior, respectively (Figure 3). Addition of BPD did not modify the maximal P_0 (Sr) tension of the soleus muscle fibres, but limited the decrease in P_0 (Sr) to 13% for both gastrocnemius and tibialis anterior. In the three muscles, the T/pSr relationships were also established. In the control (No BPD) soleus muscle (Figure 2B and Table 2), the T/pSr relationship was shifted towards higher ionic concentrations (by 0.25 units) and exhibited lower steepness than the T/pCa curve, as shown by significantly decreased n_1 and n_2 parameters in the two fast muscles, when compared to the T/pCa relationships, the T/pSr curves were clearly shifted towards lower pSr values (by 1.21 units) and the Hill coefficients (n_1 and n_2) were more decreased

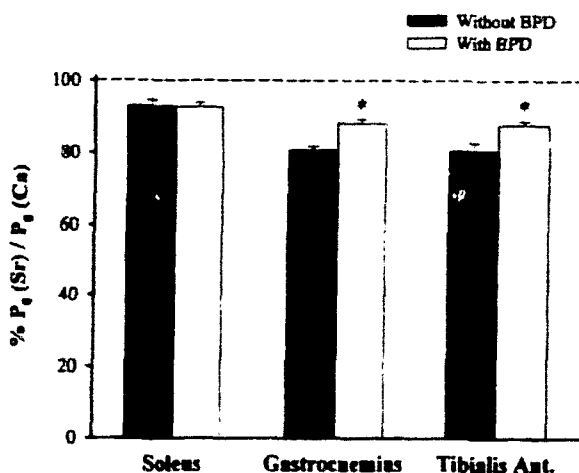


Figure 3 Amplitude of P_0 (Sr) relative to P_0 (Ca). The dashed line indicated P_0 (Ca) of each muscle taken as 100%. Amplitudes of tension elicited by Sr^{2+} ions were expressed relative to P_0 (Ca) in the absence (black bars) and presence (white bars) of $100 \mu M$ BPD. * Indicated significant difference between Sr and Sr+BPD activations.

than in the slow soleus fibres. As observed in the presence of Ca^{2+} , BPD induced a leftward shift of the T/pSr of both fibre types. However, when compared to $\Delta_{C_{a,50}}$, the difference $\Delta_{S_{r,50}}$ between the two curves (with and without drug) was significantly increased, by a factor 1.25 for the slow soleus fibres ($\Delta_{S_{r,50}} = 0.25$), and by a factor 1.9 for the gastrocnemius and the tibialis anterior ($\Delta_{S_{r,50}} = 0.27$). For the two fast muscles, the slopes of the T/pSr curves (n_1 and n_2 parameters) were not significantly different in the presence or not of BPD, and the two curves were almost parallel. On the contrary, for the slow fibres, BPD diminished the Hill coefficients n_1 and n_2 of T/pSr relationships, as shown above with Ca^{2+} activation ($\Delta_{C_{a,90,10}} = \Delta_{S_{r,90,10}} = -0.26$). Thus, BPD induced a modification in the slopes of slow fibres but not of fast ones.

Discussion

This study reported a comparison of the effects of bepridil on skinned fibres from slow and fast skeletal muscles. Moreover, we have attempted to clarify the possible mechanism of action of BPD on the two TnC isoforms using Ca^{2+} and Sr^{2+} as contractile activating ions.

Effects of BPD on Ca^{2+} and Sr^{2+} maximal tensions

As usually described, fast fibres (from gastrocnemius and tibialis anterior) developed higher maximal tensions P_0 than did slow soleus muscle fibres. Addition of the drug BPD, when Ca^{2+} was the activating ion, did not modify P_0 , whatever the fibre type. Thus, we believe that the effect of BPD did not imply variations in the maximal number of loaded Ca^{2+} sites. Therefore, the maximal number of attached myosin heads as well as the force developed for each cross-bridge were not modified in the presence of BPD.

Compared with Ca^{2+} , Sr^{2+} activation produced lower P_0 on fast as well as on slow fibres. This suggested that it was more difficult for Sr^{2+} to bind to the TnC amino-terminal low affinity sites. It has been previously demonstrated (Fuchs, 1974) that the affinity of TnC was related to the ionic radius of divalent activating cations, and that optimal radii were close to that of Ca^{2+} (about 1 Å). Thus, the radius of Sr^{2+} (1.12 Å) and chemical properties of Sr^{2+} such as hydration (Fuchs, 1971) should be limiting factors for TnC binding. Therefore, even high Sr^{2+} concentrations might not activate all the TnC sites, and P_0 (Sr) did not reach P_0 (Ca). This phenomenon was more pronounced on fast fibres (P_0 (Sr) = 80% of P_0 (Ca)) than on slow fibres (P_0 (Sr) = 92% P_0 (Ca)), and was most likely due to the number of regulatory binding sites of TnC. Indeed, unlike its slow counterpart, the fast skeletal isoform has a functional site I, which is necessary for protein function (Sheng *et al.*, 1990). Furthermore, this site was demonstrated to have a lower affinity than site II (Li *et al.*, 1997). Consequently, it was probably more difficult for Sr^{2+} to bind to the site I than to the site II, and therefore to activate simultaneously both available sites I and II than site II alone.

As described above for Ca^{2+} maximal activation, BPD did not induce any modification of the P_0 (Sr) values in slow fibres. On the contrary, in fast fibres, BPD increased P_0 (Sr), suggesting that more fast TnC molecules were activated. Since BPD was ineffective in tension reinforcement on slow fibres (with slow TnC lacking site I), this differential effect on slow and fast fibres might be attributed to the presence of site I and its lower binding capacity for Sr^{2+} than for Ca^{2+} ions. Thus, binding of BPD would decrease Sr^{2+} off-rate of site I, as was the case with Ca^{2+} (Mac Lachlan *et al.*, 1990). As a result, a

greater number of fast TnC were activated, and the decrease in P_0 in fast fibres was limited in the presence of BPD.

Effects of BPD on submaximal tensions

BPD reinforced the submaximal tensions and induced a leftward shift of the T/pCa relationships, on fast and on slow fibres. This increase in apparent affinity suggested that BPD had targeted both fast and slow TnC isoforms. Interestingly, the amplitude of affinity reinforcement (Δ_{50}) was greater on slow fibres expressing slow TnC (Van Eerd & Takahashi, 1975), as already described for another Ca^{2+} sensitizer, EMD 53998 (Barth *et al.*, 1995). This demonstrated that site I function was not required for optimal drug effects. Moreover, on these slow fibres only, the leftward shift induced by BPD was higher at low Ca^{2+} concentration ($\Delta_{10} = 0.31$) than at high Ca^{2+} concentration ($\Delta_{90} = 0.05$). This result would suggest that BPD had a greater effect under less favourable activation conditions. This opinion was further confirmed by the comparison of the position of the T/pSr and T/pCa relationships of both types of fibres: in the case of slow fibres, half maximal activation required 1.75 fold more Sr^{2+} than Ca^{2+} and the Δ_{Sr50} shift was 25% greater than Δ_{Ca50} . In the case of fast fibres, which needed 16 fold more Sr^{2+} than Ca^{2+} for half maximal activation, a 2 fold increase in Δ_{Sr50} vs Δ_{Ca50} was evidenced.

If we now consider the slopes of the T/pCa (T/pSr) with BPD, an additional differential effect of BPD between fast and slow fibres was noted. In fast fibres, the slopes of T/pCa (T/pSr) were not significantly different in the absence or presence of the drug. This suggested that BPD increased the

apparent affinity without disturbing cooperativity. On the contrary, in slow fibres, a large alteration of the slopes of T/pCa (T/pSr) was shown in the presence of the drug. This suggested a decrease in the cooperativity between the different regulatory proteins of the thin filament. If the target of BPD, TnC, is responsible for Ca^{2+} switch and cooperativity propagation (Gulati *et al.*, 1988), this protein represents only one link in the chain of the regulatory proteins. Thus, it could be proposed that the modifications induced by BPD probably resulted from integrated effects which are particularly pronounced within the slow myofibrillar lattice, (i) either from the signalling cascade downstream of the TnC, involving especially TnT, which is known to influence cooperativity (Nassar *et al.*, 1991), or (ii) from a feedback of cycling cross-bridges, which in turn have been demonstrated to increase TnC affinity (Zot & Potter, 1989). Further research will be necessary to determine the influence of nearby subunit isoforms involved in the regulatory process and the intrinsic role of TnC, in order to provide new insights into the pharmacological modulation of muscular contraction.

To summarize, these findings indicate that bepridil induced an increase in the affinity of the contractile system, which depended first, on the fibre type, and second, on the activating cation. The BPD effect appeared all the more important as the activation of TnC was achieved with difficulty, justifying its pharmacological use as well in cardiac as in other muscle insufficiencies.

This work was supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES, grant n°982711), and by the Nord-Pas de Calais Regional Council.

References

- BABU, A., SCORDILIS, S.P., SONNENBLICK, E.H. & GULATI, J. (1987). The control of myocardial contraction with skeletal fast muscle troponin C. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5815–5822.
- BARTH, Z., STRAUSS, J.D., HEYDER, S., VAN EYK, J., WIESNER, R.J. & RUEGG, J.C. (1995). Ca^{2+} sensitizing effects of EMD 53998 after troponin replacement in skinned fibres from porcine atria and ventricles. *Pflügers Arch.*, **430**, 220–229.
- BRANDT, P.W., COX, R.N., KAWAI, M. & ROBINSON, T. (1982). Effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca^{2+} sensitivity. *J. Gen. Physiol.*, **79**, 997–1016.
- BURTINICK, L.D. & KAY, C.M. (1977). The calcium-binding properties of bovine cardiac troponin C. *FEBS Lett.*, **75**, 105–110.
- DELP, M.D. & DUAN, C. (1996). Composition and size of type I, IIa, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.*, **80**, 261–270.
- FABIATO, A. (1974). Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.*, **157**, 378–417.
- FARAH, C.S. & REINACH, F.C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.*, **9**, 755–767.
- FUCHS, F. (1971). Ion exchange properties of the calcium receptor site of troponin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **245**, 221–229.
- FUCHS, F. (1974). Chemical properties of the calcium receptor site of troponin as determined from binding studies. In: Drabikowski, W., Strzelecka-Golaszewska, H. and Corafoli, E., (eds) *Calcium Binding Proteins*, Elsevier: Amsterdam New-York Warsaw, pp 1–27.
- GRABAREK, Z., TAO, T. & GERGELY, J. (1992). Molecular mechanism of troponin-C function. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **13**, 383–393.
- GULATI, J., SCORDILIS, S. & BABU, A. (1988). Effect of troponin C on the cooperativity in Ca^{2+} activation of cardiac muscle. *FEBS Lett.*, **236**, 441–444.
- HERZBERG, O., MOULT, J. & JAMES, M.N.G. (1986). A model for the Ca^{2+} -induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2638–2644.
- HERZIG, J.W. & QUAST, U. (1992). On the role of Ca^{2+} binding proteins as possible targets for Ca^{2+} sensitizing agents. *Z. Kardiol.*, **81**, Suppl. 4, 49–55.
- KERRICK, W.G.L., MALENCIK, D.A., HOAR, P.E., POTTER, J.D., COBY, R.L., POCINWONG, S. & FISCHER, E.H. (1980). Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflügers Arch.*, **386**, 207–213.
- LEAVIS, P.C. & KRAFT, E.L. (1978). Calcium binding to cardiac troponin C. *Arch. Biochem. Biophys.*, **186**, 411–415.
- LI, M.X., GAGNE, S.M., SPYRACOPOULOS, L., KLOKS, C.P.A.M., AUDETTE, G., CHANDRA, M., SOLARO, R.J., SMILLIE, L.B. & SYKES, B.D. (1997). NMR studies of Ca^{2+} 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.
- MACLACHLAN, L.K., REI, D.G., MITCHELL, R.C., SALTER, C.J. & SMITH, S.J. (1990). Binding of a calcium sensitizer, bepridil, to cardiac troponin C. A fluorescence stopped-flow kinetic, circular dichroism, and proton nuclear magnetic resonance study. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9764–9770.
- MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1979). Sarcomere length effects on the Sr^{2+} - and Ca^{2+} -activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochem. Biophys. Acta.*, **546**, 64–76.
- MOUNIER, Y., HOLY, X. & STEVENS, L. (1989). Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflügers Arch.*, **415**, 136–141.
- NASSAR, R., MALOUF, N.N., KELLY, M.B., OAKELEY, A.E. & ANDERSON, P.A. (1991). Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ. Res.*, **69**, 1470–1475.
- ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H. & BRANDT, P.W. (1974). Calcium binding and tension development in aetertgent-treated muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, **63**, 168–186.
- ORENTLICHER, M., BRANDT, P.W. & REUBEN, J.P. (1977). Regulation of tension in skinned muscle fibers: effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am. J. Physiol.*, **233**, C127–C134.

- POTTER, J.D. & GERGELY, J. (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6096-6099.
- REISER, P.J., KASPER, C.E., GREASER, M.L. & MOSS, R.L. (1988). Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, **254**, C605-C613.
- SHENG, Z., STRAUSS, W.L., FRANCOIS, J.M. & POTTER, J.D. (1990). Evidence that both Ca^{2+} -specific sites of skeletal muscle TnC are required for full activity. *J. Biol. Chem.*, **265**, 21554-21560.
- SIA, S.K., LI, M.X., SPYRACOPOULOS, L., GAGNE, S.M., LIU, W., PUTKEY, J.A. & SYKES, B.D. (1997). Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18216-18221.
- SOLARO, R.J., BOUSQUET, P. & JOHNSON, D. (1986). Stimulation of cardiac myofibrillar force, ATPase activity and troponin C Ca^{2+} binding by bepridil. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 502-507.
- SPYRACOPOULOS, L., LI, M.X., SIA, S.K., GAGNE, S.M., CHANDRA, M., SOLARO, R.J. & SYKES, B.D. (1997). Calcium-induced structural transition in the regulatory domain of human cardiac troponin C. *Biochemistry*, **36**, 12138-12146.
- TOBACMAN, L.S. (1996). Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 447-481.
- VAN EERD, J.P. & TAKAHASHI, K. (1975). The amino acid sequence of bovine cardiac troponin-C. Comparison with rabbit skeletal troponin-C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 122-127.
- WOOD, D.S., ZOLLMAN, J., REUBEN, J.P. & BRANDT, P.W. (1975). Human skeletal muscle: properties of the 'chemically skinned' fiber. *Science*, **187**, 1075-1076.
- ZOT, H.G. & POTTER, J.D. (1982). A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7678-7683.
- ZOT, H.G. & POTTER, J.D. (1989). Reciprocal coupling between C and myosin crossbridge attachment. *Biochemistry*, **28**, 6756.

(Received April 8, 1999

Revised June 30, 1999

Accepted July 5, 1999)

Nous avons démontré que le bépridil exerce un effet différentiel sur les fibres squelettiques lentes et rapides, exprimant respectivement les isoformes lentes et rapides de la troponine C. Ceci n'exclut cependant pas un rôle possible des autres protéines régulatrices intervenant dans le processus régulateur enclenché par la TnC. Afin de déterminer si l'effet différentiel du bépridil sur les fibres lentes et rapides est dicté uniquement par la TnC ou par un processus plus complexe (impliquant l'influence de protéines intervenant dans la succession d'événements induits par la fixation du Ca^{2+} sur la TnC), nous avons réalisé des expériences d'extraction des TnC sur les muscles squelettiques de rat. Les TnC lentes et les TnC rapides ont été remplacées respectivement par des TnC rapides et lentes, synthétisées dans des bactéries. Cette étude a fait l'objet d'une publication intitulée "The role of the Ca^{2+} regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca^{2+} sensitizer bepridil".



The role of the Ca^{2+} regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca^{2+} sensitizer bepridil

*¹P. Kischel, ¹B. Bastide, ²J.D. Potter & ¹Y. Mounier

¹Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France and ²Department of Molecular and Cellular Pharmacology, University of Miami, School of Medicine, 1600 N.W. 10th Ave., Room 6085 RMSB, Miami, Florida, FL 33136, U.S.A.

1 The Ca^{2+} -sensor protein troponin C (TnC) exerts a key role in the regulation of muscle contraction, and constitutes a target for Ca^{2+} sensitizer compounds, such as bepridil, known to increase its apparent Ca^{2+} affinity. Moreover, bepridil has been reported to exert a differential effect in slow and fast skeletal muscle fibres, which express the slow/cardiac and fast TnC isoform, respectively.

2 The role of the TnC isoform in establishing the differential effect of bepridil was assessed in slow soleus and fast tibialis rat skinned fibres, by extraction of endogenous TnC and consecutive reconstitution with either slow or fast recombinant TnC. A mutant (VG2), lacking the regulatory site II, was also used to distinguish the role of each regulatory site.

3 Fast tibialis fibres reconstituted with cardiac TnC exhibited a typical slow bepridil reactivity, while slow soleus fibres reincorporated with fast TnC displayed a typically fast reactivity to bepridil. These results indicated that the differential effect of bepridil in slow and fast fibres is related to the TnC isoform predominantly expressed in a fibre.

4 Experiments with the VG2 mutant demonstrated that BPD can achieve an increase in the Ca^{2+} affinity in the absence of a functional site II. Thus, site I was necessary for the BPD effect to be independent of the Ca^{2+} concentration. Moreover, the amplitude of the reinforcement in the Ca^{2+} affinity, induced by the binding of bepridil to the TnC molecule, is dependent on the number of functional regulatory sites, the larger affinity reinforcement being detected when only one regulatory site (either site I or II) is functional.

British Journal of Pharmacology (2000) 00, 000–000

Keywords: Ca^{2+} -sensitizer drug; bepridil; TnC substitution; TnC mutant; skinned fibres

Abbreviations: BPD, bepridil; EGTA, ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether) N,N,N',N' tetraacetic acid; K Prop, potassium propionate; MgAc, magnesium acetate; MLC, myosin light chain; MOPS, 3-(N-morpholino) propanesulphonic acid; SL, Sarcomere length

Introduction

Troponin C (TnC), a dumbbell shaped protein, is one of the three subunits of the regulatory complex that acts as a Ca^{2+} sensor, and initiates a cascade of events leading to muscle fibre contraction when Ca^{2+} concentration rises. The TnC protein represents a major target for molecules called ' Ca^{2+} sensitizers', which are able to enhance the Ca^{2+} responsiveness of the contractile system. Bepridil (BPD) belongs to this class of compounds, and was demonstrated to increase the apparent Ca^{2+} affinity of cardiac muscle fibres (Solaro *et al.*, 1986; Herzig & Quast, 1992), as well as skeletal muscle fibres (Kischel *et al.*, 1999). However, a differential effect of BPD was observed between fast and slow skeletal fibres which express distinct TnC isoforms: a fast skeletal and a slow skeletal/cardiac one, respectively (Burnick & Kay, 1977). The fast skeletal isoform (TnCf) has four Ca^{2+} binding sites: two low affinity amino terminal sites I and II, that regulate muscle contraction (Potter & Gergely, 1975), plus two high affinity carboxyterminal sites III and IV that maintain TnC in the regulatory complex (Zot & Potter, 1982). Ca^{2+} fixation to site II occurs primarily and induces minor but essential conformational changes for contraction trigger, while Ca^{2+} binding to site I induces a structural opening of the N-lobe via subsequent conformational changes (Sia *et al.*, 1997). Due to an insertion as well as a double substitution of critical

amino acids, site I of the slow/cardiac isoform (TnCc) is rendered non-functional, leaving the amino-terminal lobe partially closed upon activation of only site II.

The sensitizing effect of BPD on the fast isoform in the presence of Ca^{2+} was attributed to a stabilization of the Ca^{2+} -induced conformational changes by fixation of the drug on the hydrophobic amino acids exposed by the opened N-lobe, inducing a decrease of the Ca^{2+} off-rate (MacLachlan *et al.*, 1990). Recently, it has been shown, *in vitro*, that BPD itself could induce an opening of the N-lobe of the cardiac isoform (similar to the N-lobe of 4 Ca^{2+} -skeletal TnC), and a stabilization of this N-lobe (Li *et al.*, 2000).

However, *in vivo*, it has been previously shown that slow skeletal fibres were more drug reactive than the fast ones, and showed a BPD reactivity dependent on the Ca^{2+} concentration, the higher tension reinforcement being obtained at low activation levels. On the contrary, the sensitizing effect of the drug in fast fibres was quite independent of the Ca^{2+} concentration (Kischel *et al.*, 1999). Therefore, it appeared relevant to determine whether this differential effect of BPD in slow and fast fibres was due to the TnC isoform only, or resulted from integrated effects within the myofibrillar lattice downstream of TnC.

For this purpose, we used extraction-replacement experiments of TnC. Following extraction of native slow (TnCc) and fast (TnCf) skeletal TnC from slow and fast rat fibres respectively, recombinant TnC were reincorporated: cardiac

*Author for correspondence.

mouse TnC (identical to TnCs) was added in fast tibialis anterior muscle fibres, while chicken fast TnC was substituted for TnCs in soleus fibres. In an attempt to correlate more precisely the effect of BPD to the number of active regulatory sites and possibly attribute a specific role to each site, we also used a previously described mutant called 'VG2' (Sheng *et al.*, 1990), which is unable to bind Ca^{2+} in site II but retains the ability to bind Ca^{2+} in site I. This latter was shown to allow partial activation of fast fibres (Sheng *et al.*, 1990; Putkey *et al.*, 1991); therefore, the VG2 mutant was substituted for TnCf in a fast regulatory environment.

All the results indicated that TnC appeared as the protein responsible for the differential bepridil reactivity of slow and fast fibres, the role of each regulatory site being distinguishable. Moreover, our data provided evidence that the TnC isoform regulated the fibre sensitivity to Sr^{2+} ions as well as the Ca^{2+} sensitivity in the skeletal rat fibres.

Methods

Animals and muscle preparation

The experiment as well as the maintenance conditions of the animals received authorizations from the Ministry of Agriculture and the Ministry of Education (veterinary service of health and animal protection, authorization 03805). Experiments were carried out on soleus and tibialis anterior muscles of adult male Wistar rats (Iffa Credo, l'Arbresle, France). These muscles were chosen for their homogeneity in fibre types: according to the myosin ATPase activity, the relative proportions of slow oxidative, fast oxidative and fast glycolytic fibres are 87, 13, 0% in the soleus and 1, 27, 72% in the white tibialis anterior, respectively (Armstrong & Phelps, 1984).

Muscles were removed from animals anaesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbitone sodium (3 mg kg^{-1}). Chemically skinned fibres were prepared as previously described (Wood *et al.*, 1975). The skinned muscles were stored at -20°C up to 3 weeks in a 50/50 glycerol/skinning solution, containing protease inhibitor leupeptin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), known to prevent loss of contractile proteins and preserve the fibre tension (Reiser *et al.*, 1988).

Solutions

All reagents were provided by Sigma (St Louis, U.S.A.). The composition of all the solutions was calculated by the Fabiato computer program (Fabiato, 1988). The program calculation was used with stability constants listed for Ca^{2+} (Orentlicher *et al.*, 1977) and for Sr^{2+} (Moisescu & Thieleczek, 1979), to keep final ionic strength at 200 mM. pH was adjusted to 7.0 and ATP at 2.5 mM was added to each solution, except extraction solution. Activating solutions were made up of 3-(*N*-morpholino) propanesulphonic acid (MOPS, 10 mM), potassium propionate (K Prop, 185 mM), magnesium acetate (MgAc, 2.5 mM) and various concentrations of free Ca^{2+} from CaCO_3 , buffered with ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether) *N,N,N',N'* tetraacetic acid (EGTA) and added in proportions to obtain the different pCa values (7.0 to 4.2, with $\text{pCa} = -\log[\text{Ca}^{2+}]$). The pSr ($\text{pSr} = -\log[\text{Sr}^{2+}]$) solutions were similar to the pCa solutions except free Sr^{2+} from SrCl_2 . Relaxing solution (R) was identical to the skinning solution and was composed of 10 mM MOPS, 170 mM K Prop, 2.5 mM MgAc and 5 mM EGTA. Prior to submaximal pCa exposure, EGTA traces

from the previously applied relaxing solution were rinsed with washing (W) solution, identical to pCa solutions except EGTA and CaEGTA free.

The extraction solution contained 2.5 mM ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA), and was adjusted to pH 7.8.

BPD was prepared fresh each day and used as a 20 mM stock solution in absolute ethanol. At concentrations used, ethanol itself had no effect on the developed tensions (data not shown).

Force measurements and recording

The experiments were carried out in a thermostatically controlled room ($19 \pm 1^\circ\text{C}$). For each experiment, a single fibre (7–8 mm long) was isolated from the skinned muscle, and divided into three segments called 'CONT' (control), 'EXT' (extracted) and 'REC' (reconstituted). The CONT segment was dissolved in 20 μl sodium dodecyl sulphate (SDS) lysis sample buffer and stored until electrophoretic analysis. EXT and REC segments (2–2.5 mm each) were mounted in experimental chambers and connected to strain-gauges (Fort 10, World Precision Instruments, Aston, U.K.). A micrometer allowed fibre diameter measurements assuming the cross-section was circular, fibres with a high degree of ellipticity being discarded. The resting sarcomere length (SL) was determined by diffraction using a Helium/Neon laser (Spectra Physics, Carlsbad, U.S.A.). The SL was set to $2.6 \mu\text{m}$ (120% of resting SL) to allow optimal isometric tension development upon ionic activation: it was subsequently regularly controlled and readjusted if necessary during the experiment. Sarcoplasmic reticulum was rendered non-functional, each fibre being bathed for 15 min in a solution made up of 2% Brij58 (polyoxyethylene 20 cetyl ether) and 0.5% Triton X-100 in R solution under constant stirring.

Measurements of Sr^{2+} and Ca^{2+} activated tensions

Single fibres were first immersed in a pCa 4.2 solution to measure the initial force. REC segments were then checked for their strontium reactivity by successive exposure to pSr solutions: steady state tensions obtained with pSr 5.8, 5.4, 5.0, 4.6 were normalized to maximal Sr^{2+} activated tension (pSr3.4), in order to deduce the half maximal activation by strontium from the linear part of the T_{pSr} . REC fibres were then activated with various pCa (from 7.0 or 6.6 to 4.2 for slow and fast fibres, respectively). The steady state submaximal tensions *P* were expressed as a percentage of the maximal tension P_0 (induced by the saturating pCa4.2 solution), and reported as Tension/pCa (T_{pCa}) relationships. Fibre type was determined and based on the difference between Ca^{2+} and Sr^{2+} activation characteristics for fast and slow fibres, the fast muscle fibres being less sensitive to Sr^{2+} than slow fibres (Kernick *et al.*, 1980). Fibre type was therefore determined by establishing the Δ value, the difference between the respective Ca^{2+} and Sr^{2+} affinity criteria, pCa_{50} and pSr_{50} (Ca^{2+} and Sr^{2+} concentration needed to elicit 50% of P_0). Typically, Δ of slow fibres is less than 0.30 pCa units, while Δ of fast fibres is higher than 1.00 pCa unit. This functional determination was later checked by the structural analysis of the fibres. Two other important parameters were extracted from the T_{pCa} relationships: the threshold for activation by Ca^{2+} reflected the sensitivity of the contractile system, and the steepness of the T_{pCa} curve reflected the cooperativity between the different regulatory proteins within the thin filament. Fast type fibres could be distinguished from slow type ones by a higher Ca^{2+}

threshold (lower pCa value) and a steeper T/pCa curve. pCa₅₀ being usually not significantly different (Stevens *et al.*, 1993). The steepness of the T/pCa curve was determined by the Hill coefficients n_H , either n_1 or n_2 , calculated according to the following equation (Brandt *et al.*, 1982):

$$P/P_0 = \left(\frac{[Ca^{2+}]/K}{1 + ([Ca^{2+}]/K)^{n_H}} \right)$$

where P/P_0 is the normalized tension and K is the apparent dissociation constant ($pK = -\log K = pCa_{50}$). n_1 corresponded to $P/P_0 > 50\%$; and n_2 to $P/P_0 < 50\%$.

For the T/pCa – BPD relationship determination, 100 μ M BPD were added in each pCa solution, as previously described (Kischel *et al.*, 1999). To quantify the shift that occurred when BPD was added to the activating solution, we defined a Δ'_{10} , which represented the shift expressed in pCa units at n per cent of relative tension. In our analyses, we measured Δ'_{10} , Δ'_{50} and Δ'_{90} .

Extraction and replacement of TnC in skinned fibres

Removal of endogenous TnC from both slow soleus and fast tibialis fibres was derived from a previously described method (Sheng *et al.*, 1990). Two segments (EXT and REC) of the same fibre were used: for the REC segment, functional data were collected prior to extraction and subsequently to TnC reconstitution, which permitted each fibre to serve as its own control. The EXT and REC segments were incubated in the low salt EDTA solution (20 min for the fast fibres, and up to 2 h for the slow ones). Maximal tensions were evaluated with pCa4.2 solutions, and extraction was stopped when residual tension dropped to 5–10% of P_0 before extraction. The EXT segment was then dissolved in lysis sample buffer for evaluating the TnC extraction. The REC TnC depleted segment was reincorporated with either 0.1 mg ml⁻¹ R rabbit fast TnC, 0.2 mg ml⁻¹ R cardiac mouse TnC, or 1 mg ml⁻¹ R VG2 mutant for 10 min. Cardiac mouse TnC or VG2 mutant was thus reintroduced in fast tibialis anterior fibres, while fast chicken TnC was reincorporated in slow soleus fibres. Maximal tension after TnC reconstitution was checked after removing any excess of unbound TnC with R solution, and T/pCa with and without bepridil were established.

Electrophoresis

All fibre segments (CONT, EXT and REC) were dissolved in 20 μ l sodium dodecyl sulphate (SDS) lysis sample buffer, heated at 90°C for 3 min and stored at –80°C until electrophoretic analysis. Separation was performed by SDS-PAGE using 10–20% linear gradient gels, which permitted from the same gel a good separation of the two TnC isoforms, and an accurate analysis of the MLC isoforms (Tourseil *et al.*, 2000). Proteins were stained with Sypro Orange dye and revealed under a 315 nm UV transilluminator before immunoblot.

Immunoblotting

Electrotransfer was performed to a 0.2 μ m nitrocellulose sheet (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membranes were blocked with a phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4) containing 5% nonfat dry milk and 0.2% sodium azide. The TnC isoforms were localized by a polyclonal antibody, incubated overnight. This antibody reacted equally well with fast and slow TnC isoforms (Leeuw *et al.*, 1994). TnC antibodies were detected by an extravidin-biotin peroxidase staining kit. TnC isoforms were visualized

by an enhanced chemi-luminescence (ECL) kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, U.S.A.) and hyperfilms ECL (Amersham International, Little Chalfont, U.K.), to ensure optimal protein detection. Signal intensities were evaluated by densitometry (GS-700 Imaging Densitometer, Biorad, Ivry s/ Seine, France).

Only pure slow soleus and fast tibialis fibres (i.e. expressing only slow and fast MLC TnC, respectively) were retained, hybrid fibres being discarded. This ensured the reliability of the extraction-replacement experiments. Moreover, these pure slow or fast fibres expressed, respectively, only slow and fast isoforms of other regulatory proteins such as TnT and TnI (controlled by immunoblots, data not shown). Therefore, the BPD effects could be directly related to the TnC content of the fibres.

The profile of TnC expression was determined by measuring the relative proportions of the TnC signals of fast and slow isoforms, respectively.

Statistical analysis

All the data were reported as means \pm s.e.mean. The statistical significance of the difference between means was determined using the Student's *t*-test or paired *t*-test when data were obtained from the same fibre in different experimental conditions. Differences at or above the 95% confidence level were considered significant.

Results

Fibre characteristics before extraction

Diameter and maximal isometric tensions are reported in Figure 1. Soleus and tibialis anterior fibre diameters were not different, but tibialis fibres developed higher absolute and normalized tensions. As previously shown (Kischel *et al.*, 1999), BPD had no effect on these tensions (values not reported). Ca²⁺ activation characteristics of both fibre types are reported in Table 1 and illustrated in Figure 2a, b. In the slow soleus fibres, bepridil increased submaximal tensions as a function of the Ca²⁺ concentration, the sensitizing effect being more efficient at low Ca²⁺ levels, as attested by the significantly different Hill coefficients (n_1 and n_2) of the T/pCa curves with and without

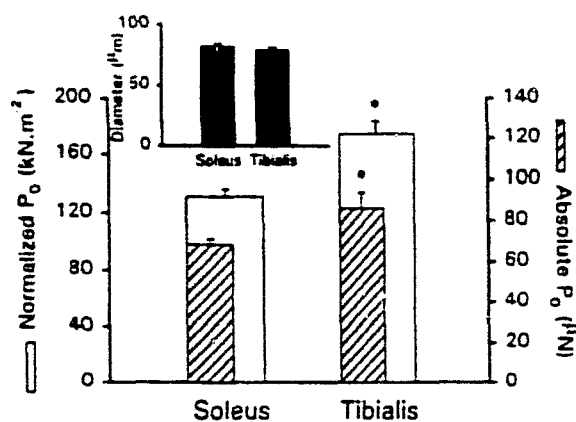


Figure 1 Diameter, absolute and normalized maximal tensions (P_0) of slow soleus and fast tibialis anterior fibres in CONT conditions. Normalized tensions are represented with empty bars, and absolute tensions are represented in hatched bars. Inset represents diameters of both fibre types. *Represents significant difference between soleus and tibialis anterior fibres (symbols were reported on tibialis values).

bepridil. In contrast, this effect was quite independent of the pCa range in fast tibialis fibres, and the apparent affinity reinforcement estimated by the shift in the pCa₅₀ values was lower than that measured for slow fibres.

T/pCa relationship of fast soleus fibres was also established (Figure 2a,c, dashed line) and presented lower pCa threshold, pCa₅₀ and higher Hill coefficients than the slow fibres from the same muscle. These fibres were found to coexpress both TnC isoforms, the fast one being always largely predominant (67.3 ± 5.6% of the total TnC content, Figure 3, lane 4).

Effects of reconstitution

Estimations of endogenous TnC extraction and exogenous TnC reconstitution Extraction was performed to obtain less than 10% residual tension. 8.9 ± 1.3 for slow soleus and 5.1 ± 1.6 for fast tibialis fibres, corresponding to 16.7 ± 5.6% and 29.1 ± 6.8% residual endogenous TnC signal, respectively (Figure 3, EXT segments). MLC content analysis of extracted fibres showed a slight decrease in MLC2 isoform content: 24.6 ± 8.9% MLC2s and 21.4 ± 6.5% of MLC2f were extracted simultaneously with TnC in slow and fast fibres, respectively. MLC1 and MLC3 were not affected by the extraction procedure.

Reconstitution with recombinant TnC was obvious in both fibre types, as judged by immunoblotting results (Figure 3, REC segments). From the TnC signal intensities, soleus fibres appeared constituted of 78.2 ± 5.4% fast TnC, and acquired a profile close to that found in the fast soleus fibres (Figure 3, lane 4). After reconstitution with TnC, tibialis fibres were constituted of 73.9 ± 4.7% cardiac TnC.

P₀ of reconstituted fibres were equal to 51 and 41% of P₀ determined before TnC extraction in slow and fast fibres, respectively. Similar values were obtained with extended reconstitution time or higher concentration of recombinant proteins.

Reconstitution with the VG2 required higher concentrations of the mutant (see Sheng *et al.*, 1990). Tension recovery was equal to 30.8 ± 4.1% of the P₀ measured in unextracted fibres.

Ca²⁺ activation properties of slow fibres reconstituted with TnCf Subsequently to TnCf substitution in soleus fibres, strontium activation characteristics were modified: T/pSr relationships were shifted to higher Sr²⁺ concentrations (Δ was 0.18 before extraction and 0.87 after reconstitution). T/pCa curves were also changed (Figure 2c): pCa threshold and pCa₅₀

were shifted towards higher Ca²⁺ concentrations, while Hill coefficients were significantly increased. When compared with values obtained in the presence of native TnC isoform, the apparent Ca²⁺ affinity increase induced by bepridil was largely reduced at low Ca²⁺ levels and bepridil exerted now its sensitizing effect whatever the Ca²⁺ concentration, the Δ₁₀ - Δ₉₀ being equal to 0.04 ± 0.01. As before extraction, BPD had no effect on the maximal tensions of reincorporated fibres.

Ca²⁺ activation properties of fast fibres reconstituted with TnCc After TnCc reintroduction in TnCf depleted tibialis fast fibres, strontium activation characteristics were changed, T/pSr curves being shifted to lower Sr²⁺ concentrations (Δ was 1.17 before extraction and 0.52 after reconstitution). Two parameters of the T/pCa curve (Figure 2d) were also modified. The pCa threshold was displaced to higher pCa values and the Hill coefficients (n₁ and n₂) were significantly lowered (Table 1). The pCa₅₀ value was not different, whichever the TnC isoform (native fast or recombinant slow). However, the bepridil effect was completely modified in the reconstituted fibres, the sensitizing effect was increased, submaximal tensions being all the more important as Ca²⁺ concentrations were low with a Δ' ₁₀ - Δ' ₉₀ equal to 0.34 ± 0.01.

After VG2 reintroduction, strontium activation characteristics were not changed (Δ was equal to 1.18 ± 0.06). All parameters of the T/pCa relationship were modified with the mutant TnC: higher concentrations of Ca²⁺ were required to activate force, and the pCa₅₀ was shifted from 5.84 to 5.46. There was also a significant decrease in the Hill coefficients (Table 2). The T/pCa curve in the presence of BPD (Figure 2e) was perfectly parallel to the T/pCa curve without BPD (n₁ and n₂ were identical), and shifted from 0.27 pCa units (vs 0.14 in control conditions) towards lower Ca²⁺ concentrations.

Additionally, BPD was found to increase maximal tensions of fast fibres reincorporated with either VG2 mutant or TnCc isoform, by 18 ± 2.4 and 17.3 ± 3.1%, respectively (Figure 4).

Table 2 Typical values for the Δ' shift in the presence of BPD, as a function of the functional regulatory site(s)

Regulatory site(s) Muscle fibres	I-II	II alone	I alone
	TA Cont. Sol Rec TnCf	Sol Cont. TA Rec TnCc	TA Rec VG2
Δ' ₁₀	0.16 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.27 ± 0.02
Δ' ₅₀	0.14 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.02
Δ' ₉₀	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.27 ± 0.02
Δ' ₁₀ - Δ' ₉₀	0.04 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.00 ± 0.02

Table 1 Calcium activation characteristics of soleus and tibialis muscle fibres

Δ (pCa ₅₀ -pSr ₅₀)	Soleus	Tibialis anterior
	CONT/REC TnCf	CONT/REC TnCc/REC VG2
	0.18 ± 0.01/0.87 ± 0.04*	1.17 ± 0.01/0.52 ± 0.05*/1.18 ± 0.06
Without BPD		
pCa threshold	6.62 ± 0.01/6.16 ± 0.02*	6.24 ± 0.01/6.63 ± 0.03*/6.08 ± 0.02*
pCa ₅₀	5.85 ± 0.01/5.54 ± 0.01*	5.85 ± 0.02/5.84 ± 0.03/5.46 ± 0.02*
n ₁	2.01 ± 0.06/2.91 ± 0.12*	3.39 ± 0.35/2.01 ± 0.12*/2.56 ± 0.08*
n ₂	2.39 ± 0.07/3.10 ± 0.08*	5.2 ± 0.44/2.41 ± 0.12*/2.91 ± 0.11*
With BPD		
pCa threshold	7.09 ± 0.02§/6.45 ± 0.03*§	6.49 ± 0.02§/7.13 ± 0.04*§/6.40 ± 0.02*§
pCa ₅₀	6.11 ± 0.01§/5.68 ± 0.01*§	5.99 ± 0.02§/6.05 ± 0.03*§/5.72 ± 0.01*§
n ₁	1.38 ± 0.02§/2.59 ± 0.08*	3.29 ± 0.31/1.57 ± 0.09*§/2.64 ± 0.08*
n ₂	1.64 ± 0.03§/2.65 ± 0.09*§	4.47 ± 0.33§/1.54 ± 0.80*§/2.84 ± 0.10*

*Indicates significant difference between CONT (unextracted fibres) and REC (reconstituted fibres; symbols reported in REC columns) for slow soleus or fast tibialis anterior fibres. §Indicates significant difference between Without BPD and With BPD conditions (symbols reported on 'With BPD' values).

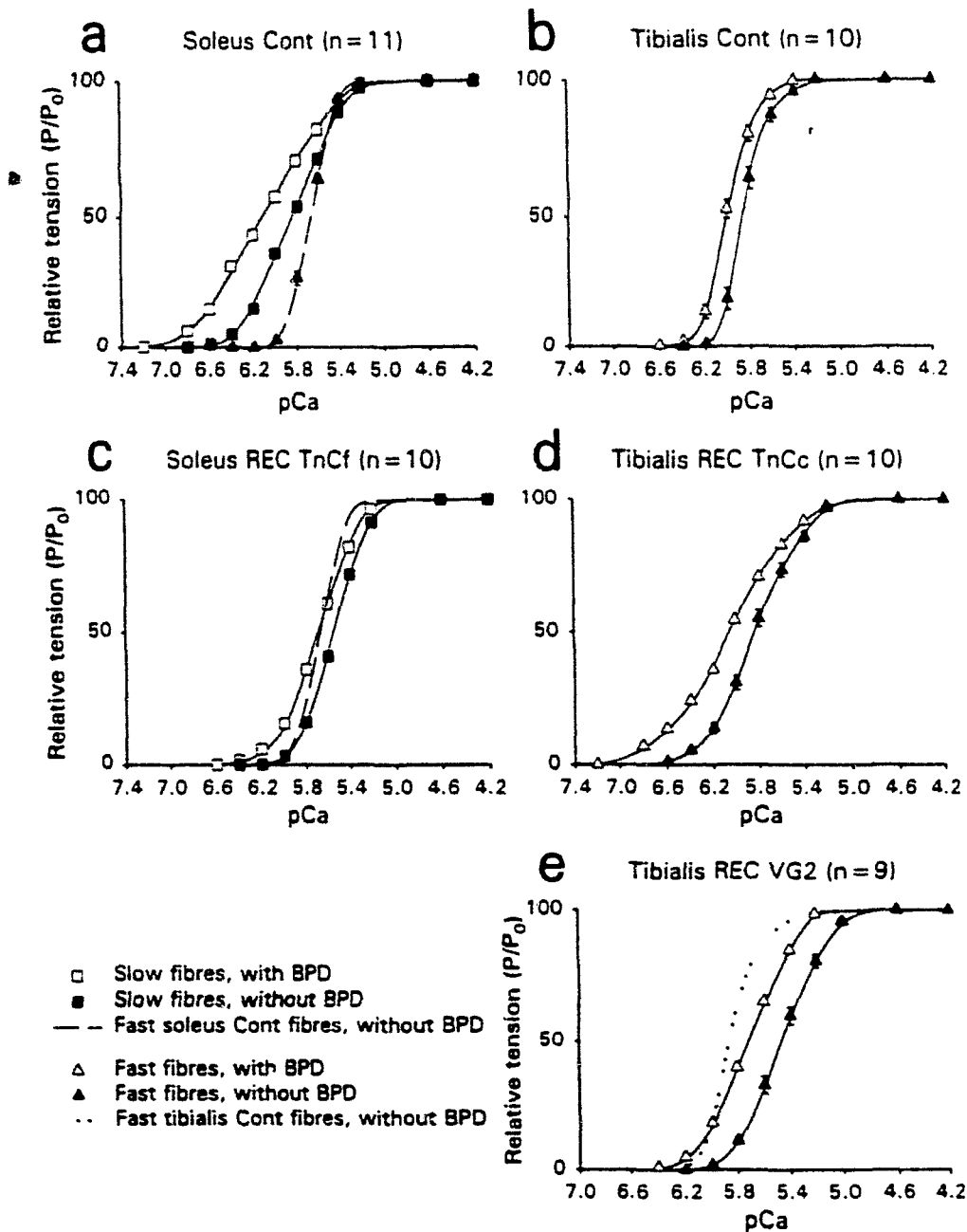


Figure 2 T/pCa relationships of soleus and tibialis anterior muscle fibres, before extraction (a,b) and after reconstitution with recombinant TnC (c-e). n Represents the number of fibres. Squares represent slow fibres, and triangles represent fast fibres. Filled symbols are used in absence of BPD, and empty symbols are used in the presence of BPD. s.e.m. were not reported when they merged with the mean points. The dashed line in graphs (a) and (c) represents the T/pCa relationship of fast soleus muscle fibres. In (e), the dotted line represents the T/pCa relationship of tibialis fibres, already shown in (b). Curves were fitted with the Hill parameters (n_1 for $P/P_0 > 50\%$ and n_2 for $P/P_0 < 50\%$).

Discussion

We demonstrated in this study that the differential effect of bepridil in the slow and fast fibres could be attributed to the troponin C isoform. Moreover, we precisely studied the role of the regulatory sites of the troponin C towards the Ca^{2+} sensitizer BPD *in vivo*.

Our goal was to define the origin of the previously demonstrated differential effect of the Ca^{2+} sensitizer bepridil in slow and fast fibres. Slow soleus and fast tibialis fibres expressing only slow and fast TnC, respectively, were used to confirm or invalidate the hypothesis that TnC was implicated in the differential bepridil effect in slow and fast fibres. Functional data (Ca^{2+} activation characteristics, with

and without bepridil) corroborated this choice: the Ca^{2+} affinity (pCa_{50}) was not different, as usually reported (Stevens *et al.*, 1993), fast fibres exhibited lower sensitivity (lower pCa threshold) and higher cooperativity (higher Hill coefficients), and BPD reactivity was typically different in these two fibre types, as previously reported (Kischel *et al.*, 1999).

Extraction was performed to obtain a residual TnC signal intensity under 20% of initial TnC content, to avoid deleterious effects resulting from extended extraction. Only the MLC2 isoform was simultaneously slightly extracted, as previously reported (Moss *et al.*, 1982). The loss of about 20% of these essential light chains could partly explain the fact that tension recovery was not higher

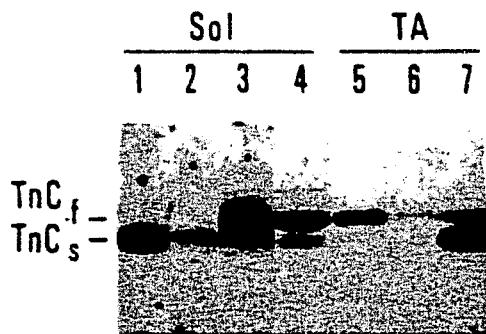


Figure 3 TnC expression profiles of single fibres from either soleus or tibialis muscles. ECL detection of TnC isoforms (only the region of TnC is shown). Lane 1: soleus CONT segment, lane 2: soleus EXT segment, lane 3: soleus REC TnCf segment; lane 4: fast soleus fibre; lane 5: tibialis anterior CONT segment; lane 6: tibialis anterior EXT segment, lane 7: tibialis anterior REC TnCc segment.

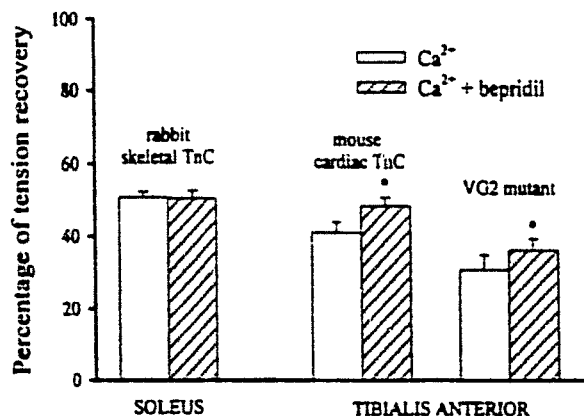


Figure 4 Tension recovery after reconstitution with recombinant TnC. Tension recovery was expressed in percentage of maximal tension elicited before extraction. *Represents significant difference between absence and presence of BPD (symbols were reported on Ca^{2+} + BPD bars).

than 50% in both fibre types. More presumably, incomplete tension recovery might be caused by species dependent differences (Hoar *et al.*, 1988), i.e. the inability of exogenous mouse or chicken TnC to activate thin filaments of rat fibres, rather than incomplete TnC reconstitution or loss of MLC2. Indeed, if TnC reconstitution was not complete (not suggested by our immunoblot results), a decrease in cooperativity would be expected, since it has previously been shown that even limited TnC extraction caused cooperativity to drop (Brandt *et al.*, 1984). This was not the case; soleus fibres with substituted TnCf showed an increase in the Hill coefficients when compared to the same fibres in the presence of endogenous TnC. Secondly, fibres with selective TnC extraction (without significant MLC2 decrease) were found among tibialis fibres ($n=3$), but tension recovery after TnCc reintroduction was not higher as observed for fibres which experienced significant MLC2 loss. Thus, although tension recovery was not as high as one would have expected, we were able to obtain reliable and coherent functional data.

Slow fibres reconstituted with rabbit fast TnC exhibited typical fast Ca^{2+} activation characteristics (higher cooperativity, decreased sensitivity, and pCa_{50} value shifted towards higher Ca^{2+} concentrations). It is noteworthy that TnCf substitution makes the T/pCa curves of slow fibres more characteristic of fast fibres from the same muscle. These results are in agreement with previous data showing the involvement

of the TnC isoform in the T pCa relationships (Babu *et al.*, 1987). The effects of bepridil in these reconstituted fibres were also characteristic of fast fibres, i.e. lower BPD reactivity, that was independent of the activating Ca^{2+} concentration. Thus, despite the slow regulatory environment, bepridil reactivity was changed from a typical slow towards a typical fast effect. This indicated that the predominant TnC isoform was responsible for the bepridil effect and strongly suggested a role of site II in the Ca^{2+} dependence of the drug effect.

This result was confirmed by complementary experiments: TnC fast extraction/TnC 'slow' (cardiac) substitution in fast tibialis fibres conferred a higher BPD reactivity that depended on the activating Ca^{2+} concentrations, characteristic of slow fibres. The latter result, obtained with a TnC isoform whose site I was inactive, suggested once again that the TnC isoform was responsible for the bepridil effect.

Study with the VG2 mutant, lacking the regulatory site II, substituted for endogenous fast TnC of tibialis fibres, was designated to further define the role of site I in the bepridil effect. Ca^{2+} activation of these reconstituted fibres was more difficult without the regulatory site II, since tension recovery was not higher than 30% of P_0 before extraction. Indeed, this site is known to initiate the conformational changes at the origin of the TnC activation (Spyropoulos *et al.*, 1997). BPD could reinforce both submaximal and maximal tensions. This indicates that BPD can achieve an increase in the Ca^{2+} affinity in the absence of a functional site II. Thus BPD can induce a reinforcement of the Ca^{2+} affinity with only one functional regulatory site, either site I or II. It is interesting to note that BPD had no effect on the maximal tensions of soleus fibres (with either native or recombinant fast TnC) or tibialis fibres (with native TnC), while it enhanced maximal tensions of tibialis fibres reconstituted with TnC lacking either site I or site II. This suggested that BPD helped thin filament activation in a fast regulatory environment, which is known to need both Ca^{2+} specific sites for full functional activity (Sheng *et al.*, 1990). The effect presumably resulted from stabilization and/or enhancement of partial conformational changes that occur upon Ca^{2+} occupation of either site I or II alone.

Ca^{2+} activation characteristics of VG2 reconstituted fibres were modified as previously described (Sheng *et al.*, 1990), and the T pCa - BPD relationship was shifted towards lower Ca^{2+} concentration, remaining exactly parallel to the T/pCa curve.

Thus, (i) when site I alone is active, BPD induces a Ca^{2+} affinity increase without altering the intrinsic cooperativity, (ii) when both sites are active (tibialis CONT or soleus REC), the cooperativity is not significantly different from that obtained in the absence of BPD; (iii) when only site II is active, whichever the regulatory environment, cooperativity is largely affected in the presence of BPD. Therefore, site I seems to be essential for keeping the cooperativity intact in the presence of BPD.

Moreover, the increase in Ca^{2+} affinity induced by BPD seems to be dependent on the number of regulatory sites, since a shift close to 0.25 pCa unit occurred at half maximal activation with only one active regulatory site (either site I or II), while an 0.14 pCa unit shift was generally observed with two regulatory active sites. This finding is in agreement with previous observations (Kischel *et al.*, 1999) suggesting that BPD is all the more efficient as TnC activation is difficult.

Finally, since Sr^{2+} activation characteristics of slow and fast fibres were modified in extraction-replacement experiments (VG2 excluded), we can conclude from our results that the TnC isoform also established the Sr^{2+} reactivity of slow

and fast fibres, in agreement with numerous studies (Babu *et al.*, 1987; Moss *et al.*, 1986; Hoar *et al.*, 1988).

To conclude, the use of different recombinant TnC isoforms has defined more clearly the intrinsic role of the TnC isoform (and even the regulatory sites of TnC) in establishing the different activation characteristics in the presence of the Ca^{2+} sensitizer BPD. It appears unlikely that the regulatory cascade of events downstream of the TnC could exert an influence in setting the differential effect of bepridil in slow and fast fibres, although this possibility cannot be ruled out.

In vivo, the functional behaviour of a skinned muscle fibre in response to bepridil revealed the TnC isoform predominantly expressed. More practically, the interesting properties

of the bepridil (i.e. a reinforcement of the Ca^{2+} -affinity whichever the TnC isoform targeted, with an optimal efficiency in the most 'pathological' conditions) constitute a strong basis to design specific compounds in the treatment of heart failure.

The authors thank Dr J.M. François (University of Liège, Belgium) for helpful advice throughout the study and Dr D. Pette (University of Konstanz, Germany) for kindly providing us with TnC antibodies. This work was supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES, grant no. 993027), the Fonds Européen de Développement Régional (F007), the Nord Pas-de-Calais Regional Council and the National Institute of Health (J.D. Potter) AR45391 and HL42325).

References

- ARMSTRONG, R.B. & PHELPS, R.O. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.*, **171**, 259–272.
- BABU, A., SCORDILIS, S.P., SONNENBLICK, E.H. & GULATI, J. (1987). The control of myocardial contraction with skeletal fast muscle troponin C. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5815–5822.
- BRANDT, P.W., COX, R.N., KAWAL, M. & ROBINSON, T. (1982). Effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca^{2+} sensitivity. *J. Gen. Physiol.*, **79**, 997–1016.
- BRANDT, P.W., DIAMOND, M.S. & SCHACHAT, F.H. (1984). The thin filament of vertebrate skeletal muscle co-operatively activates as a unit. *J. Mol. Biol.*, **180**, 379–384.
- BURTINICK, L.D. & KAY, C.M. (1977). The calcium-binding properties of bovine cardiac troponin C. *FEBS Lett.*, **75**, 105–110.
- FABIATO, A. (1988). Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.*, **157**, 378–417.
- HERZIG, J.W. & QUAST, U. (1992). On the role of Ca^{2+} binding proteins as possible targets for Ca^{2+} sensitizing agents. *Z. Kardiol.*, **81**, (Suppl. 4), 49–55.
- HOAR, P.E., POTTER, J.D. & KERRICK, W.G. (1988). Skinned ventricular fibres: troponin C extraction is species-dependent and its replacement with skeletal troponin C changes Sr^{2+} activation properties. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **9**, 165–173.
- KERRICK, W.G., MALENCIK, D.A., HOAR, P.E., POTTER, J.D., COBY, R.L., POBINWONG, S. & FISCHER, E.H. (1980). Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflügers Arch.*, **386**, 207–213.
- KISCHEL, P., STEVENS, L. & MOUNIER, Y. (1999). Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles. *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 767–773.
- LEEuw, T., KAPP, M. & PETTE, D. (1994). Role of innervation for development and maintenance of troponin subunit isoform patterns in fast- and slow-twitch muscles of the rabbit. *Differentiation*, **55**, 193–201.
- LI, Y., LOVE, M.L., PUTKEY, J.A. & COHEN, C. (2000). Bepridil opens the regulatory N-terminal lobe of cardiac troponin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 5140–5145.
- MAC LACHLAN, L.K., REID, D.G., MITCHELL, R.C., SALTER, C.J. & SMITH, S.J. (1990). Binding of a calcium sensitizer, bepridil, to cardiac troponin C. A fluorescence stopped-flow kinetic, circular dichroism, and proton nuclear magnetic resonance study. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9764–9770.
- MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1979). Sarcomere length effects on the Sr^{2+} - and Ca^{2+} -activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochem. Biophys. Acta*, **546**, 64–76.
- MOSS, R.L., GIULIAN, G.G. & GREASER, M.L. (1982). Physiological effects accompanying the removal of myosin LC2 from skinned skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8588–8591.
- MOSS, R.L., LAUER, M.R., GIULIAN, G.G. & GREASER, M.L. (1986). Altered Ca^{2+} dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibers following modifications of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6096–6099.
- ORENTLICHER, M., BRANDT, P.W. & REUBEN, J.P. (1977). Regulation of tension in skinned muscle fibers: effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am. J. Physiol.*, **233**, C127–C134.
- POTTER, J.D. & GERGELY, J. (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6096–6099.
- PUTKEY, J.A., LIU, W. & SWEENEY, H.L. (1991). 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.
- REISER, P.J., KASPER, C.E., GREASER, M.L. & MOSS, R.L. (1988). Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, **254**, C605–C613.
- SHENG, Z., STRAUSS, W.L., FRANCOIS, J.M. & POTTER, J.D. (1990). Evidence that both Ca^{2+} -specific sites of skeletal muscle TnC are required for full activity. *J. Biol. Chem.*, **265**, 21554–21560.
- SIA, S.K., LI, M.X., SPYRACOPOULOS, L., GAGNÉ, S.M., LIU, W., PUTKEY, J.A. & SYKES, B.D. (1997). Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18216–18221.
- SOLARO, R.J., BOUSQUET, P. & JOHNSON, D. (1986). Stimulation of cardiac myofilament force, ATPase activity and troponin C Ca^{2+} binding by bepridil. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 502–507.
- SPYRACOPOULOS, L., LI, M.X., SIA, S.K., GAGNÉ, S.M., CHANDRA, M., SOLARO, R.J. & SYKES, B.D. (1997). Calcium-induced structural transition in the regulatory domain of human cardiac troponin C. *Biochemistry*, **36**, 12138–12146.
- STEVENS, L., MOUNIER, Y. & HOLY, X. (1993). Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am. J. Physiol.*, **264**, R770–R776.
- 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.
- WOOD, D.S., ZOLLMAN, J., REUBEN, J.P. & BRANDT, P.W. (1975). Human skeletal muscle: properties of the (chemically skinned) fiber. *Science*, **187**, 1075–1076.
- ZOT, H.G. & POTTER, J.D. (1982). A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7678–7683.

(Received July 10, 2000

Revised September 13, 2000

Accepted September 18, 2000)

II. SECONDE PARTIE : EFFETS DE LA MICROGRAVITE REELLE OU SIMULEE SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE ET LES PROPRIETES D'ACTIVATION CALCIQUE LIEES A LA TROPONINE C.

La microgravité simulée ou réelle est bien connue pour induire des modifications structurales et phénotypiques, particulièrement marquées sur les muscles à fonction posturale. Après exposition à la microgravité, on note en effet i) une atrophie musculaire (Flynn & Max, 1985 ; Thomason & Booth, 1990 ; Taillandier et coll., 1996) et ii) une transition Lent → Rapide dans l'expression des MHC (Talmadge et coll., 1996 ; Caiozzo et coll., 1994 ; Bigard et coll., 1998 ; Stevens et coll., 1999).

Aucune donnée n'étant disponible sur les éventuelles transitions phénotypiques Lent → Rapide de la TnC après un épisode d'H-H, nous avons essayé de savoir si la TnC subissait des changements d'expression comparables aux MHC après une période de suspension de 15 jours. De plus, en considérant les transitions existantes et décrites pour d'autres protéines régulatrices comme la TnI et TnT (Campione et coll., 1993), nous avons tenté de déterminer si le comportement de la TnC pouvait être modifié dans un environnement évoluant au cours d'un épisode de microgravité simulée. La première partie de ce travail nous avait permis de caractériser un outil pharmacologique, le bépridil, qui exerce un effet caractéristique de la TnC majoritairement exprimée dans les fibres squelettiques. Nous avons donc utilisé le bépridil pour tester le fonctionnement de la TnC après cet épisode de suspension. L'étude de l'expression et de la fonction de la TnC suite à un épisode d'H-H a été publiée sous le titre "Expression and functional behaviour of troponin C in soleus muscle fibres after hindlimb unloading" (*J. Appl. Physiol.*, sous presse).

Expression and functional behavior of troponin C in soleus muscle fibers of rat after hindlimb unloading

KISCHEL P., BASTIDE B., STEVENS L., AND Y. MOUNIER

Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

ABSTRACT - Troponin C (TnC) plays a key role in the regulation of muscle contraction, thereby modulating the Ca^{2+} -activation characteristics of skinned muscle fibers. This study was performed to assess the effects of a 15-day hindlimb unloading (HU) period on TnC expression and its functional behavior in the slow postural muscles of the rat. We investigated the TnC isoform expression in whole soleus muscles, and in single fibers. The latter were also checked for their Ca^{2+} activation characteristics and sensitivity to bepridil, a Ca^{2+} sensitizer molecule. This drug has been described to exert a differential effect in slow and fast fibers depending on the TnC isoform. With regard to TnC expression, three populations were found in control muscle fibers : slow, hybrid slow and hybrid fast fibers, the TnC fast being always coexpressed with TnC slow. In the whole muscle, TnC fast expression increased after HU, due to the increase in the proportion of hybrid fast fibers. The HU hybrid fast fibers had properties similar to those of control hybrid fast fibers. The fibers which remained slow after HU, exhibited similar bepridil and Sr^{2+} properties as control slow fibers. Therefore, in these fibers, the changes could not be related to the TnC molecule.

Keywords : regulatory proteins, Ca^{2+} sensitizers, bepridil, simulated microgravity.

INTRODUCTION

Troponin C (TnC), a subunit of the troponin complex, plays a key role in the regulation of contraction, acting as a Ca^{2+} sensor to switch on tension development when the Ca^{2+} concentration rises. TnC is a dumbbell-shaped protein, with two globular heads linked by a central α -helix (7, for review). Each globular head is made up of two Ca^{2+} EF hand domains : the two high affinity carboxyterminal sites III and IV keep TnC bound to the thin filament (32), while the two low affinity aminoterminal sites I and II regulate muscle contraction (21). This protein exists in two isoforms, a fast isoform (TnCf) found in fast skeletal muscles and a slow isoform (TnCs), lacking regulatory site I, found in cardiac and slow skeletal muscles. Unloading conditions induced by real or simulated microgravity have been demonstrated to cause not only a clear atrophy of the slow antigravitational muscle fibers, but also a shift in their functional and biochemical properties from a slow toward a faster phenotype (9, 23). The changes in MHC isoform expression have been well defined (3, 26), and transitions and coexpressions of MHC leading to hybrid fibers are now well documented (24). However, few papers have reported the effects of unloading on regulatory proteins : the expression of troponin T and I was demonstrated to be modified after HU (5), but no information is actually available on the TnC isoform, shown to be involved in the Ca^{2+} dependence of tension development (1, 18).

The aim of our study was to examine the implication of TnC and the eventual transitions in the TnC isoform expression, in parallel with MHC and MLC transformations during changes that occurred in unloading conditions. The TnC content of single soleus muscle fibers was determined by immunoblotting and its functional behavior was probed using a pharmacological tool, bepridil (BPD). BPD is a Ca^{2+} sensitizer, which targets the TnC

molecule and stabilizes conformational changes that occur upon Ca^{2+} fixation, causing an increase in the apparent Ca^{2+} affinity by decreasing the Ca^{2+} off-rate (15). BPD has been shown to alter the affinity of the regulatory system differently in slow and fast fibers, the modulation of the contractile response being directly dependent on the TnC isoform (12, 13).

METHODS

Animals and muscle preparation

Experiments were carried out on soleus and tibialis anterior muscles of adult male Wistar rats. The experiments as well as the maintenance conditions of the animals received authorization from the Ministry of Agriculture and the Ministry of Education (veterinary service of health and animal protection, authorization 03805). A first group was subjected to 15-days of hindlimb unloading (HU) using the model of Morey (17). This model consisted of tail suspension of rats in order to mimic microgravity effects. The second group was composed of non-suspended animals used as control. The two groups of animals were matched for age and weight.

Soleus and tibialis muscles were removed from the control and suspended rats, anaesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (3 mg.kg^{-1}). After removal, the muscles were either homogenized (whole muscle results) or chemically skinned as previously described (31). The skinned muscles were stored at -20°C for up to 2 months, in a 50 / 50 glycerol/skinning solution (storage solution), containing protease inhibitor leupeptin ($1\mu\text{g/ml}$). Some fibers were examined for calcium activation characteristics as well as TnC composition, whereas others were examined for TnC composition only.

Electrophoresis

Muscles - Soleus muscles from control and HU animals were homogenized in EDTA buffer (6.35 mM, pH 7.0) and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. The pellet was washed twice in a 50 mM KCl buffer, and dissolved in SDS sample buffer without 5% β -mercaptoethanol (62.5 mM Tris-HCl, 10% glycerol (v/v), 2% SDS (w/v), 0.02 bromophenol blue (w/v), pH 6.8). The protein concentration was determined using the Lowry protein estimation method (14) before addition of 5% β -mercaptoethanol (v/v) to the sample buffer and stored at -80°C.

Fibers - Fibers were randomly removed from either control or HU skinned soleus and tibialis muscles. pCa-tension (pCa/T) (tension versus Ca^{2+} concentrations) relationships were established on some of these fibers. Then, all fibers were dissolved in 20 μ l sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer, heated at 90°C for 3 minutes and stored at -80°C until electrophoretic analysis.

The MHC composition of whole soleus muscles was determined by SDS-PAGE on 7.5 % silver stained slab gels (30). Separation of MHC and TnC isoforms of whole soleus muscles and single muscle fibers was performed by SDS-PAGE using 10-20 % linear gradient gels (29). Proteins were reversibly stained with Sypro Orange dye (Molecular Probes, Eugene, USA) and revealed under a 315 nm UV transilluminator, before immunoblot.

In the single fibers, the identification of the TnC isoform was complemented by determination of the MLC isoform content (see below). MLC was considered instead of MHC since it was impossible to perform both analyses because of the very low amounts of biological material available (especially from atrophied fibers), even using highly sensitive detection methods.

Immunoblotting

Electrotransfer was performed to a 0.2 μm nitrocellulose sheet (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membranes were blocked with a phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4) containing 5 % non-fat dry milk and 0.2 % sodium azide. The TnC isoforms were localized by a cardiac mouse monoclonal antibody (NCL Trop-C, Novocastra, UK), incubated overnight. This antibody recognized slow skeletal TnC isoform, but cross-reacted with fast skeletal TnC (29). TnC antibodies were detected by an extravidin/biotin peroxidase staining kit, and visualized by an enhanced chemi-luminescence (ECL) kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA), to ensure optimal protein detection. Signal intensities were evaluated by densitometry (GS-700 Imaging Densitometer, Biorad, Ivry s/ Seine, France).

The profile of TnC expression was determined by measuring the relative proportions of the TnC signals of fast and slow isoforms, respectively. In the whole study, fiber type was based on TnC content of the fibers. The fibers considered as hybrid for the TnC expression were classified as hybrid slow (HS) or hybrid fast (HF). However, it should be stated that the antibody recognized preferentially the slow isoform. Fibers showing a TnCf signal higher than TnCs signal were thus unambiguously classified as hybrid fast fibers. In order to avoid an overestimation of hybrid slow fibers due to the preferential recognition of the slow isoform, we checked the MLC expression for the fibers which expressed a signal ratio TnCs/TnCf higher than 1 : fibers expressing predominantly slow MLC isoforms were kept and classified as hybrid slow, while fibers that expressed preferentially fast MLC isoforms were discarded. However, discrepancy between TnC and MLC predominant isoform expressions did not exceed 5 % of the fibers.

Force measurements and recording

The experiments were carried out in a thermostatically controlled room ($19 \pm 1^\circ\text{C}$). A 2-2.5 mm fiber segment was connected, in an experimental chamber under constant stirring, to a force transducer (Fort 10, WPI, Aston, UK). The sarcomere length (SL) was determined by diffraction using a Helium/Neon laser (Spectra Physics, Carlsbad, USA). To allow maximal isometric tension development upon ionic activation, the fiber was stretched to 2.60 μm , this SL being readjusted if necessary during the experiment. In order to eliminate a potential effect of the sarcoplasmic reticulum on the tension developed by the myofilaments, each fiber was bathed for 20 minutes in a Brij solution made up of 2 % Brij 58 (polyoxyethylene 20 cetyl ether) in relaxing solution.

Experimental protocol

The experimental sequence was defined as described previously (12). Briefly, the fiber was activated to a tension level (P) in a given pCa (with $\text{pCa} = -\log[\text{Ca}^{2+}]$) solution, immediately followed by a maximal contraction (P_0) ensured by the application of a pCa 4.2 solution. This procedure allowed to calculate the relative tension P/P_0 , from pCa 7.0 to 4.2 with a step equal to 0.2 and to establish the pCa-tension (pCa/T) curves. The steepness of the pCa/T curve was determined by the Hill coefficients n_H , either n_1 or n_2 , calculated according to the following equation (2): $P/P_0 = ([\text{Ca}^{2+}]/K)^{n_H} / [1 + ([\text{Ca}^{2+}]/K)^{n_H}]$, where P/P_0 is the normalized tension and K is the apparent dissociation constant ($\text{pK} = -\log K = \text{pCa}_{50}$). n_1 corresponded to $P/P_0 > 50\%$; and n_2 to $P/P_0 < 50\%$ (19). For the pCa/T + BPD relationship determination, 100 μM BPD were added in each pCa solution, as previously described (12). To quantify the shift that occurred when BPD was added to the activating solution, we defined a Δ_r which represented the shift expressed in pCa units at r percent of relative tension. In our analyses, we measured Δ_{10} , Δ_{50} and Δ_{90} . Δ_{10-90} was representative of the extent of

cooperativity alteration in the presence of the drug. Half maximal activation in the presence of strontium ions (pSr_{50}) was also determined, to establish the Δ' parameter, corresponding to the difference between pCa_{50} and pSr_{50} values. The Δ' criterion allowed a functional identification of the fiber (either slow or fast phenotype), since fast muscle fibers are less sensitive to Sr^{2+} than slow fibers (11).

Fibers were rejected if force declined during a sustained contraction or decreased by more than 20 % during the whole experiment, and if the pCa/T series (with and without BPD) were not completely achieved. The proportion of fibers tested for their Ca^{2+} activation characteristics does not reflect the fiber type composition at the whole muscle level.

Solutions

All reagents without indications were provided by Sigma (St Louis, USA). The composition of all the solutions was calculated by the Fabiato computer program (6). The program calculation was used with stability constants listed for Ca^{2+} (20) and for Sr^{2+} (16), to keep final ionic strength at 200 mM. pH was adjusted to 7.0 and ATP at 2.5 mM was added to each solution. The skinning solution was made up of 3-(N morpholino) propanesulfonic acid (MOPS, 10 mM), potassium propionate (K Prop, 170 mM), magnesium acetate (MgAc, 2.5 mM) and EGTA (5 mM). The following solutions were used for the T/pCa curve determination : a washing solution (W), composed of MOPS (10 mM), K Prop (185 mM) and MgAc (2.5 mM) ; a relaxing solution (R) identical to the skinning solution ; pCa activating solutions consisting of W solution + various concentrations of free Ca^{2+} from $CaCO_3$, buffered with EGTA and added in proportions to obtain the different pCa values (7.0 to 4.2). The pSr solutions were similar to the pCa solutions except free Sr^{2+} from $SrCl_2$. BPD was prepared fresh each day and used as a 20 mM stock solution in absolute ethanol. At concentrations used, ethanol itself had no effect on the developed tensions (data not shown).

Statistical analysis

All the data were reported as means \pm SEM. The statistical significance of the difference between means was determined using the Student's *t* test or paired *t* test when data were obtained from the same fiber in different experimental conditions. Difference at or above the 95 % confidence level were considered significant.

RESULTS

Structural analysis

TnC and MHC changes at the whole muscle level

Figure 1A shows the expression of slow and fast MHC and TnC proteins in whole soleus control muscles (n=3, average weights : 0.47 ± 0.001 mg per g animal weight). The slow isoforms of these proteins were largely predominant, with only small amounts of MHC IIa (9.9 ± 4.7 % of the total MHC expression) and TnC fast (12.2 ± 2.9 % of the total TnC signal). Fig. 1B illustrates modifications in the expression of MHC and TnC proteins in soleus muscles submitted to unloading conditions (n = 3). These muscles displayed a significantly lower average weights (0.21 ± 0.004 mg per g animal weight). Fast MHC isoforms were more abundant in these muscles when compared to control conditions, with an increase in MHC IIa up to 23.9 ± 4.4 % and the appearance of MHC IId/x and IIb (15.5 ± 4.5 % and 4.9 ± 1.9 %, respectively). TnC expression was changed by HU, the TnC fast signal rising up to 22.5 ± 1.9 % . This represented approximately a two fold increase of the TnCf isoform signal when compared to control conditions.

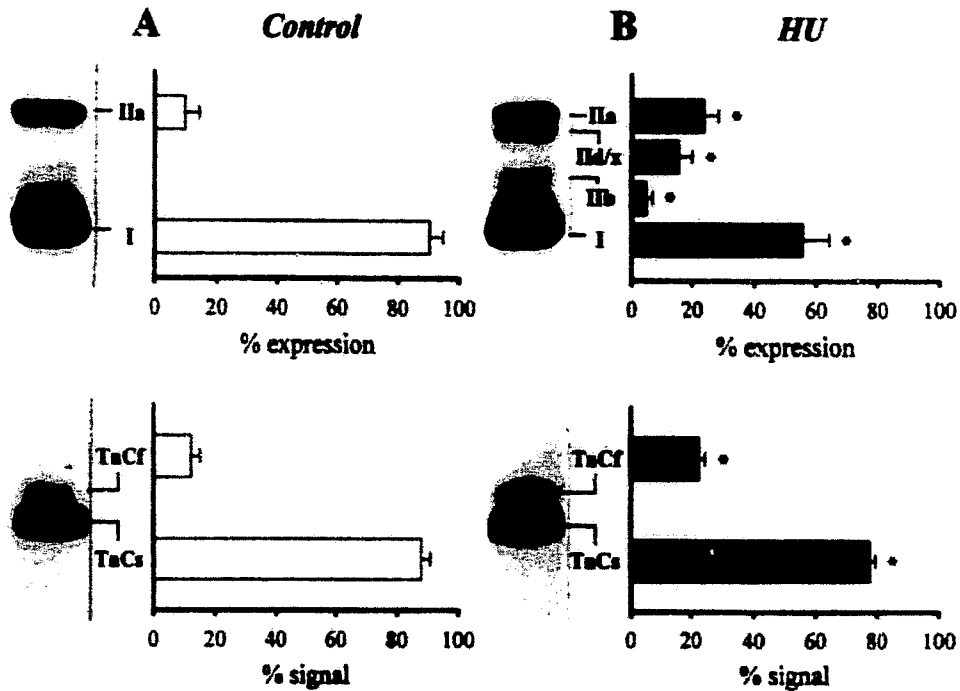


Fig. 1 : Expression profiles of MHC and TnC isoforms in whole muscles, in control conditions (A) and after hindlimb unloading (B).

MHC isoform compositions (5 μ g prot/lane) from muscles in each condition (control and HU) are shown in percentage of isoform expression. TnC isoform compositions (20 μ g prot/lane) from the same muscles are expressed in percentage of signal (see Methods). Illustrated MHC (from silver stained gels) and TnC (from ECL hyperfilms) bands are representative of the results obtained. * : significant difference between HU and control conditions.

TnC and MLC expressions at the single fiber level

Distributions of the MLC and TnC isoforms, analysed on the same gel for each single fiber, are represented in Fig. 2. As indicated in the methods, the MLC profiles were used for a clear discrimination between HS and HF fibers. In control conditions, we showed either an expression of TnCs alone (fibers classified as slow, lane 2), or a coexpression of both slow and fast isoforms, in fibers classified as HS (predominant expression of TnCs and slow MLC, lane 3) or HF (predominant expression of TnCf and fast MLC, lane 4). The proportions of these slow, hybrid slow and hybrid fast fibers in the control muscles were 74, 10 and 16 %, respectively (n = 80 of 3 different muscles). Fibers expressing TnC fast alone were never found in these control muscles.

After 15 days of HU, the TnC expression profiles of 88 fibers (of 3 different muscles) were established : we found that TnCs was expressed alone (slow fibers) or coexpressed with TnCf in hybrid fibers (HS or HF, depending on the predominant TnC isoform in the fiber). The proportions of slow, hybrid slow and hybrid fast fibers in HU muscles were 45, 10 and 45 %, respectively. The expression of TnCf alone was never observed in HU fast fibers.

Ca²⁺ activation properties

Control fibers – Slow, hybrid slow and hybrid fast fibers had no significant differences in their diameter and tensions normalized to cross-sectional area (Fig. 3). As previously described, BPD had no effect on maximal tensions (data not shown). Ca²⁺ activation parameters of all fiber types are reported in Table 1.

BPD increased the submaximal tensions and thus induced a shift of the pCa/T relationship of all fiber types toward lower Ca²⁺ concentrations (Fig. 4). The Ca²⁺ activation properties of hybrid slow fibers did not differ significantly from those found for the slow fibers, in the absence as well as in the presence of BPD. The shift induced by BPD in these

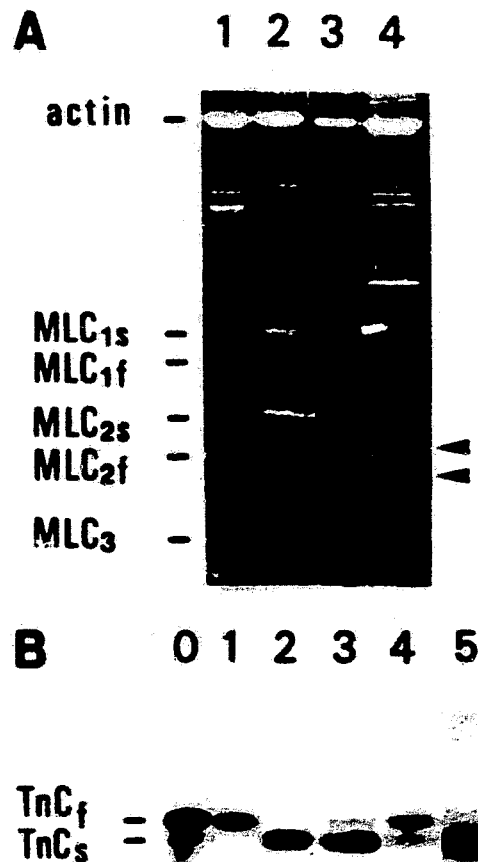


Fig. 2 : Expression profiles of MLC (A) and TnC (B) at the single fiber level.

A : Gels stained with Sypro Orange. Only the low molecular weight regions are shown. The location of fast and slow TnC isoforms is determined by immunoblot and indicated by arrows.

B : ECL detection of TnC isoforms (only the region of TnC is shown).

Lane 0 : TnC extract ; lane 1 : tibialis anterior ; lane 2 : slow soleus fiber ; lane 3 : hybrid slow (HS) soleus fiber ; lane 4 : hybrid fast (HF) soleus fiber ; lane 5 : rat heart.

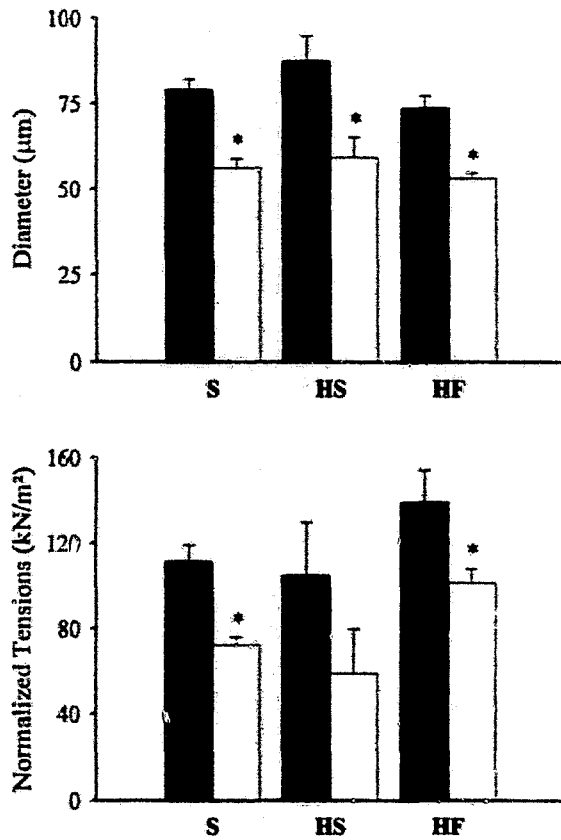


Fig. 3 : Diameter (A) and normalized tensions (B) of soleus fibers, in control conditions (Cont) and after hindlimb unloading (HU).

S, HS and HF designate slow, hybrid slow and hybrid fast fibers, respectively. Black bars and empty bars represent Cont and HU conditions, respectively.

* : significant difference between HU and control conditions.

	Slow fibers	Hybrid slow fibers	Hybrid fast fibers	
	Cont (n=15)/HU (n=11)	Cont (n=3)/HU (n=4)	Cont (n=10)/HU (n=12)	
No BPD	pCa thr.	6.64±0.03 / 6.53±0.03*	6.73±0.07 / 6.28±0.02*	6.11±0.02 / 6.08±0.02
	pCa ₅₀	5.87±0.01 / 5.84±0.02*	5.88±0.01 / 5.73±0.06	5.67±0.01 / 5.65±0.01
	n ₁	1.81±0.09 / 2.50±0.14*	1.66±0.08 / 2.94±0.24*	3.94±0.19 / 4.41±0.23
	n ₂	2.88±0.19 / 3.08±0.15	2.68±0.11 / 3.46±0.41	5.09±0.18 / 4.89±0.19
With BPD	pCa thr.	7.13±0.05† / 7.09±0.03†	7.08±0.08† / 6.9±0.1†	6.24±0.02§ / 6.28±0.03†
	pCa ₅₀	6.09±0.02† / 6.05±0.03†	6.12±0.02† / 6.05±0.04†	5.81±0.01§ / 5.78±0.01†
	n ₁	1.23±0.05† / 1.40±0.05†	1.34±0.08† / 1.35±0.12†	3.89±0.19 / 3.80±0.19
	n ₂	1.93±0.14† / 1.91±0.11†	1.83±0.09† / 2.04±0.3†	4.73±0.24 / 4.53±0.20

TABLE 1 : Calcium activation characteristics of the soleus muscle fibers

n, number of fibers ; pCa thr, threshold for Ca²⁺ activation ; pCa₅₀, pCa at which tension is half maximal ; n₁ and n₂, Hill coefficient for P/P₀ > 50 % and P/P₀ < 50 %, respectively.

* indicates significant difference between control and hindlimb unloading (HU, symbols reported in HU columns) for slow or fast fibers. † indicates significant difference between No BPD and With BPD conditions (symbols reported in « With BPD » values).

slow and hybrid slow fibers was dependent on the calcium concentration, the larger effect of the drug being obtained at lower Ca^{2+} levels. Indeed, the Δ_{10-90} parameter was equal to 0.36 ± 0.04 for S and 0.37 ± 0.01 for HS fibers (Table 2).

Compared to the pCa/T relationships of S fibers, the HF ones exhibited a higher pCa threshold (lower pCa values), higher slopes (Hill coefficients n_1 and n_2), and their pCa/T relationship was shifted toward higher Ca^{2+} concentrations by 0.2 pCa units at half maximal activation. The shift induced by BPD was quite independent of the Ca^{2+} concentration in these hybrid fast fibers. Thus, the pCa/T curves in the absence and in the presence of BPD were quite parallel, as revealed by similar Hill coefficients (Table 1) and Δ_{10-90} (Table 2), the shift being less important when compared to the slow or hybrid slow fibers (0.14 ± 0.01 pCa units in the linear part of the curve vs. 0.24 ± 0.02 for the slow fibers). Moreover, BPD reactivity appeared similar to that seen in fast fibers from tibialis anterior (expressing only TnCf), represented in Fig. 4D.

HU fibers – Slow, hybrid slow and hybrid fast HU fibers were found to develop lower normalized tensions than their respective controls, the averaged diameter being significantly decreased after the HU period. No change in maximal tension appeared in the presence of BPD (data not shown). The pCa/T relationships are reported in Fig. 4 (open symbols). No differences appeared between hybrid fast fibers in control and HU conditions, neither in the absence nor in the presence of BPD (Fig. 4C and Table 2). The pCa/T relationship of slow HU fibers was different from the pCa/T of control fibers: the pCa threshold and pCa₅₀ values were lowered and n_1 (Hill coefficient corresponding to $P/P_0 > 50\%$) was largely increased. In the presence of BPD, the pCa/T relationship merged with that obtained in control conditions for slow fibers (Fig. 4A). Ca^{2+} activation characteristics of hybrid slow muscle fibers were modified toward a faster phenotype after HU: pCa threshold and pCa₅₀ values were lowered, while the Hill coefficients were increased. Thus, the pCa/T curve of HS fibers after HU could

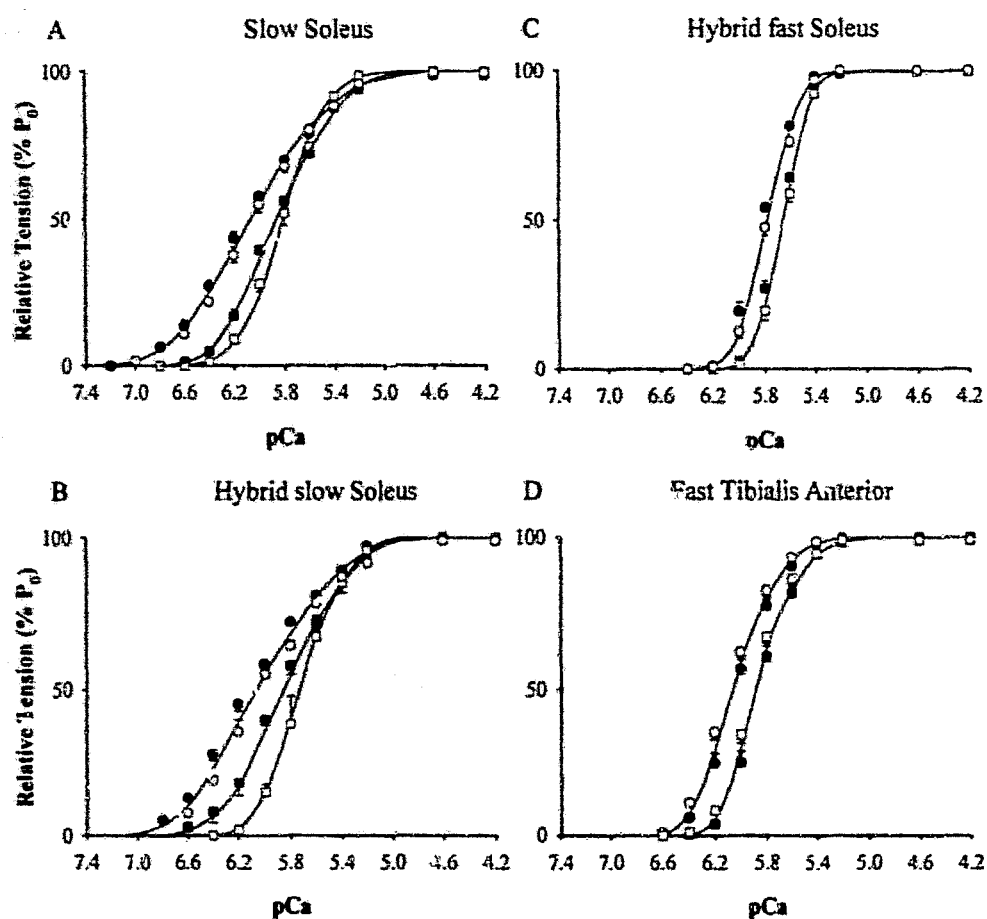


Fig. 4 : pCa-tension relationships

pCa/T relationships of slow soleus fibers (A), hybrid slow soleus fibers (B), fast soleus fibers (C), and fast tibialis muscle fibers (D), in control (filled symbols) and in HU conditions (empty symbols). Symbols are : ■ pCa, ● pCa + BPD for the control fibers, □ pCa, ○ pCa + BPD for the HU fibers.

	Slow fibers	Hybrid slow fibers	Hybrid fast fibers
	Cont / HU	Cont / HU	Cont / HU
Δ'	0.25±0.02 / 0.20±0.02	0.29±0.02 / 0.29±0.09	1.14±0.03 / 1.08±0.04
Δ_{10-90}	0.36±0.04 / 0.46±0.04	0.37±0.01 / 0.56±0.08	0.04±0.01 / 0.06±0.01

TABLE 2 : Delta (Δ) values of the soleus muscle fibers

Δ' , pCa₅₀-pSr₅₀; Δ_{10-90} , $\Delta_{10-\Delta_{90}}$, Δ being the shift of the pCa/T curve induced by bepridil (expressed in pCa units) at 10 and 90 % normalised tensions.

be considered as intermediate between the curves of S and HF soleus fibers. It is noteworthy that the pCa/T curve established in the presence of BPD was not significantly different from the control HS curve, and thus not different from the control S fibers.

DISCUSSION

This study reported, for the first time, the distribution of TnC isoforms in soleus muscles at the single fiber level, in control and HU conditions, and showed that HU induced changes in the TnC expression. A major point raised by our data is the limited transitions in the TnC expression in soleus fibers, which acquired typical fast Ca²⁺ activation properties.

TnC expression

In homogenized slow postural soleus muscles, TnCf is expressed in low amount (Fig. 1). To define the distribution of TnCf among fibers, we achieved a detailed study at the single muscle fiber level. We showed that TnC slow was either expressed alone (slow fibers) or coexpressed with TnCf in hybrid fibers (hybrid slow or hybrid fast fibers, depending on the predominant isoform).

In good agreement with the literature, we reported changes in the MHC content of the atrophied soleus muscle after HU, with an increase in MHC IIa and the appearance of MHC IIc/x and IIb. The modifications in MHC expression pattern and averaged weights after HU attested that the phenotypic transformations had occurred. Moreover, we showed modifications in the TnC expression, the TnC fast signal being almost two fold higher after HU. This increase in fast isoform expression of TnC might be attributed either to a slow to fast switch of TnC expression leading to an expression of TnCf alone in transformed fibers, or to an increase in the number of hybrid fibers, or both. The study at the single fiber level showed an increase in the proportions of hybrid fast fibers : 45 % of the soleus fibers coexpressed TnCf with TnCs. It has previously been reported that soleus fibers never

expressed only fast MHC (25) : in the same way, we never found TnCf expressed alone in soleus fibers. Consequently, the low quantity of TnCf shown in homogenized control muscles must come exclusively from the hybrid fibers. In contrast, pure fast fibers (2 %, based on the MHC content) have been observed after a 14-day HU period (4). Similarly, after HU, an expression of TnT fast isoform alone was found in soleus muscle (5). Therefore, our data suggested that the TnC transitions were more moderated or appeared with lower kinetics than those of other contractile proteins such as MHC and TnT.

Function : behavior of TnC in both experimental conditions

Similar relative Ca^{2+} and Sr^{2+} affinities and similar sensitivity to BPD were found for S and HS fibers. This indicated that in HS fibers, the presence of TnCf at a lower level than TnCs did not influence the Ca^{2+} activation characteristics. They were identical to those found in pure slow fibers (with TnCs alone), a result which suggested that functional properties related to TnC are dependent on the TnC isoform predominantly expressed.

After HU, both diameter and normalized P_0 were decreased in slow and fast fibers, as previously described, and illustrated the altered protein turnover in unweighted muscles that led to protein loss (28, for review) and that occurred preferentially in muscles involved in weight bearing (8, 9, 27). Our data showed that the pCa/T relationships of slow fibers were modified : the sensitivity (pCa threshold) and the affinity (pCa₅₀) were lowered, while the cooperativity (Hill coefficients) was increased. Activation properties (TnC behavior) of these fibers were found to be identical to those obtained in control conditions (HU pCa/T + BPD and control pCa/T + BPD curves merged) ; it is therefore unlikely that TnC could account for the changes in Ca^{2+} activation characteristics shown in the absence of BPD. Since neither TnC expression, nor TnC behavior were altered, other regulatory proteins may be involved in these functional changes, troponin T for instance (5, 10, 22).

For the hybrid fast fibers, which are mainly transformed fibers (16 % in control vs. 45 % in HU conditions), the Ca^{2+} activation properties became identical to those of control fast fibers, since the pCa/T relationships, the Sr^{2+} and BPD sensitivities of control and HU fast fibers were not different. Therefore, we gave evidence that the effects of HU consisted of a transition from a slow type (TnCs only and pCa/T relationship typical of control slow fibers) to a fast type (TnCf coexpressed in a predominant proportion with TnCs and pCa/T relationship typical of control fast fibers).

To conclude, we showed a modification in TnC expression in HU muscles. The presence of TnCf was always associated with a coexpression of TnC slow in both control and HU fibers, but the proportions of hybrid fast fibers increased after HU. These fibers displayed functional properties similar to control fast fibers. The remaining slow fibers, on the contrary, presented modifications that could not be attributed to TnC. Thus, further studies will be necessary to determine the implication of other regulatory proteins in the functional changes that occurred after HU.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES, grant n°993027), the Fonds Européen de Développement Régional F007, and the Nord Pas-de-Calais Regional Council.

REFERENCES

1. Babu A, Scordilis SP, Sonnenblick EH, and Gulati J. The control of myocardial contraction with skeletal fast muscle troponin C. *J Biol Chem* 262: 5815-5822, 1987.

2. Brandt PW, Cox RN, Kawai M and Robinson T. Effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca^{2+} sensitivity. *J Gen Physiol* 79: 997-1016, 1982.
3. Caiozzo VJ, Baker MJ, Herrick RE, Tao M, and Baldwin KM. Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J Appl Physiol* 76: 1764-1773, 1994.
4. Caiozzo VJ, Baker MJ, and Baldwin KM. Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol* 85: 2237-2248, 1998.
5. Campione MS, Ausoni S, Guezennec CY, and Schiaffino SJ. Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 74: 1156-60, 1993.
6. Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol* 157: 378-417, 1974
7. Farah CS, and Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J* 9: 755-767, 1995.
8. Flynn DE, and Max SR. Effects of suspension hypokinesia/hypodynamia on rat skeletal muscle. *Aviat Space Environ Med* 56: 1065-1069, 1985.
9. Gardetto PR, Schluter JM, and Fitts RH. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 66: 2739-2749, 1989.
10. Greaser ML, Moss RL and Reiser PJ. Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *J Physiol*, 406: 85-98, 1988.
11. Kerrick WGL, Malencik DA, Hoar PE, Potter JD, Coby RL, Pociwong S, and Fischer EH. Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflügers Arch* 386: 207-213, 1980.

12. Kischel P, Stevens L, and Mounier Y. Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles. *Br J Pharmacol* 128: 767-773, 1999.
13. Kischel P, Bastide B, Stevens L, Potter JD and Mounier Y. Troponin C isoform is responsible for the differential effect of the Ca²⁺ sensitizer bepridil in slow and fast fibres. *Pflügers Arch* 440: R264, 2000.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
15. Mac Lachlan LK, Reid DG, Mitchell RC, Salter CJ, and Smith SJ. Binding of a calcium sensitizer, bepridil, to cardiac troponin C. A fluorescence stopped-flow kinetic, circular dichroism, and proton nuclear magnetic resonance study. *J Biol Chem* 265: 9764-9770, 1990.
16. Moisescu DG, and Thieleczek R. Sarcomere length effects on the Sr²⁺- and Ca²⁺-activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochem Biophys Acta* 546: 64-76, 1979.
17. Morey ER. Space flight and bone turnover: correlation with a new model of weightlessness. *Bioscience* 29: 168-172, 1979.
18. Moss RL, Lauer MR, Giulian GG and Greaser ML. Altered Ca²⁺ dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibers following modifications of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J Biol Chem*, 261: 6096-6099, 1986.
19. Moss RL, Swinford AE and Greaser ML. Alterations in the Ca²⁺ sensitivity of tension development by single skeletal muscle fibers at stretch lengths. *Biophys J*, 43: 115-119, 1983.
20. Orentlicher M, Brandt PW, and Reuben JP. Regulation of tension in skinned muscle fibers : effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am J Physiol* 233: C127-C134, 1977.

21. Potter JD, and Gergely J. 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.
22. Schachat FH, Diamond MS and Brandt PW. Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J Mol Biol*, 198: 551-554, 1987.
23. Stevens L, Mounier Y, and Holy X. Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am J Physiol* 264: R770-R776, 1993.
24. Stevens L, Sultan KR, Peuker H, Gohlsch B, Mounier Y, and Pette D. Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C1044-C1049, 1999.
25. Stevens L, Gohlsch B, Mounier Y, and Pette D. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in single fibers of unloaded rat soleus muscle. *FEBS Lett* 463: 15-18, 1999.
26. Talmadge RJ, Roy RR, and Edgerton VR. Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J Appl Physiol* 81: 2540-46, 1996.
27. Templeton GH, Sweeney HL, Timson BF, Padalino M, and Dudenhoefter GA. Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 65: 1191-1195, 1988.
28. Thomason DB, and Booth FW. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 68: 1-12, 1990.
29. Toursel T, Bastide B, Stevens L, Rieger F, and Mounier Y. Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in Wobbler mouse muscles. *Exp Neurol* 162: 311-320, 2000.
30. Wada M, Hamalainen N, and Pette D. Isomyosin patterns of single type IIB, IID and IIA fibers from rabbit skeletal muscle. *J Muscle Res cell Motil* 16: 237-242, 1995.

31. Wood DS, Zollman J, Reuben JP, Brandt PW. Human skeletal muscle ; properties of the « chemically skinned » fiber. *Science* 187: 1075-1076, 1975.
32. Zot HG, and Potter JD. A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} 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.

Soumis le 25 Juillet 2000, accepté le 26 Septembre 2000.

L'évolution de l'expression et du fonctionnement de la TnC a pu être caractérisée sur le muscle extenseur soleus de rat en condition d'H-H (microgravité simulée). Nous avons eu l'opportunité de participer à un vol spatial (BION 11) au début de nos expériences utilisant le bédridil. Le volet qui suit permet donc de comparer les effets respectifs de la microgravité réelle et de la microgravité simulée. L'étude est effectuée sur un muscle de l'avant bras du singe, le triceps, extenseur au même titre que le soleus dans le membre postérieur. En effet, le typage de ces deux muscles est très proche. Le triceps de singe dans sa partie profonde le long de l'humérus (où ont été prélevées nos biopsies) comprend 88 % de fibres de type I, 2 % de IIa et 10 % de fibres hybrides (Desplanches et coll., 1998). La composition du soleus de rat que nous avons déterminée (81 % I, 12.8 % IIa et 6.5 % hybrides, Picquet et coll., 2000) est en accord avec les résultats de nombreux auteurs. Elle est elle-même très voisine de celle décrite pour le soleus de singe (79 % de fibres de type I, 12 % de fibres de type IIa et 9 % de fibres hybrides, Fitts, 1998). Il est à souligner que ces muscles, les soleus de singe et de rat et le triceps de singe n'expriment que la MHCIIa comme isoforme rapide sur les animaux contrôles. Par ailleurs, ce vol nous a permis de distinguer l'effet propre de la microgravité de celui dû à une immobilisation et de discerner le rôle d'autres protéines régulatrices du filament fin dans les transformations fonctionnelles. Les résultats de cette étude sont exposés dans l'article : "Plasticity of monkey triceps muscle fibers in microgravity conditions", en cours de révision pour J. Appl. Physiol.

**Plasticity of monkey triceps muscle fibers in
microgravity conditions**

KISCHEL P., STEVENS L., MONTEL V., PICQUET F., AND Y. MOUNIER

*Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire, Université des Sciences et Technologies de
Lille 1, Bâtiment SN4, F - 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex*

ABSTRACT

We examined the changes in functional properties of triceps brachii skinned fibers from monkeys flown aboard BION 11 satellite during 14 days and after ground-based arm immobilization. The composition in myosin heavy chain (MHC) isoforms allowed the identification of pure fibers containing MHCI (slow, S) or MHCIIa (fast, F) isoforms, or hybrid fibers coexpressing predominantly slow (hybrid slow, HS) or fast (hybrid fast, HF) MHC isoforms. After flight, the ratio HS fibers/whole slow population was higher (28 %) than that of the control population (7 %), and the number of fast fibers was increased (up to 86 % in flight versus 12 % in control). Diameters and maximal tensions of slow fibers were decreased after flight. The Tension/pCa curves of slow and fast fibers were modified, with a decrease in pCa threshold and an increase in steepness. The proper effect of microgravity was distinguishable from that of immobilization, which induced less marked slow-to-fast transitions (only 59 % of fast fibers) and altered differently the Tension/pCa relationships.

Keywords : microgravity, skinned muscle fibers, atrophy, contractile proteins, MHC, Ca²⁺ affinity.

INTRODUCTION

Previous findings on animals exposed to microgravity or simulated non-weight-bearing conditions have shown that there is a marked atrophy of some hindlimb muscles. For instance, studies on rat muscles after different spaceflights demonstrated that microgravity induced small effects on flexors, such as Extensor Digitorum Longus and Tibialis Anterior, but a spectacular atrophy of slow-twitch extensors such as the soleus. Our experiments performed after those flights showed that this atrophy was characterized by a decrease in fiber diameter and isometric force and accompanied by slow-to-fast changes in contractile properties (10, 18) and in myosin isoform composition. These results were confirmed by numerous studies (1, 4, 8).

Since some biosatellites, it has been shown that primates could afford an excellent opportunity to study the effects of microgravity on the neuromuscular system (2). Indeed, monkeys appear to be a suitable model for investigating muscle contractile and biochemical properties, as well as other activities, such as work capacity and EMG recording. Previous studies, particularly histochemical ones, have shown that extensor and flexor muscles from monkey upper limbs participated in different functions (15). For instance, extensors have a relatively greater potential for force production and force maintenance than flexors.

In this study, we examined the effects of microgravity induced by exposure of monkeys to 14 day-BION 11 spaceflight on the triceps brachii muscle (caput medialis). Triceps muscle, an upper-limb extensor, is composed of a large proportion of slow fibers in its deepest zone. Our objectives were to characterize for the first time the contractile properties of the extensor triceps muscle. Moreover, this work permitted to analyze on this muscle the effects of microgravity, and to compare them i) with data obtained on extensors from other species such as rat soleus muscles ; and ii) with data obtained on monkey soleus muscle, a hindlimb extensor, reported by Fitts' group (7, 8) after the same spaceflight. Finally, this spaceflight

offered the opportunity to distinguish some specific effects of microgravity from those which resulted of confinement or immobilization conditions generally associated with space environment.

We demonstrated that functional modifications occurred after this spaceflight. They consisted of an atrophic process more marked on slow-type fibers, a decrease in force associated to a decrease in Ca^{2+} affinity of the contractile system, and slow-to-fast changes in myosin-based fiber typing. These effects were distinguishable from those due to arm immobilization, since in the latter case no atrophy and no change in the steepness of the Tension/pCa relationships were observed. Therefore, the implication of the different regulatory contractile proteins was discussed.

METHODS

Animals. The experiments reported here were performed on Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) weighing from 3.7 to 4.8 kg at the time they were selected (about 5 months before the flight). They were divided into four groups. The first group (CONT group) included 11 monkeys on which biopsies were taken 5 months before launch. Based on results after the preliminary tests required by the different investigators, two monkeys (357 and 484) were selected to be flown aboard the BION 11 satellite during 14 days (second group, designed as FLIGHT). One day immediately after landing, a second biopsy was taken. The third group consisted in cage growth-control (GROWTH) monkeys from the initial control pool, specially devoted to discriminate the eventual proper effects of growth, 5 months separating the control and the flight biopsies. Four animals were selected and kept in cages : two were biopsied at the time of launch (470 and 513) and two others, two days after landing (474 and 503). The fourth group included arm-immobilized (IMMO) animals ($n = 3$). They were used as ground-based simulation controls (447-501-534) and were placed in a mock-up flight capsule

simulating flight conditions i.e. temperature, sound etc. These animals were not only submitted to restraint conditions in the seats but had the upper part of their right arm maintained close to the body. The aim of this arm-immobilization was to oblige the monkeys to work with their left arm during the flight in order to perform different tests necessary for EMG recordings. Therefore, their right arm was submitted to both microgravity and reduced activity.

Biopsies. Muscle biopsies (~ 20-30 mg) were surgically taken on triceps brachii (caput medialis) from the upper limb of the different monkeys. All the biopsies were taken in the deepest portion of the midbelly zone of the triceps. In normal conditions, the deep triceps contained a majority of slow fibers. Another investigator, D. Desplanches (3), using ATPase staining, measured on the same biopsies the proportion of type I fibers on the CONT monkeys (n = 11) with a mean value of 88.33 ± 3.45 % and percentages of IIa and IIb fibers equal to 9.95 ± 3.15 and 1.7 ± 0.57 %, respectively. For the two flight monkeys 357 and 484, the proportions of type I, IIa and IIb fibers were respectively, 82.4, 14.8, 2.8 and 88.0, 10.0 and 2.0.

Experimental procedures and solutions. The biopsies were chemically skinned by exposure to a "skinning solution" (22). The skinned biopsies were stored at -20°C in a 50 % glycerol – 50 % skinning solution. Experimental procedures and solutions have been described in detail in previous studies (12, 17). Briefly, a single skinned fiber was isolated from a biopsy and transferred to the experimental chamber. A segment, about 1.5 mm long, was mounted between a small fixed forceps and a force transducer (Fort 10, WPI, Aston, UK). All the experiments were performed at $19 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Using the diffraction of a He-Ne laser beam, the sarcomere length (SL) was adjusted to $2.90 \mu\text{m}$ and controlled during the experiments. At this SL, the optimal isometric force could be elicited. The diameter of each fiber was measured using a binocular micrometer (x 80). The skinned fiber was activated with

various concentrations of Ca^{2+} , buffered with ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N, N', N' - tetraacetic acid (EGTA) and expressed as pCa values ($\text{pCa} = -\log [\text{Ca}^{2+}]$). The composition of the solutions was calculated by the computer program of Fabiato (5). After exposure to each pCa, a maximal tension (P_0) was elicited using a fully activating calcium concentration (pCa 4.2). This allowed the calculation of the relative isometric force (P/P_0). Then, a relaxing solution (R) was applied and the fiber was washed to eliminate the EGTA traces from the R solution before starting a new tension activation. The relations between the relative isometric forces (P/P_0) and the different pCa were given by the Tension/pCa (T/pCa) curves. After a succession of Ca^{2+} activations, a new range of tensions was obtained using another divalent cation, Sr^{2+} , and T/pSr curves were established as for T/pCa. This protocol was performed in order to identify the fiber type (see below). From the T/pCa and T/pSr relationships, several characteristics could be derived, including the pCa_{50} and pSr_{50} (calcium or strontium concentrations that induce 50 % of maximum Ca^{2+} and Sr^{2+} tension responses, respectively). These characteristics described the affinity of the contractile system for Ca^{2+} and Sr^{2+} . Other parameters derived from the T/pCa curves were used: the threshold for activation by Ca^{2+} (pCa_{thr}) and the steepness of the curves, indicated by the Hill coefficient (n_H). The protocol for data fitting to the Hill equation has been previously described (10).

Fiber type identification. As described in our previous studies (18, 20), fiber type was determined according to the difference of Ca^{2+} and Sr^{2+} activation characteristics between fast and slow skeletal muscle fibers. Indeed, it is generally assumed that fast skeletal muscle fibers are less sensitive to Sr^{2+} than slow fibers (6, 11, 19). The difference pCa_{50} - pSr_{50} (or Δ' criterion) is used to reflect the relative affinity of a fiber to Ca^{2+} and Sr^{2+} . Thus, in our experiments, a fiber showing a Δ' ranging from 0.1 to 0.3 was identified as slow type. On the contrary, a fast-type fiber could be characterized by a Δ' close to 1. Moreover, the pCa_{thr} ,

Monkey triceps adaptation to microgravity

pCa_{50} and n_H parameters also permitted to identify the fiber type. In slow fibers, pCa_{thr} and pCa_{50} values were higher (lower Ca concentrations) and n_H was lower than in fast fibers.

After physiological measurements (T/pCa, T/pSr), the composition in myosin heavy chain (MHC) of the fibers from the biopsies of the different monkeys was determined on a 7.5 % polyacrylamide slab gel (21). After the gel run, the gel slabs were silver stained. This protocol permitted to identify four MHC isoforms in rat muscles : the slow MHC I and the three fast MHC IIa, IIc/x, IIb. The electrophoresis was used here only to determine the fiber type, i.e. the proportions of pure and hybrid slow and fast fibers.

Statistical analysis. The data are presented as means \pm SE. The results were analyzed statistically using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni test, to estimate differences among means. The acceptable level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Since we did not have previous data relative to the characteristics of monkey triceps fibers, we chose to constitute large size samples of both slow and fast fibers and therefore to search fast fibers although they were rarely present (about 12 %, see Table 1 and Experimental Procedures section) in the deep part of the triceps from CONT monkeys. Therefore, the pools of slow and fast fibers were similar (52 and 48 fibers, respectively) and in order to give a correct typing of the triceps muscle, we reported in table 1 the data from Desplanches (3) obtained on the same triceps biopsies. For the IMMO and FLIGHT groups, the fibers were taken randomly within the different biopsies.

Fiber type identification : data on control monkeys. A total of 117 fibers was examined (at least 10 fibers were isolated from each of the 11 CONT monkeys).

Fibers were functionally classified as slow or fast according to the Δ' criterion. Their electrophoretical analysis revealed 4 groups defined according to their composition in slow

Table 1. *Fiber type proportions of control, arm immobilized, and flight monkeys*

		CONT	IMMO (447-534-501)		FLIGHT		
		11 monkeys	PRE	POST	PRE	POST	
					357 + 484	357	484
A	HS/WSP	7.1	7.6	33	6.6	24.8	28.2
		(n = 56)	(n = 17)	(n = 15)	(n = 14)	(n = 4)	(n = 7)
	HF/WFP	21.3	19	31.8	25	23.1	19.9
		(n = 61)	(n = 21)	(n = 22)	(n = 10)	(n = 26)	(n = 15)
B	S	<i>88.3</i>		27		10	22.9
	HS			13.5		3.3	9
	HF			18.9		20	13.6
	F	<i>11.6</i>		40.5		66.6	54.5

Fiber type proportions (expressed in %) of slow (S), hybrid slow (HS), hybrid fast (HF), fast (F) in the pool of 11 control monkeys (CONT) and individualized in groups of animals before (PRE) and after (POST) arm-immobilization (IMMO) or FLIGHT conditions. A : proportion of HS or HF fibers, respectively within the whole slow population (WSP) or the whole fast population (WFP) identified by SDS-PAGE and Sr⁺⁺ test (n: number of fibers). B : repartition of the different fiber types. Data for control monkeys (reported in italic) were from D. Desplanches (3), using ATPase staining

and fast MHC (Fig. 1). Slow (S) and fast (F) fibers expressed only the slow MHC I and fast MHC IIa isoforms, respectively. The two other groups were identified as composed of hybrid fibers which coexpressed the MHC I and MHC IIa isoforms ; they were called HS (Hybrid Slow) and HF (Hybrid Fast) according to the predominant isoform, slow or fast, respectively. On these control monkeys (Table 1, part A), the proportion of hybrid slow (HS) fibers within the whole slow population WSP (HS + S fiber types) was low and equal to ~ 7 %. On some biopsies we did not find any HS fibers. The ratio between the number of hybrid fast (HF) fibers and the whole fast population WFP (HF + F fiber types) was ~ 21 %, these fibers being present in all biopsies.

We obtained similar Δ' criterion values for the different control monkeys, confirmed by the data of fiber typing established by Desplanches (see Methods). Therefore, for each fiber type (S, HS, HF, F), we pooled together the functional data that we obtained on all the different 11 CONT monkeys.

Functional properties of control monkey triceps fibers. The results are summarized in Table 2. No significant differences appeared between S, HF and F fiber populations for the diameter values. The HS fibers presented the lowest mean diameter, although significantly different only with that of F fibers. All populations of fibers exhibited similar absolute maximal tension P_0 . However, when expressed per cross-sectional area, P_0 of F group appeared lower than that of S group. Significant differences appeared in the Ca^{2+} activation properties between slow and fast types (Table 2). The Ca^{2+} activation threshold (pCa_{thr}) was clearly lower for F and HF groups than for S and HS ones. The pCa_{50} values appeared significantly lower for F and HF fibers when compared to S fibers. Thus, the T/pCa relationships of F and HF groups were shifted towards higher Ca^{2+} concentrations (Fig. 2 C, D) compared to the positions of the T/pCa curves of S and HS groups (Fig. 2 A, B). Moreover, the steepness of F and HF curves were higher than those of S and HS ones, as

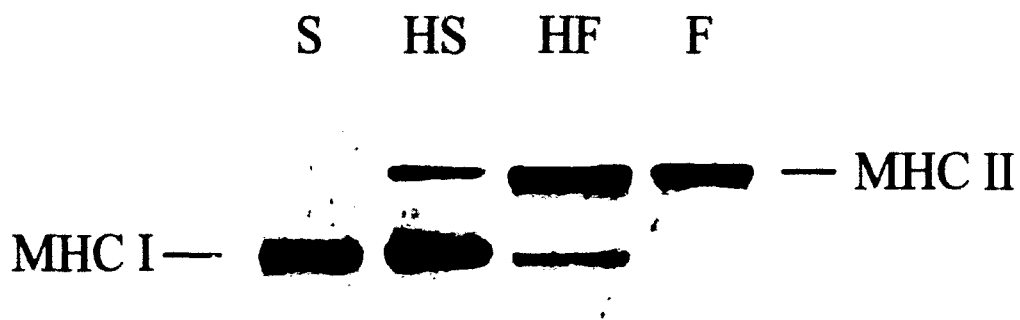


Fig. 1 : Representative profiles for S, HS, HF and F fibers as determined by electrophoretic analysis of myosin heavy chains (MHC) - SDS-PAGE (7.5 %) slab gel electrophoresis.

Table 2. Contractile parameters of the control triceps muscle fibers

Parameters	S (n = 52)	HS (n = 4)	HF (n = 13)	F (n = 48)
Δ'	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.05	0.95 ± 0.10	1.08 ± 0.03
Diameter (μm)	60.0 ± 1.6	50.5 ± 3.1 [†]	61.4 ± 3.6	66.6 ± 1.9 ^{††}
P ₀ (μN)	374 ± 20	240 ± 27 [†]	292 ± 31	313 ± 19
P ₀ (kN/m ²)	126.5 ± 9.7	122.2 ± 13.7	101.2 ± 10.9	92.6 ± 5.7*
pCa _{thr}	6.72 ± 0.02	6.76 ± 0.13	6.32 ± 0.05*	6.35 ± 0.02*
pCa ₅₀	5.90 ± 0.02	5.86 ± 0.13	5.71 ± 0.03*	5.78 ± 0.01*
n _H	1.85 ± 0.08	1.66 ± 0.15	2.54 ± 0.09*	2.29 ± 0.08

The four different triceps fiber types (slow S, fast F, hybrid slow HS and hybrid fast HF) are from the 11 control monkeys. Values are means ± SE. n, number of fibers ; Δ' , pCa₅₀-pSr₅₀; P₀, maximal tension ; pCa_{thr}, threshold for Ca⁺⁺ activation ; pCa₅₀, pCa at which tension is half maximal ; n_H, Hill coefficient. * : significantly different from S and HS fiber types. †: F significantly different from HS fiber types.

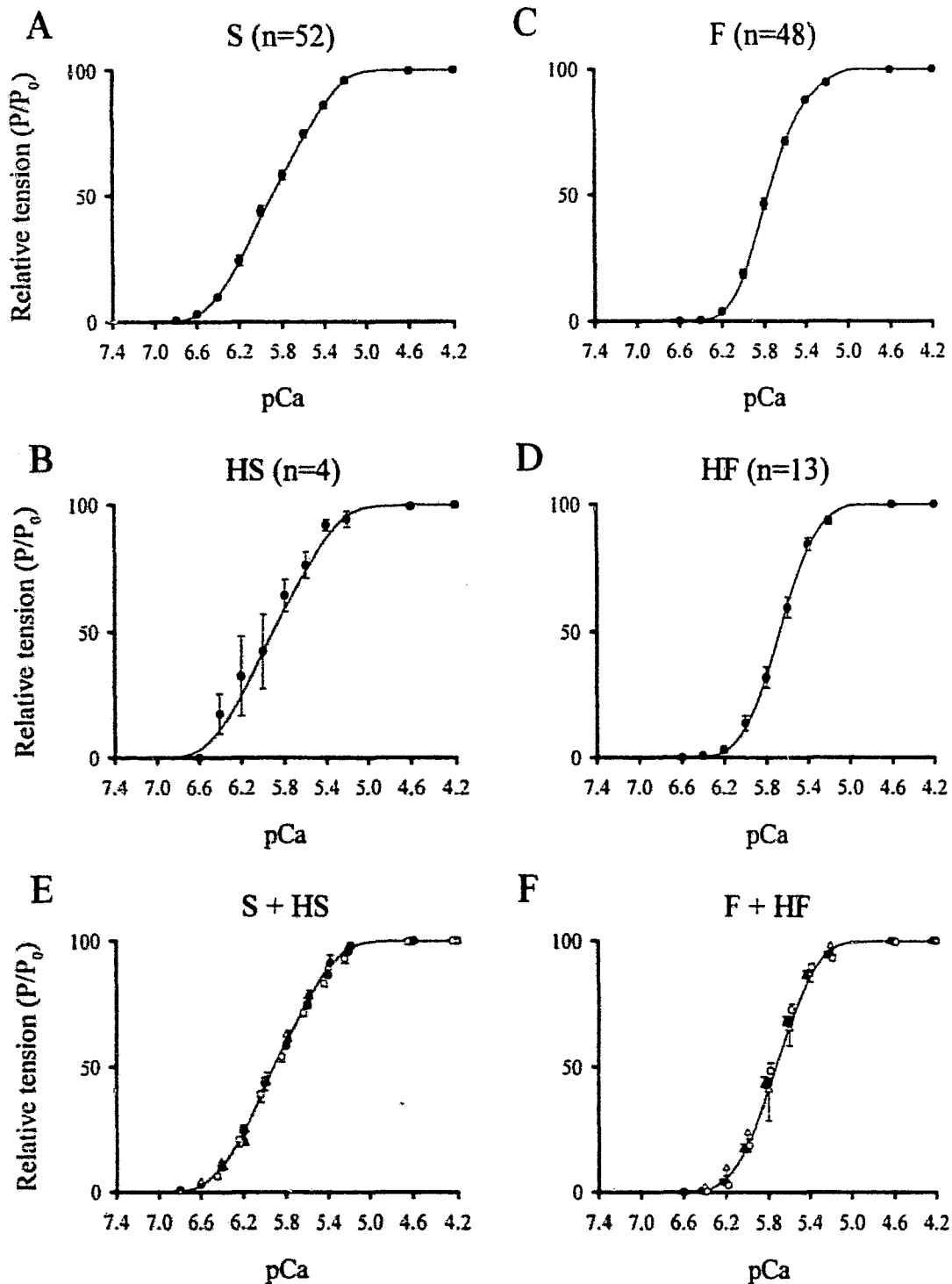


Fig. 2 : Plots of Tension/pCa (T/pCa) curves of the different fiber types from monkey triceps muscles. A, B, C, D correspond to S, HS, F, HF fiber types, respectively, from the 11 control monkeys. E and F correspond to T/pCa curves obtained after pooling [S + HS] and [F + HF] data, respectively. Measurements from all the CONT monkeys pooled together (●) or from separated groups used as controls before GROWTH (○), IMMO (▲) and FLIGHT experiments (△). The curves are drawn according to the Hill equation. Each experimental data point represents mean ± SE. n : number of fibers.

attested by significantly larger values of Hill coefficient n_H . It should be noticed that all Ca^{2+} activation parameters ($p\text{Ca}_{\text{thr}}$, $p\text{Ca}_{50}$, n_H) exhibited very close values within a whole population defined by the Sr^{2+} test (WSP or WFP). Thus, we did not observe any difference between the data obtained for the S and HS fibers or for the F and HF fibers. Since this result remained true whatever the experimental group (GROWTH, IMMO or FLIGHT), we gathered the data of functional characteristics for S and HS fibers in a single group, and for F and HF fibers in another single group (Fig. 2 E and F, respectively). It appeared clearly that similar T/pCa relationships were obtained for [S + HS] or [F + HF] fibers from all the control monkeys pooled together ($n=11$) or from individualized groups used as controls of GROWTH ($n=4$), IMMO ($n=3$) and FLIGHT ($n=2$) experiments. The individualized groups were chosen to constitute the controls (or PRE data) of the different experimental groups. Therefore, PRE and POST data were obtained on same animals, 5 months separating the two biopsies. The possible growth effect is stated below.

Growth effect analysis. For the animals of the GROWTH group, no differences of diameter and maximal tension P_0 ($\text{kN}\cdot\text{m}^{-2}$) values were observed in the 5 month-delay between the period of animal selection and the flight. This result was evidenced as well on the slow fibers ($n=23$ for pre- and post-growth) as for the fast fibers ($n=21$ for pre- and post-growth) (Fig. 3A and D). T/pCa relationships obtained for WSP and WFP realized 5 months before launch were reported in Fig. 2E and F. T/pCa curves established on the biopsies at the period of landing were not different from the latter (data not illustrated). Thus, all the parameters studied indicated that no growth effect was observed between the moment of selection of the monkeys and that of the flight.

Effects of arm immobilization. Data were collected from three monkeys (447-501-534) whose right arms were submitted to immobilization. On these 3 monkeys, the HS/WSP and HF/WFP ratio, established on 35 fibers, before arm immobilization were respectively equal to

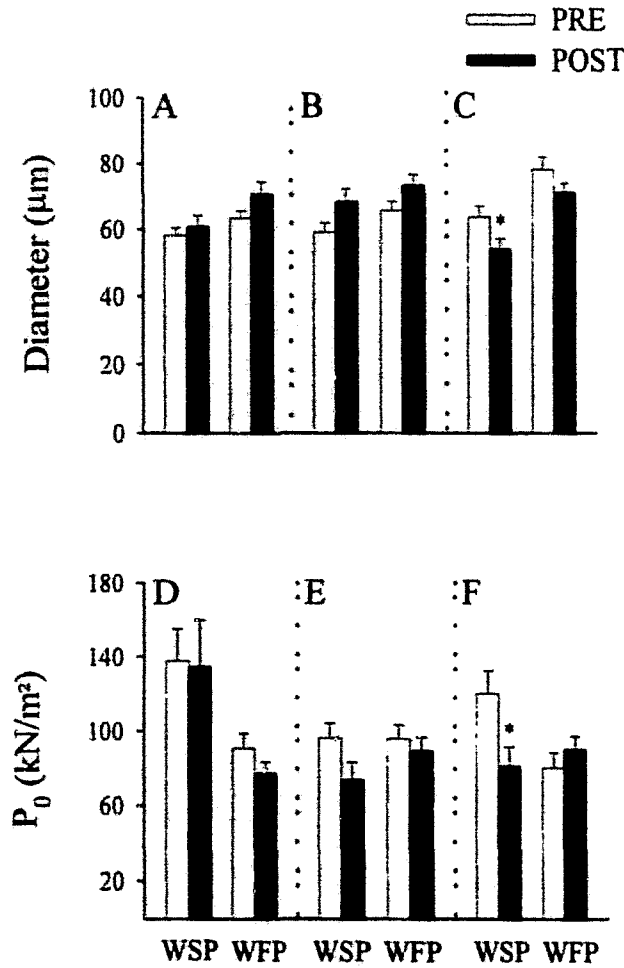


Fig. 3 : Fiber diameters and maximal tensions P_0 (kN/m^2) of the whole slow population (WSP, including S + HS fibers) and the whole fast population (WFP, including F + HF fibers), in pre and post growth control experiments (A and D), in pre and post-arm immobilization (B and E) and pre and post-flight conditions (C and E). * indicates a significant difference between pre and post data.

7.6 and 19 %, values close to those reported above for the 11 CONT monkeys. After immobilization, the percentage of hybrid fibers increased (Table 1, part A). Indeed, the HS/WSP ratio reached 33 % and the HF/WFP one was equal to ~ 32 %. Moreover, the proportion of the four fiber types established from the 37 studied fibers taken randomly in the three biopsies of the IMMO monkeys, showed an increase in the HF and F fiber proportions when compared with data reported by Desplanches (3), given in italic in Table 1.

After immobilization, no significant differences appeared for the fiber diameter and the maximal force, whatever the fiber type (Fig. 3 B and E). On the contrary, changes were found in Ca^{2+} activation parameters : pCa_{thr} and pCa_{50} were decreased for the slow and fast fibers (Table 3). Therefore, the T/pCa relationships were shifted towards higher Ca concentrations (Fig. 4). The n_{H} values were very close before and after immobilization and as a consequence, the T/pCa curves of the two fiber types were parallel.

Effects of flight conditions. After flight, a first result is the increased proportion of HS fibers (25 and 28 % HS/WSP for the monkeys 357 and 484, respectively ; Table 1, part A), when compared to the 6.6 % obtained in these animals before flight. A second effect of weightlessness is the decrease in the proportion of S and HS fibers relative to the whole content in fibers, at the expense of a large increase in fast fibers, especially in pure F fibers. Both monkeys exhibited the same shift from a slow toward a fast typing.

After flight, diameter and maximal forces of slow fibers were significantly decreased while no change appeared for the fast ones (Fig. 3 C and F). On both fiber types, the main change in Ca^{2+} activation parameters concerned the pCa_{thr} and the slopes of the T/pCa relationships (Table 3). The values of pCa_{thr} were decreased after flight, the effect being larger for the slow fibers. The Hill coefficient n_{H} was significantly increased for slow and fast fibers (Table 3 and Fig. 4).

Table 3. Contractile parameters of the pre and post - arm-immobilized and -flight triceps muscle fibers

Parameters	IMMO		FLIGHT	
	PRE	POST	PRE	POST
Δ'				
WSP	0.27 ± 0.03 (17)	0.23 ± 0.06 (15)	0.22 ± 0.02 (14)	0.18 ± 0.06 (11)
WFP	1.06 ± 0.03 (21)	1.01 ± 0.04 (22)	1.07 ± 0.06 (10)	1.15 ± 0.01 (41)
pCa_{thr}				
WSP	6.72 ± 0.04	6.53 ± 0.07 [†]	6.79 ± 0.02	6.50 ± 0.03 [†]
WFP	6.37 ± 0.02	6.22 ± 0.02 [†]	6.40 ± 0.05	6.30 ± 0.03
pCa_{50}				
WSP	5.90 ± 0.04	5.73 ± 0.06 [†]	5.93 ± 0.04	5.84 ± 0.04
WFP	5.74 ± 0.02	5.65 ± 0.03 [†]	5.76 ± 0.05	5.77 ± 0.02
n_H				
WSP	2.17 ± 0.14	2.13 ± 0.11	1.99 ± 0.09	2.87 ± 0.18 [†]
WFP	2.79 ± 0.15	2.74 ± 0.12	2.60 ± 0.12	3.52 ± 0.12 [†]

WSP, whole slow population, including slow and hybrid slow fibers ; WFP, whole fast population including fast and hybrid fast fibers. Values are means ± SE. The number of fibers is mentioned in brackets. Δ' , pCa_{50} - pSr_{50} ; pCa_{thr} , threshold for Ca^{++} activation ; pCa_{50} , pCa at which tension is half maximal ; n_H , Hill coefficient. † : significant differences between pre and post data for each experimental condition.

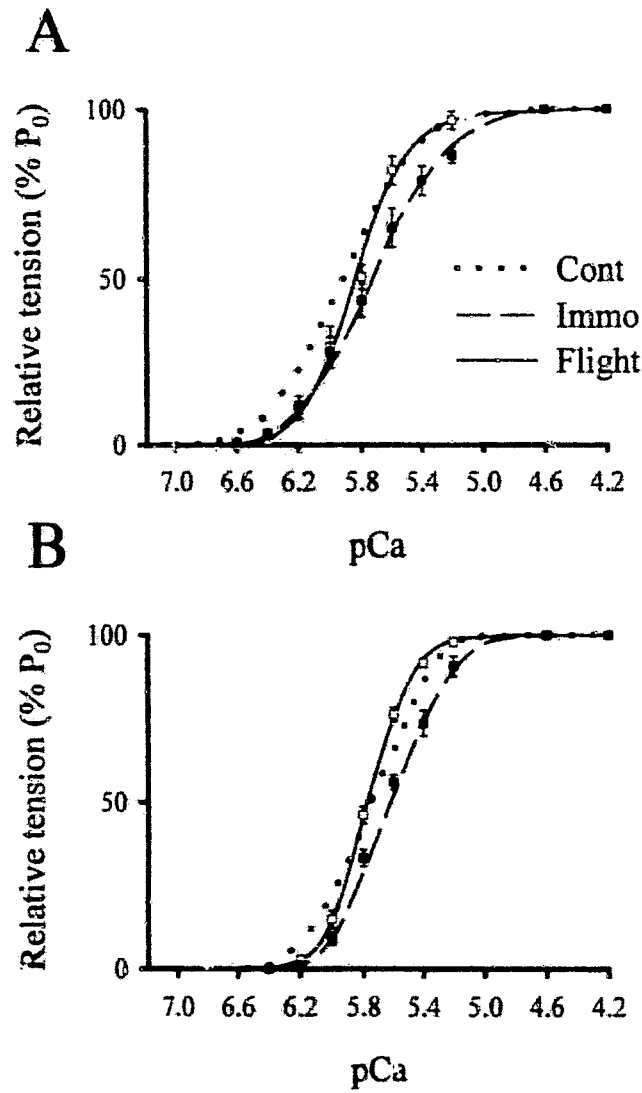


Fig. 4: Tension/pCa relationships in control conditions (dotted curve), after arm-immobilization (■) and spaceflight (□) conditions. A : data from [S + HS] fibers ; B : data from [F + HF] fibers. The dotted curves in A and B correspond to the curves presented in Fig. 2E and F, respectively. † indicates a significant difference between pre and post data.

DISCUSSION

This paper reports, for the first time, data on contractile properties in control and weightlessness conditions of the triceps brachii, a monkey forelimb muscle. It provides also evidences that in a situation such as spaceflight that associated immobilization and microgravity, both conditions inducing a slow to fast shift in the triceps contractile properties, the proper effect of weightlessness can be identified.

Muscle fiber types in monkey triceps. According to electrophoretic analysis, four fiber types were found in the triceps muscle : pure slow and fast fibers, and hybrid fibers which coexpressed slow and fast myosin isoforms. In control monkeys, few hybrid slow (HS) fibers (7 %) were found within the whole slow population, while the proportion of hybrid fast (HF) fibers (21 %) within the whole fast population was more important.

After immobilization, the WSP population including S and HS fibers attained 40 %. When compared to the proportion of type I fibers (mean value : 88 %) established for the control animals by ATPase staining, immobilization induced a slow to fast shift of the triceps phenotype. Moreover, the proportion of hybrid slow fibers within the WSP population clearly increased by a factor of 4.5 after immobilization. After flight, the WSP population appeared also clearly lower than the control one, the slow-to-fast transition being more marked for monkey 357, and the HS fiber proportion increased by a factor ~ 3.5. Consequently, the whole fast population was enhanced as well after immobilization (59 %) as after flight (86 and 67 % in monkeys 357 and 484, respectively). Therefore, the slow to fast transitions of the triceps muscle were more extended after microgravity than those resulting from the arm immobilization. According to Table 1 (part B), the proper effect of microgravity seems to be the reinforcement of the pure fast fiber content. Obviously, this distinction supposed that the arm immobilization effect was similar at 1 or 0 g, a factor which cannot be verified. It should be underlined that the position of immobilization in these experiments corresponded to a

neutral position which has been already described to produce more moderate changes than those induced by shortening (16) as it happened for antigravity extensor muscles in real or simulated microgravity conditions (14). Fortunately, this permitted to distinguish the additional effect of microgravity.

Atrophy. In ground-based animals, the arm immobilization did not induce any atrophy (fiber diameter and maximal tensions) on slow and fast fibers when compared with control animals. This can be also related to the neutral position of the immobilized triceps. In the opposite, after weightlessness, fibers of the WSP exhibited decreases in diameter and tensions. Therefore, the force decrease after microgravity was not simply due to fiber atrophy i.e. to the loss in total content of myofibrillar proteins. It could also be attributed to a decrease in force per cross-bridge or to changes in the myofilament lattice since myofibrillar volume per contractile unit is maintained or only slightly decreased after spaceflight (3). Fast fibers did not appear affected by spaceflight conditions. Similar results relating differential atrophy of slow and fast fibers during this spaceflight were obtained in monkey soleus muscle (7).

Ca²⁺ activation properties. On control monkey triceps, differences in the Ca activation properties between slow and fast fibers appeared, as classically described especially in rat muscle (12). Thus, the pCa threshold and pCa₅₀ values were lower, and the H parameter was higher for fast than for slow fibers. It should be noticed that HS and HF fibers exhibited similar Ca²⁺ activation properties than S and F fibers, respectively. This suggested that the Ca²⁺ functional properties were dictated by a predominant type of isoform (slow or fast) and that the hybrid fibers might modulate other functional properties. For instance, they might contribute to the continuum in the maximal shortening velocity changes observed in rat soleus fibers (20).

After immobilization, a decrease in the Ca²⁺ affinity of the contractile system appeared since pCa threshold and pCa₅₀ were significantly reduced in slow as well as in fast fibers.

However, in both fiber types the n_H values remained unchanged. Therefore, the Tension/pCa relationship after immobilization were shifted toward higher Ca^{2+} concentrations, remaining parallel to the control curves.

After flight, the slow triceps fibers appeared more affected by weightlessness. Indeed, the pCa_{thr} value was significantly decreased by 0.29 pCa unit while the slighter decrease for fast fibers (0.10 pCa unit) was not significant when compared with control values. The spectacular effect of microgravity consisted in a large increase in the steepness of the Tension/pCa curves (higher n_H values) as well for the slow as for the fast fibers, when compared with the curves from control or immobilized animals. This large straightening of the flight fiber curves might contribute to mask the amplitude of the decrease in Ca affinity (lower pCa_{50}) which can be nevertheless detected for slow fibers. Therefore, since it has been already well demonstrated that the pCa_{50} parameter can be related to troponin C properties (9), our data indicated that other regulatory proteins such as troponin T or tropomyosin implied in the cooperativity process along the thin filament (13) were also implied in the adaptation of the contractile system to the absence of gravity during the BIC 11 flight.

To conclude, despite complex factors due to the association of microgravity with inevitable other environmental conditions, the changes in muscular properties specifically due to weightlessness can be discriminated and suggested that many proteins of the contractile system participated in the muscle functional adaptation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr D. DESPLANCHES for providing us histochemical data. This work was supported by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES).

2000/3027) and the Fonds Européen de Développement Economique Régional (FEDER, F007).

REFERENCES

1. Baldwin KM, Herrick RE, Ilyina-Kakueva EI, and Ogancv V. Effects of zero-gravity on myofibril content and isomyosin distribution in rodent skeletal muscle. *FASEB J* 4 : 79-83, 1990.
2. Bodine-Fowler SC, Roy RR, Rudolph W, Haque N, Kozlovskaya IB, and Edgerton VR. Spaceflight and growth effects on muscle fibers in the rhesus monkey. *J Appl Physiol* 73 : 82S-89S, 1992.
3. Desplanches D, Mayet-Sornay MH, and Hoppeler H. Structural changes in arm muscles with weightlessness. Meeting on the biosatellite 11 results, Sunnyvale (USA), 1998.
4. Desplanches D, Mayet MH, Ilyina-Kakueva EI, Sempore B, and Flandrois R. Skeletal muscle adaptation in rats flown on Cosmos 1667. *J Appl Physiol* 68 : 48-52, 1990.
5. Fabiato A. Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol* 157 : 378-417, 1988.
6. Fink RH, Stephenson DG, and Williams DA. Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J Physiol (Lond)* 373 : 513-525, 1986.
7. Fitts RH, Romatowski JG, Blaser C, De la Cruz L, Gettelman GJ, and Widrick JJ. Effect of space flight on the isotonic contractile properties of single skeletal muscle fibers in the rhesus monkey. *J Gravit Physiol* 7 : 37-38, 2000.
8. Gardetto PR, Schluter JM, and Fitts RH. Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 66 : 2739-2749, 1989.

9. Gulati J, Scordilis S. and Babu A. Effect of troponin C on the cooperativity in Ca^{2+} activation of cardiac muscle. *FEBS Lett* 236 : 441-444, 1988.
10. Holy X and Mounier Y. Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscles. *Muscle Nerve* 14 : 70-78, 1991.
11. Kerrick WG, Malencik DA, Hoar PE, Potter JD, Coby RL, Pocinwong S, and Fischer EH. Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pfluegers Arch* 386 : 207-213, 1980.
12. Mounier Y, Holy X, and Stevens L. Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pfluegers Arch* 415 :136-141, 1989.
13. Nassar R, Malouf NN, Kelly MB, Oakeley AE, and Anderson PA. Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ Res* 69 : 1470-1475, 1991.
14. Ohira Y, Yasui W, Roy RR, and Edgerton VR. Effects of muscle length on the response to unloading. *Acta Anat* 159 : 90-98, 1997.
15. Roy RR, Bello MA, Powell PL, and Simpson DR. Architectural design and fiber-type distribution of the major elbow flexors and extensors of the monkey (cynomolgus). *Am J Anat* 171 : 285-293, 1984.
16. Simard CP, Spector SA, and Edgerton VR. Contractile properties of rat hind limb muscles immobilized at different lengths. *Exp Neurol* 77 : 467-482, 1982.
17. Stevens L, Mounier Y, Holy X, and Falempin M. Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 68 : 334-340, 1990.
18. Stevens L, Mounier Y, and Holy X. Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am J Physiol* 264 : R770-R776, 1993.
19. Takagi A and Endo M. Guinea pig soleus and extensor digitorum longus: a study on single-skinned fibers. *Exp Neurol* 55 : 95-101, 1977.

20. Tournel T, Stevens L, and Mounier Y. Evolution of contractile and elastic properties of rat soleus muscle fibres under unloading conditions. *Exp Physiol* 84 : 93-107, 1999.
21. Wada M, Hamalainen N, and Pette D. Isomyosin patterns of single type IIB, IID and IIA fibres from rabbit skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 16 : 237-242, 1995.
22. Wood DS, Zollman J, Reuben JP, and Brandt PW. Human skeletal muscle : properties of the « chemically skinned » fiber. *Science* 187 : 1075-1076, 1975.

Les caractéristiques d'activation calcique des fibres de triceps de singe après le vol BION 11 ont aussi été déterminées en présence de notre outil pharmacologique, le bépridil. Les données n'ont pas été intégrées dans le papier "Plasticity of monkey triceps muscle fibers in microgravity conditions", mais l'analyse des relations Tension / pCa en présence de bépridil montre :

- qu'il n'y a pas de modifications du fonctionnement de la TnC sur les fibres demeurées fonctionnellement lentes (L + HL)
- que la TnC se comporte de façon typiquement rapide dans les fibres restées ou devenues fonctionnellement rapides (R + HR).

Ces résultats confirment donc ceux obtenus par la microgravité simulée sur le rat.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail a permis de révéler l'évolution d'une protéine régulatrice de la contraction, la troponine C, en conditions d'Hypodynamie – Hypokinésie, et ce, aussi bien du point de vue de son expression que de son fonctionnement au sein du treillis myofibrillaire. L'exposition à la microgravité simulée ou réelle a entraîné des modifications structurales et fonctionnelles que nous allons analyser, de manière comparative avec différentes données de la littérature.

1 - L'ATROPHIE MUSCULAIRE

Une atrophie, caractérisée par la diminution du diamètre, apparaît particulièrement marquée sur les fibres des muscles engagés dans le maintien de la posture. Ainsi, on observe chez le rat une atrophie des fibres lentes et rapides du soleus, aussi bien après microgravité simulée (Templeton et coll., 1984 ; Desplanches et coll., 1987 ; article de ce mémoire "Expression and functional behaviour of troponin C in soleus muscle fibres after hindlimb unloading"), qu'après microgravité réelle (Miu et coll., 1990 ; Ohira et coll., 1992). De nombreux auteurs ont en outre décrit une amplitude d'atrophie plus forte sur les fibres lentes que sur les fibres rapides (Thomason & Booth, 1990, pour revue). Cependant, bien que ce résultat soit le plus couramment rapporté, Templeton et coll. (1986) observent dans le soleus une diminution de diamètre de l'ordre de 40 % pour les fibres lentes de type I sans changement pour les fibres rapides de type II, après 14 jours de suspension. Sur un muscle rapide tel que le gastrocnemius lateralis, l'amplitude de l'atrophie liée à la microgravité réelle se révèle également assez variable : Holy & Mounier (1991, Biocosmos 1514 – 5 jours) et mes données personnelles (résultats non rapportés dans ce mémoire) sur le modèle d'H-H font état d'une baisse significative du diamètre des fibres, alors que Stevens et coll. (1993, Biocosmos 2044 – 13 jours) et Holy & Mounier (1991, Biocosmos 1667 – 7 jours) ne décèlent pas de différences après microgravité. Par ailleurs, un muscle antagoniste du soleus et du gastrocnemius comme

le tibialis anterior est capable de s'atrophier, avec une diminution du diamètre des fibres de l'ordre de 25 % (données personnelles en microgravité simulée ; Stevens et coll., 1996 en microgravité réelle, vol SLS2 – 14 jours). Les muscles rapides, tels que le plantaris ou l'EDL, impliqués dans des mouvements phasiques, ne subissent quant à eux pas de changements significatifs (Stevens et coll., 1993 ; Stevens et coll., 1996).

Chez le singe, les résultats apparaissent quelque peu différents. Après un séjour de deux semaines en microgravité réelle (Biocosmos 2044), Bodine-Fowler et coll. (1992) n'ont pas trouvé de variations dans les "cross sectional area" (csa) des fibres de soleus et de gastrocnemius medialis, une légère atrophie étant détectée seulement pour le tibialis anterior. Ces résultats, différents de ceux obtenus sur le rat lors du même vol, pourraient s'expliquer par des spécificités d'espèces, ou encore par les conditions expérimentales : les rats étaient en effet placés dans des cages en situation de "free floating", tandis que les singes étaient maintenus sur une chaise, et pouvaient appuyer avec leur membre inférieur droit sur une pièce fixe. Nos résultats obtenus sur le triceps brachii après le vol BION 11 montrent une diminution du diamètre des fibres lentes, mais pas de variation du diamètre des fibres rapides, résultats comparables à ceux publiés par Fitts et coll. (2000a) sur le soleus des mêmes animaux. Belozerova et coll. (2000), de leur côté, ont montré une diminution de la csa des fibres I du soleus, et une diminution de la csa des fibres de type II sur un seul des deux animaux soumis au vol. Ces données montrent que le soleus chez le singe apparaît moins affecté par un vol spatial que chez le rat (Jiang et coll., 1992 ; Ohira et coll., 1992).

Chez l'Homme, les fibres de soleus sont plus atrophiées que les fibres de gastrocnemius (Edgerton et coll., 1995 ; Widrick et coll., 1999), en accord avec les données collectées chez le rat. Mais, au sein du soleus humain, au contraire de ce qui est observé chez le rat, Edgerton et coll. (1995) et Widrick et coll. (1999) montrent que la csa des fibres de type II diminue

dans des proportions plus importantes que celles des fibres de type I. L'analyse de ces données a conduit Fitts et coll. (2000b) à émettre l'hypothèse d'une corrélation entre le diamètre initial des fibres et l'ampleur de l'atrophie subie, les fibres de plus gros diamètre étant les plus susceptibles de s'atrophier. Ainsi, chez le rat, les fibres de type I ayant un diamètre plus important que les fibres de type II subiraient une atrophie plus marquée. Chez l'humain, les fibres de type II sont au contraire de diamètre plus important que les fibres de type I, ce qui expliquerait les résultats des équipes d'Edgerton et Widrick décrits ci-dessus. Dans nos conditions expérimentales, sur le rat (article de ce mémoire "Expression and functional behaviour of troponin C in soleus muscle fibres after hindlimb unloading"), les fibres lentes ont un diamètre initial de $79 \pm 3.1 \mu\text{m}$ et les rapides de $74 \pm 3.6 \mu\text{m}$, et subissent respectivement une atrophie de 29 % et de 28 %. Nous ne sommes donc pas en mesure, au vu de nos résultats, de relier le degré d'atrophie d'un type de fibre à son diamètre initial. En ce qui concerne les fibres lentes et rapides de triceps de singe, qui ont des diamètres voisins (60 et 66 μm , respectivement), l'hypothèse de Fitts ne permet pas d'expliquer pourquoi on observe après le vol spatial une diminution du diamètre des fibres lentes et un maintien du diamètre des fibres rapides. L'interprétation que nous proposons se réfère à une analyse des conditions expérimentales : en effet, malgré une relative immobilisation du bras des animaux dans la capsule spatiale, les enregistrements vidéo montrent que les singes s'accrochent fréquemment par leur bras libre aux tablettes disposées devant eux, entraînant des mouvements rapides de l'épaule du bras immobilisé. Ces mouvements peuvent être à l'origine de contractions phasiques du bras immobilisé, les fibres de type II pouvant alors être plus sollicitées que les fibres de type I et avoir donc préservé, au moins partiellement, leur fonctionnalité.

Les fibres lentes et rapides de soleus de rat présentent des pertes de force spécifiques, non attribuables uniquement à l'atrophie, mais dues également à une perte de force développée par

chaque pont. Ces chutes de force n'existent pas sur les fibres de gastrocnemius lateralis et de tibialis anterior (données personnelles en H-H). Par contre, elles sont retrouvées au niveau des fibres lentes et rapides du soleus et du gastrocnemius de singe après le vol BION 11 (Fitts et coll., 2000a). Sur les fibres du triceps de singe, nous avons obtenu une diminution significative de la P_0 des fibres lentes, mais nous n'avons pas observé de P_0 significativement différente sur les fibres rapides après le vol BION 11. Les cause de ce phénomène peuvent être identiques à celles évoquées pour interpréter le maintien du diamètre des fibres. Il apparaît donc que des résultats différents peuvent être obtenus, pour un même vol spatial, entre les résultats obtenus sur un muscle lent extenseur des membres antérieurs (le triceps) et un autre muscle lent extenseur des membres postérieurs (le soleus). Il faut toutefois noter que le triceps est un muscle beaucoup plus hétérogène que le soleus puisqu'en surface, il comporte une majorité de fibres rapides.

2 - LA TRANSFORMATION PHENOTYPIQUE DES MUSCLES ANTIGRAVITAIRES.

Les contenus en MHCI (90 %) et MHCIIa (10 %, cf. article "Expression and functional behaviour of troponin C in soleus muscle fibres after hindlimb unloading") deviennent égaux à 56 % (MHCI) et 24 % (MHCIIa), avec apparition de MHCII d/x (15.5 %) et de MHCIIb (5 %) après 14 jours de microgravité simulée. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature (Caiozzo et coll., 1998 ; Bigard et coll., 1998), tandis que d'autres auteurs ne détectent pas de MHCIIb après microgravité (Takahashi et coll., 1991 ; Campione et coll., 1993 ; Talmadge et coll., 1995). Il est intéressant de constater que les transformations survenant en réponse à la microgravité sont moins marquées que les transformations dues à une augmentation de l'activité neuromusculaire (Jaschinski et coll., 1998). En fait, deux processus surviennent en parallèle au cours de l'exposition à la microgravité : i) une atrophie musculaire (cf. ci-dessus) et ii) une altération de l'expression génique. La MHCIIa ne semble

représenter qu'une étape initiale et transitoire de la transition d'expression des MHC dans les muscles subissant une transformation dans le sens Lent → Rapide. L'étude au niveau des mRNA montre toutefois une surexpression synchrone et non séquentielle des mRNA de MHCIIa et IId/x (Stevens et coll., 1999). L'expression de la MHCIIId/x n'est pas transitoire et persiste, de même que l'expression de la MHCIIb continue à augmenter avec la durée de suspension. Les transitions peuvent se résumer par le schéma transitionnel suivant :



L'expression de la MHCII α figure entre parenthèses car elle n'apparaît pas comme un stade majeur et il semble même qu'elle ne soit pas exprimée dans toutes les fibres (Stevens et coll., 1999). Ce schéma transitionnel est inverse du schéma proposé par Pette & Staron (1997) après stimulation à basse fréquence de muscles squelettiques rapides de lapin, schéma dans lequel la MHCII α représente un stade important dans le processus de transformation :



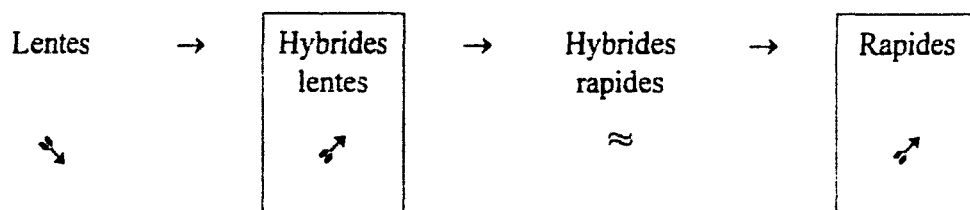
Selon Pette, les transitions s'effectuent selon une loi ("next neighbour rule", Pette et coll., 1997), qui détermine l'ordre d'apparition des nouvelles isoformes suivant le schéma séquentiel décrit ci-dessus. Cependant, il est intéressant de noter que selon Caiozzo et coll. (1998), des "gap" peuvent exister, avec par exemple l'expression simultanée de MHCIIa et IIb, sans IId/x.

Il existe en fait différents modèles (microgravité, suspension, ténotomie, dénervation) qui induisent des transitions Lent → Rapide comparables (Baldwin, 1996 ; Pette & Staron, 1997 ; Thomason & Booth, 1990). Le dénominateur commun pourrait être la réduction des influx toniques délivrés normalement au soleus par le nerf, comme l'ont constaté Blewett & Elder (1993) en microgravité simulée. L'activité contractile et les trains d'influx spécifiques apparaissent comme des facteurs régulateurs majeurs du contrôle de l'expression des MHC et

d'autres propriétés phénotypiques du muscle squelettique adulte (Gorza et coll., 1988 ; Gundersen et coll., 1988). Au niveau des fibres, la microgravité induit une modification des proportions des différents types de fibres. Ainsi, sur le soleus de rat, Miu et coll. (1990) ont montré une diminution de 18 % des fibres exprimant uniquement la MHCI, et une augmentation de 23 % des fibres coexprimant les isoformes lentes et rapides de MHC. Ohira et coll. (1992) ont aussi obtenu sur le soleus une augmentation significative de la proportion des fibres hybrides (de 1 à 14 %, lors du vol Cosmos 2044). Jiang et coll. (1993) ont démontré également sur le soleus que 4 jours de microgravité étaient suffisants pour induire une augmentation du pourcentage de fibres hybrides, coexprimant à la fois les isoformes lentes et rapides de MHC dans le soleus. Les changements sont donc relativement rapides, et se manifestent par une sous-expression de myosines lentes et une surexpression de myosines rapides, menant à une augmentation du nombre de fibres hybrides (cf. ci-dessus), et à une augmentation du nombre de fibres rapides pures dans le soleus (Desplanches et coll., 1990).

Des résultats comparables sont observés chez le singe. Ainsi, il apparaît une surexpression des isoformes rapides dans le soleus après 12 jours (Biocosmos 2229) et 14 jours (Biocosmos 2044) de microgravité réelle (Talmadge et coll., 1995). Dans le triceps (BION 11, article "Plasticity of monkey triceps muscle fibers in microgravity conditions"), la transition Lent → Rapide associée à la microgravité se traduit par une augmentation de la proportion de fibres hybrides lentes et par un accroissement de la population de fibres rapides pures.

Nos données nous permettent d'établir le schéma transitionnel suivant après microgravité pour le muscle triceps brachii :



Par contre, les données obtenues sur l'expression de la TnC montrent une augmentation significative de la proportion de fibres hybrides rapides (i.e. coexprimant les deux isoformes, avec TnCf >>TnCs) sans toutefois déceler de fibres exprimant uniquement la TnCf. Il semble par conséquent que les MHC se caractérisent par une cinétique de transformation plus rapide que les TnC, et par des transitions plus étendues. Il serait intéressant de connaître l'expression de la TnC après des temps supérieurs à deux semaines (un mois de suspension par exemple), et vérifier alors la présence ou non de fibres n'exprimant que l'isoforme rapide. Il faut aussi noter une transition dans l'expression des MLC, avec une cinétique proche de celle observée pour les TnC. Ces transformations progressives traduisent une adaptabilité fine des muscles posturaux quand ils sont soumis à la microgravité par le biais des coexpressions des protéines contractiles. Il est donc intéressant de se demander si le fonctionnement de la TnC se trouve modifié dans un environnement protéique remodelé après un épisode d'H-H ? Notre présent travail permet d'avoir des éléments de réponse concrets.

3 - LES VARIATIONS D'ACTIVATION CALCIQUE

L'exploration du fonctionnement de la machinerie contractile à l'aide des relations Tension / pCa nous a permis de mettre en évidence des modifications dans les caractéristiques d'activation calcique, à savoir une diminution de la sensibilité calcique du système régulateur et une augmentation du phénomène de coopérativité au sein des myofilaments. Il était donc intéressant de savoir si une modification du comportement de la TnC pouvait rendre compte de ces modifications fonctionnelles. Les relations Tension / pCa obtenues en présence de l'outil bépridil ont permis de démontrer i) que le comportement global de la TnC dépend uniquement de l'isoforme prédominante ; ii) que l'apparition d'une expression prédominante de TnCf dans une fibre lui confère des caractéristiques d'activation calcique de type rapide, identiques à celles des fibres rapides contrôles ; iii) que le comportement des TnC dans les

fibres L, HL et HR n'est pas modifié après H-H, seules les proportions respectives de ces types de fibres diffèrent. Etant donné que le nombre total de fibres reste identique après suspension (Templeton et coll., 1984), de nombreuses fibres hybrides rapides sont par conséquent des fibres transformées. Par contre, la TnC n'apparaît pas impliquée dans le changement fonctionnel observé sur les fibres restées lentes et hybrides lentes après H-H qui consiste essentiellement en une augmentation de la coopérativité au sein du filament fin. Ce changement n'est pas retrouvé au niveau du muscle cardiaque, où les paramètres pCa_{50} et n_H , après microgravité, sont identiques aux valeurs contrôles (Bigard et coll., 1998). Il semble donc que, sur le muscle soleus, d'autres protéines régulatrices puissent participer à ces transformations fonctionnelles, même si le muscle garde des caractéristiques lentes. Il serait donc judicieux de déterminer quelles sont les protéines responsables de ces changements. L'augmentation du phénomène de coopérativité suggère une influence des isoformes de TnT, connues pour influencer la pente de la relation Tension / pCa (Greaser et coll., 1988 ; Nassar et coll., 1991). De plus, il semblerait que la cinétique d'évolution de cette protéine soit plus rapide que celle de la TnC. Suite à un protocole d'électrostimulation à basse fréquence de muscles rapides de lapin, Härtner & Pette (1990) ont démontré que la cinétique de transition dans le sens Rapide → Lent de chacune des sous-unités du complexe des troponines était différente, avec un ordre de cinétique décroissante : TnT > TnC > TnI. Campione et coll. (1993) ont montré une transition radicale de l'expression des TnT après 15 jours de suspension se traduisant par un remplacement des isoformes lentes par des rapides sans coexpressions. Il serait intéressant, sur fibres isolées après H-H, de savoir quelles sont les cinétiques de transition des sous-unités de troponines TnT, TnC et également TnI, une régulation différentielle des gènes codant les TnI lentes et rapides ayant été mise en évidence

(Criswell et coll., 1998). Il s'agirait ensuite de déterminer les amplitudes respectives de ces transitions et d'en mesurer les répercussions sur les propriétés fonctionnelles.

.....

BIBLIOGRAPHIE

1. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. (1993). *ΔBiologie moléculaire de la cellule*. Deuxième édition. Edition Médecine-Science Flammarion. 1219p.
2. AMPHLETT, G.W., VANAMAN, T.C. & PERRY, S.V. (1976). Effect of the troponin C-like protein from bovine brain (brain modulator protein) on the Mg^{2+} -stimulated ATPase of skeletal muscle actinomyosin. *FEBS Lett.*, **72**, 163-178.
3. BABU, A., PEMRICK, S. & GULATI, J. (1986). Ca^{2+} activation of troponin C-extracted vertebrate striated fast-twitch muscle fibers. *FEBS Lett.*, **203**, 20-24.
4. BABU, A., SCORDILIS, S.P., SONNENBLICK, E.H. & GULATI, J. (1987). The control of myocardial contraction with skeletal fast muscle troponin C. *J. Biol. Chem.* **262**, 5815-5822.
5. BABU, A., LEHMAN, W. & GULATI, J. (1989). Characterization of the Ca^{2+} -switch in skeletal and cardiac muscles. *FEBS Lett.*, **251**, 177-182.
6. BALDWIN, K.M., HERRICK, R.E., ILYINA-KAKUEVA, E. & OGANOV, V.S. (1990). Effects of zero gravity on myofibril content and isomyosin distribution in rodent skeletal muscle. *FASEB J.*, **4**, 79-83.
7. BALDWIN, K.M. (1996). Effect of spaceflight on the functional, biochemical, and metabolic properties of skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **28**, 983-937.
8. BANDMAN, E. (1992). Contractile protein isoforms in muscle development. *Dev. Biol.*, **154**, 273-283.
9. BARTH, Z., STRAUSS, J.D., HEYDER, S., VAN EYK, J., WIESNER, R.J. & RUEGG, J.C. (1995). Ca^{2+} sensitizing effects of EMD 53998 after troponin replacement in skinned fibres from porcine atria and ventricles. *Pflügers Arch.*, **430**, 220-229.
10. BARTON, P.J. & BUCKINGHAM, M.E. (1985). The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem. J.*, **231**, 249-261.
11. BELOZEROVA, I.N., NEMIROVSKAYA, T.L. & SHENKMAN, B.S. (2000). Structural and metabolic profile of rhesus monkey M. Vastus Lateralis after spaceflight. *J. Gravitational Physiol.*, **7**, S55-S58.
12. BERGER, F., BORCHARD, U. & HAFNER, D. (1989). Effects of the calcium entry blocker bepridil on repolarizing and pacemaker currents in sheep cardiac Purkinje fibres. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **339**, 638-646.
13. BIGARD, A.X., BOEHM, E., VEKSLER, V., MATEO, P., ANFLOUS, K. & VENTURA-CLAPIER, R. (1998). Muscle unloading induces slow to fast transitions in

- myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **30**, 2391-2401.
14. BLEWETT, C. & ELDER, G.C. (1993). Quantitative EMG analysis in soleus and plantaris during hindlimb suspension and recovery. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 2057-2066.
 15. BODINE-FOWLER, S.C., ROY, R.R., RUDOLPH, W., HAQUE, N., KOZLOVSKAYA, I.B. & EDGERTON, V.R. (1992). Spaceflight and growth effects on muscle fibers in the rhesus monkey. *J. Appl. Physiol.*, **73**, 82S-89S.
 16. BRANDT, P.W., DIAMOND, M.S. & SCHACHAT, F.H. (1984). The thin filament of vertebrate skeletal muscle co-operatively activates as a unit. *J. Mol. Biol.*, **180**, 379-384.
 17. BREITBART, R.E., NGUYEN, H.T., MEDFORD, R.M., DESTREE, A.T., MAHDAVI, V. & NADAL-GINARD, B. (1985). Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from a single gene. *Cell*, **41**, 67-82.
 18. BREITBART, R.E. & NADAL-GINARD, B. (1986). Complete nucleotide sequence of the fast skeletal troponin T gene. Alternatively spliced exons exhibit unusual interspecies divergence. *J. Mol. Biol.*, **188**, 313-324.
 19. BREMEL, R.D. & WEBER, A. (1972). Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nat. New Biol.*, **238**, 97-101.
 20. BRENNER, B., YU, L.C. & PODOLSKY, R.J. (1984). X-ray diffraction evidence for cross-bridge formation in relaxed muscle fibers at various ionic strengths. *Biophys. J.*, **46**, 299-306.
 21. BRENNER, B. (1988). Effect of Ca^{2+} on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 3265-3269.
 22. BRONSON, D.D. & SCHACHAT, F.H. (1982). Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3937-3944.
 23. BURTNICK, L.D. & KAY, C.M. (1977). The calcium-binding properties of bovine cardiac troponin C. *FEBS Lett.* **75**, 105-110.
 24. CACHIA, P.J., VAN EYK, J., INGRAHAM, R.H., MCCUBBIN, W.D., KAY, C.M. & HODGES, R.S. (1986). Calmodulin and troponin C: a comparative study of the interaction of mastoparan and troponin I inhibitory peptide [104-115]. *Biochemistry*, **25**, 3553-3562.

25. CAIOZZO, V.J., BAKER, M.J., HERRICK, R.E., TAO, M. & BALDWIN, K.M. (1994). Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J. Appl. Physiol.*, **76**, 1764-1773.
26. CAIOZZO, V.J., BAKER, M.J. & BALDWIN, K.M. (1998). Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.*, **85**, 2237-2248.
27. CAMPIONE, M., AUSONI, S., GUEZENNEC, C.Y. & SCHIAFFINO, S.J. (1993). Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 1156-1160.
28. CHALOVICH, J.M. & EISENBERG, E. (1982). Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2432-2437.
29. CHEUNG, H.C., WANG, C.K. & MALIK, N.A. (1987). Interactions of troponin subunits: free energy of binary and ternary complexes. *Biochemistry*, **26**, 5904-5907.
30. CHONG, P.C. & HODGES, R.S. (1982). Photochemical cross-linking between rabbit skeletal troponin subunits. Troponin I-troponin T interactions. *J. Biol. Chem.*, **257**, 11667-11672.
31. CHONG, P.C., ASSELBERGS, P.J. & HODGES, R.S. (1983). Inhibition of rabbit skeletal muscle acto-S1 ATPase by troponin T. *FEBS Lett.*, **153**, 372-376.
32. COOPER, T.A. & ORDAHL, C.P. (1984). A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science*, **226**, 979-982.
33. COX, J.A., COMTE, M. & STEIN, E.A. (1981). Calmodulin-free skeletal-muscle troponin C prepared in the absence of urea. *Biochem. J.*, **195**, 205-211.
34. CRAMB, G. & DOW, J.W. (1983). Uptake of bepridil into isolated ventricular myocytes. Retention by actin. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 227-231.
35. CRISWELL, D.S., HODGSON, V.R., HARDEMAN, E.C. & BOOTH, F.W. (1998). Nerve-responsive troponin I slow promoter does not respond to unloading. *J. Appl. Physiol.*, **84**, 1083-1087.
36. CUMMINS, P. & PERRY, S.V. (1973). The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.*, **133**, 765-777.
37. DANIELI-BETTO, D., BETTO, R. & MIDRIO, M. (1990). Calcium sensitivity and myofibrillar protein isoforms of rat skinned skeletal muscle fibres. *Pflugers Arch.*, **417**, 303-308.

38. DANTZIG, J.A., GOLDMAN, Y.E., MILLAR, N.C., LACKTIS, J. & HOMSHER, E. (1992). Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photoregeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J. Physiol.*, **451**, 247-278.
39. DA-SILVA, A.C. & REINACH, F.C. (1991). Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 53-57.
40. DELP, M.D. & DUAN, C. (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.*, **80**, 261-270.
41. DESPLANCHES, D., MAYET, M.H., SEMPORE, B. & FLANDROIS, R. (1987). Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J. Appl. Physiol.*, **63**, 558-563.
42. DESPLANCHES, D., MAYET, M.H., ILYINA-KAKUEVA, E.I., SEMPORE, B. & FLANDROIS, R. (1990). Skeletal muscle adaptation in rats flown on Cosmos 1667. *J. Appl. Physiol.*, **68**, 48-52.
43. DESPLANCHES, D., MAYET-SORNAY, M.H. & HOPPELER, H. (1998). Structural changes in arm muscles with weightlessness. Meeting on the biosatellite 11 results, Sunnyvale (USA).
44. DHOOT, G.K., FREARSON, N. & PERRY, S.V. (1979). Polymorphic forms of troponin T and troponin C and their localization in striated muscle cell types. *Exp. Cell. Res.*, **122**, 339-350.
45. DONALDSON, S.K. & KERRICK, W.G. (1975). Characterization of the effects of Mg^{2+} on Ca^{2+} - and Sr^{2+} -activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, **66**, 427-444.
46. DRABIKOWSKI, W., DALGARNO, D.C., LEVINE, B.A., GERGELY, J., GRABAREK, Z. & LEAVIS, P.C. (1985). Solution conformation of the C-terminal domain of skeletal troponin C. Cation, trifluoperazine and troponin I binding effects. *Eur. J. Biochem.*, **151**, 17-28.
47. EASTWOOD A.B., WOOD, D.S., BOCK, K.L. & SORENSON M.M. (1979). Chemically skinned mammalian skeletal muscle. I. The structure of skinned rabbit psoas. *Tissue Cell.*, **11**, 553-566.
48. EDGERTON, V.R., ZHOU, M.Y., OHIRA, Y., KLITGAARD, H., JIANG, B., BELL, G., HARRIS, B., SALTIN, B., GOLLNICK, P.D. & ROY, R.R. (1995). Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J. Appl. Physiol.*, **78**, 1733-1739.

49. EL-SALEH, S.C. & POTTER, J.D. (1985). Calcium-insensitive binding of heavy meromyosin to regulated actin at physiological ionic strength. *J. Biol. Chem.*, **260**, 14775-14779.
50. EL-SALEH, S.C., WARBER, K.D. & POTTER, J.D. (1986). The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **7**, 387-404.
51. EL-SALEH, S.C. & SOLARO, R.J. (1987). Calmidazolium, a calmodulin antagonist, stimulates calcium-troponin C and calcium-calmodulin-dependent activation of striated muscle myofilaments. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17240-17246.
52. FABIATO, A. (1988). Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.* **157**, 378-417.
53. FARAH, C.S., MIYAMOTO, C.A., RAMOS, C.H., DA SILVA, A.C., QUAGGIO, R.B., FUJIMORI, K., SMILLIE, L.B. & REINACH, F.C. (1994). Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J. Biol. Chem.*, **269**, 5230-5240.
54. FARAH, C.S. & REINACH, F.C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.*, **9**, 755-767.
55. FINK, R.H., STEPHENSON, D.G. & WILLIAMS, D.A. (1986). Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J. Physiol.*, **373**, 513-525.
56. FITTS, R.H., BODINE, S.C., ROMATOWSKI, J.G. & WIDRICK, J.J. (1998). Velocity, force, power, and Ca²⁺ sensitivity of fast and slow monkey skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.*, **84**, 1776-1787.
57. FITTS, R.H., ROMATOWSKI, J.G., BLASER, C., DE LA CRUZ, L., GETTELMAN, G.J. & WIDRICK, J.J. (2000a). Effect of spaceflight on the isotonic contractile properties of single skeletal muscle fibers in the rhesus monkey. *J. Gravitational Physiol.*, **7**, S53-S54.
58. FITTS, R.H., RILEY, D.R. & WIDRICK, J.J. (2000b). Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **89**, 823-839.
59. FLICKER, P.F., PHILLIPS, G.N. Jr. & COHEN, C. (1982). Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J. Mol. Biol.*, **162**, 495-501.

60. FLYNN, D.E. & MAX, S.R. (1985). Effects of suspension hypokinesia/hypodynamia on rat skeletal muscle. *Aviat. Space Environ. Med.*, **56**, 1065-1069.
61. FRANCOIS, J.M., SHENG, Z., SZCZESNA, D. & POTTER, J.D. (1995). 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.
62. FUCHS, F. (1971). Ion exchange properties of the calcium receptor site of troponin. *Biochim. Biophys. Acta.* **245**, 221-229.
63. FUJINO, K., SPERELAKIS, N. & SOLARO, R.J. (1988). Sensitization of dog and guinea pig heart myofilaments to Ca^{2+} activation and the inotropic effect of pimobendan: comparison with milrinone. *Circ. Res.*, **63**, 911-922.
64. GAHLMANN, R., TROUTT, A.B., WADE, R.P., GUNNING, P. & KEDES, L. (1987). Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16122-16126.
65. GAHLMANN, R. & KEDES, L. (1990). Cloning, structural analysis, and expression of the human fast twitch skeletal muscle troponin C gene. *J. Biol. Chem.*, **265**, 12520-12528.
66. GARDETTO, P.R., SCHLUTER, J.M. & FITTS, R.H. (1989). Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **66**, 2739-2749.
67. GARIEPY, J. & HODGES, R.S. (1983). Primary sequence analysis and folding behavior of EF hands in relation to the mechanism of action of troponin C and calmodulin. *FEBS Lett.*, **160**, 1-6.
68. GEEVES, M.A. & HALSALL, D.J. (1987). 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.
69. GEEVES, M.A. & LEHRER, S.S. (1994). Dynamics of the muscle thin filament regulatory switch: the size of the cooperative unit. *Biophys. J.*, **67**, 273-282.
70. GEEVES, M.A. & CONIBEAR P.B. (1995). The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. *Biophys. J.*, **68**, 194S-201S.
71. GORDON, A.M., RIDGWAY, E.B., YATES, L.D. & ALLEN, T. (1988). Muscle cross-bridge attachment: effects on calcium binding and calcium activation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **226**, 89-99.
72. GORDON, A.M., HOMSHER, E. & REGNIER, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.*, **80**, 853-924.

73. GORZA, L., GUNDERSEN, K., LOMO, T., SCHIAFFINO, S. & WESTGAARD, R.H. (1988). Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high-frequency stimulation in the rat. *J. Physiol.*, **402**, 627-649.
74. GOUBEL, F. & LENSEL-CORBEIL, G. (1998). Biomécanique. Elements de mécanique musculaire. Editions Masson. 150p.
75. GRABAREK, Z., DRABIKOWSKI, W., LEAVIS, P.C., ROSENFELD, S.S. & GERGELY, J. (1981). Proteolytic fragments of troponin C. Interactions with the other troponin subunits and biological activity. *J. Biol. Chem.*, **256**, 13121-13127.
76. GRABAREK, Z., GRABAREK, J., LEAVIS, P.C. & GERGELY, J. (1983). Cooperative binding to the Ca^{2+} -specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14098-14102.
77. GRABAREK, Z., LEAVIS, P.C. & GERGELY, J. (1986). Calcium binding to the low affinity sites in troponin C induces conformational changes in the high affinity domain. A possible route of information transfer in activation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, **261**, 608-613.
78. GREASER, M.L. & GERGELY, J. (1971). Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J. Biol. Chem.*, **246**, 4226-4233.
79. GREASER, M.L., YAMAGUCHI, M., BREKKE, C., POTTER, J. & GERGELY, J. (1972). Troponin subunits and their interactions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, **37**, 235-249.
80. GREASER, M.L. & GERGELY, J. (1973). Purification and properties of the components from troponin. *J. Biol. Chem.*, **248**, 2125-2133.
81. GREASER, M.L., MOSS, R.L. & REISER, P.J. (1988). Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *J. Physiol.*, **406**, 85-98.
82. GREEN, E.C. (1968). Anatomy of the rat. Hafner Publishing Company, INC. New York and London. Vol. XXVII, 370 pages.
83. GREENE, L.E. & EISENBERG, E. (1980). Cooperative binding of myosin subfragment-1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 2616-2620.
84. GULATI, J., SCORDILIS, S. & BABU, A. (1988). Effect of troponin C on the cooperativity in Ca^{2+} activation of cardiac muscle. *FEBS Lett.*, **236**, 441-444.
85. GULATI, J., BABU, A. & SU, H. (1992). Functional delineation of the Ca^{2+} -deficient EF-hand in cardiac muscle, with genetically engineered cardiac-skeletal chimeric troponin C. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25073-25077.

86. GULATI, J. & RAO, V.G. (1994). The cardiac Ca^{2+} -deficient EF-hand governs the phenotype of the cardiac-skeletal TnC-chimera in solution by Sr^{2+} -induced tryptophan fluorescence emission. *Biochemistry*, **33**, 9052-9056.
87. GUNDERSEN, K., LEBERER, E., LOMO, T., PETTE, D. & STARON, R.S. (1988). Fibre types, calcium-sequestering proteins and metabolic enzymes in denervated and chronically stimulated muscles of the rat. *J. Physiol.*, **398**, 177-189.
88. GUTH, K. & POTTER, J.D. (1987). Effect of rigor and cycling cross-bridges on the structure of troponin C and on the Ca^{2+} affinity of the Ca^{2+} -specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13627-13635.
89. HAIKALA, H., KAIVOLA, J., NISSINEN, E., WALL, P., LEVIJOKI, J. & LINDEN, I.B. (1995). Cardiac troponin C as a target protein for a novel calcium sensitizing drug, levosimendan. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **27**, 1859-1866.
90. HARTNER, K.T., KIRSCHBAUM, B.J. & PETTE, D. (1989). The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.*, **179**, 31-38.
91. HARTNER, K.T. & PETTE, D. (1990). 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.
92. HASELGROVE, J.C. (1973). X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 341-352.
93. HEAD, J.G., RITCHIE, M.D. & GEEVES, M.A. (1995). Characterization of the equilibrium between blocked and closed states of muscle thin filaments. *Eur. J. Biochem.*, **227**, 694-699.
94. HEELEY, D.H., GOLOSINSKA, K. & SMILLIE, L.B. (1987). 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.
95. HEELEY, D.H. & SMILLIE, L.B. (1988). Interaction of rabbit skeletal muscle troponin T and F-actin at physiological ionic strength. *Biochemistry*, **27**, 8227-8232.
96. HERZBERG, O., MOULT, J. & JAMES, M.N.G. (1986). A model for the Ca^{2+} -induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **261**, 2638-2644.

97. HERZBERG, O., MOULT, J. & JAMES, M.N. (1987). Molecular structure of troponin C and its implications for the Ca^{2+} triggering of muscle contraction. *Methods Enzymol.*, **139**, 610-632.
98. HERZIG, J.W. & QUAST, U. (1992). On the role of Ca^{2+} binding proteins as possible targets for Ca^{2+} sensitizing agents. *Z. Kardiol.*, **81**, 49-55.
99. HILL, T.L., EISENBERG, E. & GREENE, L. (1980). Theoretical model for the cooperative equilibrium binding of myosin subfragment 1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 3186-3190.
100. HITCHCOCK, S.E., HUXLEY, H.E. & SZENT-GYORGYI, A.G. (1973). Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin: a two-site model for troponin action. *J. Mol. Biol.*, **80**, 825-836.
101. HITCHCOCK-DE GILGORI, S.E. (1982). Study of the structure of troponin-I by measuring the relative reactivities of lysines with acetic anhydride. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7372-7380.
102. HOAR, P.E. & KERRICK, W.G. (1979). Rabbit diaphragm: two types of fibres determined by calcium strontium activation and protein content. *J. Physiol.*, **295**, 345-352.
103. HOAR, P.E., POTTER, J.D. & KERRICK, W.G. (1989). Skinned ventricular fibres: troponin C extraction is species-dependent and its replacement with skeletal troponin C changes Sr^{2+} activation properties. *J. Muscle Res Cell Motil.*, **9**, 165-173.
104. HOFMANN, P.A. & FUCHS, F. (1987). Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **253**, C541-C546.
105. HOLMES, K.C., POPP, D., GEBHARD, W. & KABSCH, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*, **347**, 44-49.
106. HOLMES, K.C. (1996). Muscle proteins- their actions and interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 781-789.
107. HOLY, X. & MOUNIER, Y. (1991). Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscles. *Muscle Nerve*, **14**, 70-78.
108. HUXLEY, A.F. (1957). Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys.*, **7**, 255-318.
109. HUXLEY, H.E. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscles. *J. Mol. Biol.*, **7**, 281-308.
110. HUXLEY, H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science*, **164**, 1356-1365.

111. HUXLEY, A.F. & SIMMONS, R.M. (1971). Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*, **233**, 533-538.
112. HUXLEY, H.E. (1973). Structural changes in the actin and myosin containing filaments during contraction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 361-376.
113. IIO, T. & KONDO, H. (1980). Comparison of the kinetic properties of troponin-C and dansylaziridine-labeled troponin-C1. *J. Biochem.*, **88**, 547-556.
114. IIO, T. (1985). Conformational change of troponin I induced by calcium binding to troponin C. *J. Biochem.*, **98**, 261-263.
115. ISHII, Y. & LEHRER, S.S. (1991). Two-site attachment of troponin to pyrene-labeled tropomyosin. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6894-6903.
116. ITOH, H., ISHIKAWA, T. & HIDAKA, H. (1984). Effects on calmodulin of bepridil, an antianginal agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **330**, 737-741.
117. JACKSON, P., AMPHLETT, G.W. & PERRY, S.V. (1975). The primary structure of troponin T and the interaction with tropomyosin. *Biochem. J.*, **151**, 85-97.
118. JASCHINSKI, F., SCHULER, M., PEUKER, H. & PETTE, D. (1998). Changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms of rat muscle during forced contractile activity. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **274**, C365-C371.
119. JHA, P.K., LEAVIS, P.C. & SARKAR, S. (1996). Interaction of deletion mutants of troponins I and T: COOH-terminal truncation of troponin T abolishes troponin I binding and reduces Ca^{2+} sensitivity of the reconstituted regulatory system. *Biochemistry*, **35**, 16573-16580.
120. JIANG, B., OHIRA, Y., ROY, R.R., NGUYEN, Q., ILYINA-KAKUEVA, E.I., OGANOV, V. & EDGERTON, V.R. (1992). Adaptation of fibers in fast-twitch muscles of rats to spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **73**, 58S-65S.
121. JIANG, B., ROY, R.R., NAVARRO, C. & EDGERTON, V.R. (1993). Absence of a growth hormone effect on rat soleus atrophy during a 4-day spaceflight. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 527-531.
122. JOHNSON, J.D., CHARLTON, S.C. & POTTER, J.D. (1979). A fluorescence stopped flow analysis of Ca^{2+} exchange with troponin C. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3497-3502.
123. JOHNSON, J.D., COLLINS, J.H., ROBERTSON, S.P. & POTTER, J.D. (1980). A fluorescent probe study of Ca^{2+} binding to the Ca^{2+} -specific sites of cardiac troponin and troponin C. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9635-9640.
124. JONES, D.A. & ROUND, J.M. (1990). Skeletal muscle in health and disease. Edition Manchester University Press. 221p.

125. KASAI, M. & OOSAWA, F. (1968). The exchangeability of actin-bound calcium with various divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 520-528.
126. KASUGA, N. & UMAZUME, Y. (1990). Deterioration induced by physiological concentration of calcium ions in skinned muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **11**, 41-47.
127. KATOH, T. & LOWEY, S. (1989). Mapping myosin light chains by immunoelectron microscopy. Use of anti-fluorescyl antibodies as structural probes. *J. Cell. Biol.*, **109**, 1549-1560.
128. KAWAI, M., GUTH, K., WINNIKES, K., HAIST, C. & RUEGG, J.C. (1987). The effect of inorganic phosphate on the ATP hydrolysis rate and the tension transients in chemically skinned rabbit psoas fibers. *Pflügers Arch.*, **408**, 1-9.
129. KERRICK, W.G.L., MALENCIK, D.A., HOAR, P.E., POTTER, J.D., COBY, R.L., POCINWONG, S. & FISCHER, E.H. (1980). Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflügers Arch.* **386**, 207-213.
130. KERRICK, W.G., ZOT, H.G., HOAR, P.E. & POTTER, J.D. (1985). Evidence that the Sr^{2+} activation properties of cardiac troponin C are altered when substituted into skinned skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15687-15693.
131. KITAZAWA, T. (1976). Physiological significance of Ca uptake by mitochondria in the heart in comparison with that by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.*, **80**, 1129-1147.
132. KLEEREKOPER, Q., LIU, W., CHOI, D., & PUTKEY, J.A. (1998). Identification of binding sites for bepridil and trifluoperazine on cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* **273**, 8153-8160.
133. KRESS, M., HUXLEY, H.E., FARUQI, A.R. & HENDRIX, J. (1986). Structural changes during activation of frog muscle studied by time-resolved X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.*, **186**, 325-342.
134. KRETSINGER, R.H. & NOCKOLDS, C.E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313-3326.
135. KRETSINGER, R.H. (1980). Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **8**, 119-174.
136. KRETSINGER, R.H. (1987). Calcium coordination and the calmodulin fold: divergent versus convergent evolution. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **52**, 499-510.

137. KUREBAYASHI, N. & OGAWA, Y. (1988). Increase by trifluoperazine in calcium sensitivity of myofibrils in a skinned fibre from frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, **403**, 407-424.
138. LASZEWSKI-WILLIAMS, B., RUFF, R.L. & GORDON, A.M. (1989). Influence of fiber type and muscle source on Ca^{2+} sensitivity of rat fibers. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **256**, C420-C427.
139. LEAVIS, P.C. & KRAFT, E.L. (1978). Calcium binding to cardiac troponin C. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**, 411-415.
140. LEAVIS, P.C., ROSENFELD, S.S., GERGELY, J., GRABAREK, Z. & DRABIKOWSKI, W. (1978) Proteolytic fragments of troponin C. Localization of high and low affinity Ca^{2+} binding sites and interactions with troponin I and troponin T. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5452-5459.
141. LEAVIS, P.C. & GERGELY, J. (1984). Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **16**, 235-305.
142. LEES-MILLER, J.P. & HELFMAN, D.M. (1991). The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *Bioessays*, **13**, 429-437.
143. LEHMAN, W., CRAIG, R. & VIBERT, P. (1994). Ca^{2+} -induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature*, **368**, 65-67.
144. LEHRER, S.S. & MORRIS, E.P. (1982). Dual effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin on actomyosin subfragment 1 ATPase. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8073-8080.
145. LEHRER, S.S. (1994). The regulatory switch of the muscle thin filament: Ca^{2+} or myosin heads? *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **15**, 232-236.
146. LEHRER, S.S. & GEEVES, M.A. (1998). The muscle thin filament as a classical cooperative/allosteric regulatory system. *J. Mol. Biol.*, **277**, 1081-1089.
147. LESZYK, J., GRABAREK, Z., GERGELY, J. & COLLINS, J.H. (1990). Characterization of zero length cross-links between rabbit skeletal muscle troponin C and troponin I: evidence for direct interaction between the inhibitory region of troponin I and the NH_2 -terminal, regulatory domain of troponin C. *Biochemistry*, **29**, 299-304.
148. LEVINE, B.A., MOIR, A.J. & PERRY, S.V. (1988). The interaction of troponin-I with the N-terminal region of actin. *Eur. J. Biochem.*, **172**, 389-397.
149. LI, H.C. & FAJER, P.G. (1994). Orientational changes of troponin C associated with thin filament activation. *Biochemistry*, **33**, 14324-14332.

150. LI, M.X., GAGNE, S.M., SPYRACOPOULOS, L., KLOKS, C.P., AUDETTE, G., CHANDRA, M., SOLARO, R.J., SMILLIE, L.B. & SYKES, B.D. (1997). NMR studies of Ca^{2+} 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.
151. LI, H.C. & FAJER, P.G. (1998). Structural coupling of troponin C and actomyosin in muscle fibers. *Biochemistry*, **37**, 6628-6635.
152. LI, M.X., SPYRACOPOULOS, L. & SYKES, B.D. (1999). Binding of cardiac troponin- $I_{147-163}$ induces a structural opening in human cardiac troponin-C. *Biochemistry*, **38**, 8289-8298.
153. LI, Y., LOVE, M.L., PUTKEY, J.A. & COPPEL, D.P. (2000). Bepridil opens the regulatory N-terminal lobe of cardiac troponin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5140-5145.
154. LOMPRES, A.M., NADAL-GINARD, B. & MAHDAVI, V. (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.*, **259**, 6437-6446.
155. LOWEY, S., SLAYTER, H.S., WEEDS, A.G. & BAKER, H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.*, **42**, 1-29.
156. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDAL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
157. LUGNIER, C., FOLLENIUS, A., GERARD, D. & STOCLET, J.C. (1984). Bepridil and flunarizine as calmodulin inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.*, **98**, 157-158.
158. MA, Y.Z. & TAYLOR, E.W. (1994). Kinetic mechanism of myofibril ATPase. *Biophys. J.*, **66**, 1542-1553.
159. MACLACHLAN, L. K., REID, D. G., MITCHELL, R. C., SALTER, C. J. & SMITH, S. J. (1990). Binding of a calcium sensitizer, bepridil, to cardiac troponin C. A fluorescence stopped-flow kinetic, circular dichroism, and proton nuclear magnetic resonance study. *J. Biol. Chem.* **265**, 9764-9770.
160. MAK, A.S. & SMILLIE, L.B. (1981). Non-polymerizable tropomyosin: preparation, some properties and F-actin binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 208-214.
161. MALNIC, B. & REINACH, F.C. (1994). Assembly of functional skeletal muscle troponin complex in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **222**, 49-54.

162. MALNIC, B., FARAH, C.S. & REINACH, F.C. (1998). 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.
163. MARIEB, E.N. (1993). Anatomie et physiologie humaines. Deuxième édition. Edition DeBoeck. 1114p.
164. MARSDEN, B.J., SHAW, G.S. & SYKES, B.D. (1990). Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. *Biochem. Cell. Biol.*, **68**, 587-601.
165. MAYTUM, R., LEHRER, S.S. & GEEVES, M.A. (1999). Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry*, **38**, 1102-1110.
166. McKAY, R.T., TRIPET, F.P., HODGES, R.S. & SYKES, B.D. (1997). Interaction of the second binding region of troponin I with the regulatory domain of skeletal muscle troponin C as determined by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28494-28500.
167. McKAY, R.T., PEARLSTONE, J.R., CORSON, D.C., GAGNE, S.M., SMILLIE, L.B. & SYKES, B.D. (1998). 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.
168. McKILLOP, D.F. & GEEVES, M.A. (1991). 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**, 711-718.
169. McKILLOP, D.F. & GEEVES, M.A. (1993). Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.*, **65**, 693-701.
170. MEDFORD, R.M., NGUYEN, H.T., DESTREE, A.T., SUMMERS, E. & NADALGINARD, B. (1984). A novel mechanism of alternative RNA splicing for the developmentally regulated generation of troponin T isoforms from a single gene. *Cell*, **38**, 409-421.
171. MELZER, W., HERRMANN-FRANK, A. & LUTTGAU, H.C. (1995). The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 59-116.
172. MERCIER, P., LI, M.X. & SYKES, B.D. (2000). 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.

173. MILLAR, N.C. & HOMSHER, E. (1990). 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.
174. MILLAR, N.C. & HOMSHER, E. (1992). Kinetics of force generation and phosphate release in skinned rabbit soleus muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **262**, C1239-C1245.
175. MILLS, F.C., JOHNSON, M.L. & ACKERS, G.K. (1976). Oxygenation-linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves. *Biochemistry*, **15**, 5350-5362.
176. MIU, B., MARTIN, T.P., ROY, R.R., OGANOV, V., ILYINA-KAKUEVA, E., MARINI, J.F., LEGER, J.J., BODINE-FOWLER, S.C. & EDGERTON, V.R. (1990). Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight, Cosmos 1887. *FASEB J.* **4**, 64-72.
177. MOISESCU, D.G. & THIELECZEK, R. (1979). Sarcomere length effects on the Sr^{2+} - and Ca^{2+} -activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochem. Biophys. Acta.* **546**, 64-76.
178. MONOD, J., WYMAN, J. & CHANGEUX, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions. *J. Mol. Biol.*, **12**, 88-118.
179. MOREY, E.R., SABELMAN, E.E., TURNER, R.T. & BAYLINK, D.J. (1979). A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist*, **22**, S23-S24.
180. MORGAN, M.J., EARNSHAW, J.C. & DHOOT, G.K. (1993). Novel developmentally regulated exon identified in the rat fast skeletal muscle troponin T gene. *J. Cell. Sci.*, **106**, 903-908.
181. MORIMOTO, S. & OHTSUKI, I. (1988). Effect of substitution of troponin C in cardiac myofibrils with skeletal troponin C or calmodulin on the Ca^{2+} - and Sr^{2+} -sensitive ATPase activity. *J. Biochem.*, **104**, 149-154.
182. MORRIS, E.P. & LEHRER, S.S. (1984). 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.
183. MOSS R.L., SWINFORD A.E. & GREASER M.L. (1983). Alterations in the Ca^{2+} sensitivity of tension development by single skeletal muscle fibers at stretch lengths. *Biophys. J.*, **43**, 115-119.

184. MOSS, R.L., GIULIAN, G.G. & GREASER, M.L. (1985). The effects of partial extraction of TnC upon the tension-pCa relationship in rabbit skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* **86**, 585-600.
185. MOSS, R.L., LAUER, M.R., GIULIAN, G.G. & GREASER, M.L. (1986). 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.
186. MOUNIER, Y., HOLY, X. & STEVENS, L. (1989). Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflugers Arch.* **415**, 136-141.
187. MUTHUCHAMY, M., RETHINASAMY, P. & WIECZOREK, D.F. (1997). Tropomyosin structure and function. New insights. *Trends Cardiovasc. Med.* **7**, 124-128.
188. NASSAR, R., MALOUF, N. N., KELLY, M. B., OAKELEY, A. E. & ANDERSON, P. A. (1991). Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ. Res.*, **69**, 1470-1475.
189. NGAI, S.M. & HODGES, R.S. (1992). Biologically important interactions between synthetic peptides of the N-terminal region of troponin I and troponin C. *J. Biol. Chem.* **267**, 15715-15720.
190. OHIRA, Y., JIANG, B., ROY, R.R., OGANOV, V., ILYINA-KAKUEVA, E., MARINI, J.F. & EDGERTON, V.R. (1992). Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **73**, 51S-57S.
191. OLAH, G.A., ROKOP, S.E., WANG, C.L., BLECHNER, S.L. & TREWHELLA, J. (1994). Troponin I encompasses an extended troponin C in the Ca²⁺-bound complex: a small-angle X-ray and neutron scattering study. *Biochemistry*, **33**, 8233-8239.
192. ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H. & BRANDT, P.W. (1974). Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* **63**, 168-186.
193. ORENTLICHER, M., BRANDT, P.W. & REUBEN, J.P. (1977). Regulation of tension in skinned muscle fibers: effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am. J. Physiol.* **233**, C127-C134.
194. OVASKA, M. & TASKINEN, J. (1991). A model for human cardiac troponin C and for modulation of its Ca²⁺ affinity by drugs. *Proteins*, **11**, 79-94.

195. OZAKI, H., ZAIZEN, H., KIYOSUE, T., NASU, M. & ARITA, M. (1999). Effect of bepridil on intracellular calcium concentration and contraction in cultured rat ventricular myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **33**, 492-499.
196. PAN, B.S. & POTTER, J.D. (1992). Two genetically expressed troponin T fragments representing alpha and beta isoforms exhibit functional differences. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23052-23056.
197. PARMACEK, M.S., BENGUR, A.R., VORA, A.J. & LEIDEN, J.M. (1990). The structure and regulation of expression of the murine fast skeletal troponin C gene. Identification of a developmentally regulated, muscle-specific transcriptional enhancer. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15970-15976.
198. PARMACEK, M.S. & LEIDEN, J.M. (1991). Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation*, **84**, 991-1003.
199. PARRY, D.A. & SQUIRE, J.M. (1973). Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. *J. Mol. Biol.*, **75**, 33-55.
200. PATE, E. & COOKE, R. (1989). A model of crossbridge action: the effects of ATP, ADP and Pi. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **10**, 181-196.
201. PEARLSTONE, J.R. & SMILLIE, L.B. (1982). 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.
202. PEARLSTONE, J.R. & SMILLIE, L.B. (1985). The interaction of rabbit skeletal muscle troponin-T fragments with troponin-I. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **63**, 212-218.
203. PERRY, S.V., COLE, H.A., HEAD, J.F. & WILSON, F.J. (1972). Localization and mode of action of the inhibitory component of the troponin complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 251-262.
204. PERRY, S.V. (1998). Troponin T: genetics, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **19**, 575-602.
205. PERRY, S.V. (1999). Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol. Cell. Biochem.*, **190**, 9-32.
206. PERSECHINI, A., STULL, J.T. & COOKE, R. (1985). The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, **260**, 7951-7954.
207. PERUTZ, M.F. (1989). Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q. Rev. Biophys.*, **22**, 139-237.

208. PETTE, D. & STARON, R.S. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **116**, 1-76.
209. PETTE, D. & STARON, R.S. (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.*, **170**, 143-223.
210. PEUKER, H., CONJARD, A., PUTMAN, C.T. & PETTE, D. (1999). Transient expression of myosin heavy chain MHC1 alpha in rabbit muscle during fast-to-slow transition. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.*, **20**, 147-154.
211. PHILLIPS, G.N. JR., FILLERS, J.P. & COHEN, C. (1986). Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.*, **192**, 111-131.
212. PICQUET, F., CANU, M.H. & FALEMPIN, M. (2000). Phenotypic changes in the composition of muscular fibres in rat soleus motor units after 14 days of hindlimb unloading. *Pflugers Arch.*, **440**, 229-235.
213. POOLE, K.J.V., ROSENBAUM, G., LORENZ, M. & HOLMES, K.C. (1995). The effect of crossbridges on the calcium sensitivity of the structural change of the regulated thin filament. *Biophys. J.*, **68**, A365.
214. POPP, D. & MAEDA, Y. (1993). Calcium ions and the structure of muscle actin filament. An X-ray diffraction study. *J. Mol. Biol.*, **229**, 279-285.
215. POTTER, J.D. & GERGELY, J. (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **261**, 6096-6099.
216. POTTER, J.D., SHENG, Z., PAN, B.S. & ZHAO, J. (1995). A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2557-2562.
217. PUTKEY, J.A., SWEENEY, H.L. & CAMPBELL, S.T. (1989). Site-directed mutation of the trigger calcium-binding sites in cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12370-12378.
218. PUTKEY, J.A., LIU, W. & SWEENEY, H.L. (1991). 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.
219. RAYMENT, I. & HOLDEN, H.M. (1994). The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 129-134.
220. REEDY, M.K., HOLMES, K.C. & TREGGAR, R.T. (1965). Induced changes in orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle. *Nature*. **207**, 1276-1280.

221. REEDY, M.K. (1968). Ultrastructure of insect flight muscle. I. Screw sense and structural grouping in the rigor cross-bridge lattice. *J. Mol. Biol.*, **31**, 155-176.
222. REISER, P.J., GREASER, M.L. & MOSS, R.L. (1992). Developmental changes in troponin T isoform expression and tension production in chicken single skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, **449**, 573-588.
223. REUBEN, J.P., WOOD, D.S. & EASTWOOD, A.N. (1977). Adaptation of single fiber techniques for the study of human muscle. In Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies. Ed. Rowland L.P., Excerpta Medica Amsterdam, 259-269.
224. ROBERTSON, S.P., JOHNSON, J.D. & POTTER, J.D. (1981). The time-course of Ca^{2+} exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca^{2+} . *Biophys. J.*, **34**, 559-569.
225. ROSENFELD, S.S. & TAYLOR, E.W. (1985). Kinetic studies of calcium and magnesium binding to troponin C. *J. Biol. Chem.*, **260**, 242-251.
226. ROY, R.K., SRETER, F.A. & SARKAR, S. (1979). Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Dev. Biol.*, **69**, 15-30.
227. SAITO, K., YOSHIDA, M. & TANAKA, H. (1992). Sensitivity of cultured and skinned chick myotube to calcium, strontium, and barium ions examined by recording isometric contractions. *J. Cell. Physiol.*, **150**, 45-51
228. SALVIATI, G., BETTO, R. & DANIELI BETTO, D. (1982). Polymorphism of myofibrillar proteins of rabbit skeletal-muscle fibres. An electrophoretic study of single fibres. *Biochem. J.*, **207**, 261-272.
229. SATYSHUR, K.A., RAO, S.T., PYZALSKA, D., DRENDEL, W., GREASER, M. & SUNDARALINGAM, M. (1988). Refined structure of chicken skeletal muscle troponin C in the two-calcium state at 2-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1628-1647.
230. SCHACHAT, F.H., DIAMOND, M.S. & BRANDT, P.W. (1987). Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J. Mol. Biol.*, **198**, 551-554.
231. SCHACHAT, F.H., BRIGGS, M., WILLIAMSON, E., MCGINNIS, H., DIAMOND, M. & BRANDT, P. (1990). Expression of fast thin filament proteins: defining fibers archetypes in a molecular continuum. In Pette D. Ed., The Dynamic State Of Muscle Fibers. Berlin, Walter de Gruyter, 279-291.

232. SCHAERTL, S., LEHRER, S.S. & GEEVES, M.A. (1995). Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation. *Biochemistry*, **34**, 15890-15894.
233. SCHIAFFINO, S. & REGGIANI, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.*, **76**, 371-423.
234. SCHMITT, T. & PETTE, D. (1988). Type I protein is a slow isoform of troponin T. *FEBS Lett.*, **234**, 83-85.
235. SHENG, Z., STRAUSS, W.L., FRANCOIS, J.M. & POTTER, J.D. (1990). Evidence that both Ca^{2+} -specific sites of skeletal muscle TnC are required for full activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 21554-21560.
236. SHENG, Z., PAN, B.S., MILLER, T.E. & POTTER, J.D. (1992). 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.
237. SIA, S.K., LI, M.X., SPYRACOPOULOS, L., GAGNE, S. M., LIU, W., PUTKEY, J.A. & SYKES, B.D. (1997). Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 18216-18221.
238. SMITH, S.J. & ENGLAND, P.J. (1990). The effects of reported Ca^{2+} sensitisers on the rates of Ca^{2+} release from cardiac troponin C and the troponin-tropomyosin complex. *Br. J. Pharmacol.*, **100**, 779-785.
239. SOLARO, R.J., BOUSQUET, P. & JOHNSON, D. (1986). Stimulation of cardiac myofilament force, ATPase activity and troponin C Ca^{2+} binding by bepridil. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**, 502-507.
240. SQUIRE, J. (1981). Muscle regulation: a decade of the steric blocking model. *Nature*, **291**, 614-615.
241. SQUIRE, J.M. (1994). The actomyosin interaction--shedding light on structural events: 'plus ça change, plus c'est la même chose'. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **15**, 227-231.
242. STEFANCSIK, R., JHA, P.K. & SARKAR, S. (1998). Identification and mutagenesis of a highly conserved domain in troponin T responsible for troponin I binding: potential role for coiled coil interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 957-962.
243. STEPHENSON, D.G. & FORREST, Q.G. (1980). Different isometric force - $[\text{Ca}^{2+}]$ relationships in slow and fast twitch skinned muscle fibres of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 358-362.

244. STEPHENSON, D.G. & THIELECZEK, R. (1986). Activation of the contractile apparatus of skinned fibres of frog by the divalent cations barium, cadmium and nickel. *J. Physiol.*, **380**, 75-92.
245. STEVENS, L., MOUNIER, Y., HOLY, X. & FALEMPIN, M. (1990) Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **58**, 334-340.
246. STEVENS, L., MOUNIER, Y. & HOLY, X. (1993). Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am. J. Physiol.*, **264**, R770-R776.
247. STEVENS, L., PICQUET, F., CATINOT, M.P. & MOUNIER, Y. (1996). Differential adaptation to weightlessness of functional and structural characteristics of rat hindlimb muscles. *J. Gravitational Physiol.*, **3**, 54-57.
248. STEVENS, L., SULTAN, K.R., PEUKER, H., GOHLSCH, B., MOUNIER, Y. & PETTE, D. (1999). Time-dependent changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **277**, C1044-C1049.
249. STEVENS, L., GOHLSCH, B., MOUNIER, Y. & PETTE, D. (2000). Upregulation of myosin heavy chain MHClalpha in rat muscles after unweighting and clenbuterol treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 418-421.
250. STEWART, M. (1975) Tropomyosin : evidence for no stagger between chains. *FEBS Lett.*, **53**, 5-7.
251. STRYNADKA, N.C. & JAMES, M.N. (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 951-998.
252. SWARTZ, D.R. & MOSS, R.L. (1992). Influence of a strong-binding myosin analogue on calcium-sensitive mechanical properties of skinned skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20497-20506.
253. SWEENEY, H.L., BRITO, R.M., ROSEVEAR, P.R. & PUTKEY, J.A. (1990). The low-affinity Ca^{2+} -binding sites in cardiac/slow skeletal muscle troponin C perform distinct functions: site I alone cannot trigger contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 9538-9542.
254. SWEENEY, H.L., BOWMAN, B.F. & STULL, J.T. (1993). Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **264**, C1085-C1095.
255. SYSKA, H., WILKINSON, J.M., GRAND, R.J. & PERRY, S.V. (1976). The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem. J.*, **153**, 375-387.

256. SZCZESNA, D., GUZMAN, G., MILLER, T., ZHAO, J., FAROKHI, K., ELLEMBERGER, H. & POTTER, J.D. (1996). The role of the four Ca^{2+} binding sites of troponin C in the regulation of skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8381-8386.
257. TAILLANDIER, D., AUROUSSEAU, E., MEYNIAL-DENIS, D., BECHET, D., FERRARA, M., COTTIN, P., DUCASTAING, A., BIGARD, X., GUEZENNEC, C.Y., SCHMID, H.P. & ATTAIX, D. (1996). Coordinate activation of lysosomal, Ca^{2+} -activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem. J.*, **316**, 65-72.
258. TAKAGI, A. & ENDO, M. (1977). Guinea pig soleus and extensor digitorum longus: a study on single-skimmed fibers. *Exp. Neurol.*, **55**, 95-101.
259. TAKAGI, A., YONEMOTO, K. & SUGITA, H. (1978). Single-skinned human muscle fibers: activation by calcium and strontium. *Neurology*, **28**, 497-499.
260. TAKAHASHI, H., WADA, M. & KATSUTA, S. (1991). Expressions of myosin heavy chain IId isoform in rat soleus muscle during hindlimb suspension. *Acta Physiol. Scand.*, **143**, 131-132.
261. TAKEDA, S., KOBAYASHI, T., TANIGUCHI, H., HAYASHI, H. & MAEDA, Y. (1997). Structural and functional domains of the troponin complex revealed by limited digestion. *Eur. J. Biochem.*, **246**, 611-617.
262. TALBOT, J.A. & HODGES, R.S. (1981). 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.
263. TALMADGE, R.J., ROY, R.R., BODINE-FOWLER, S.C., PIEROTTI, D.J. & EDGERTON, V.R. (1995). Adaptation in myosin heavy chain profile in chronically unloaded muscles. *Basic Appl. Myol.*, **5**, 117-137.
264. TALMADGE, R.J., ROY, R.R. & EDGERTON, V.R. (1996). Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J. Appl. Physiol.*, **81**, 2540-2546.
265. TANOKURA, M., TAWADA, Y., ONOYAMA, Y., NAKAMURA, S. & OHTSUKI, I. (1981). Primary structure of chymotryptic subfragments from rabbit skeletal troponin T. *J. Biochem.*, **90**, 263-265.
266. TANOKURA, M. & OHTSUKI, I. (1982). Location of troponin I-binding on troponin T sequence. *FEBS Lett.*, **145**, 147-149.

267. TANOKURA, M., TAWADA, Y., ONO, A. & OHTSUKI, I. (1983). Chymotryptic subfragments of troponin T from rabbit skeletal muscle. Interaction with tropomyosin, troponin I and troponin C. *J. Biochem.*, **93**, 331-337.
268. TAO, T., GONG, B.J. & LEAVIS, P.C. (1990). Calcium-induced movement of troponin-I relative to actin in skeletal muscle thin filaments. *Science*, **247**, 1339-1341.
269. TEMPLETON, G.H., PADALINO, M., MANTON, J., GLASBERG, M., SILVER, C.J., SILVER, P., DEMARTINO, G., LECONEY, T., KLUG, G., & HAGLER, H. (1984). Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.*, **56**, 278-286.
270. TEMPLETON, G.H., PADALINO, M. & MOSS, R. (1986). Influences of inactivity and indomethacin on soleus phosphatidylethanolamine and size. *Prostaglandins*, **31**, 545-559.
271. THOMASON, D.B. & BOOTH, F.W. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.*, **68**, 1-12.
272. TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350-4354.
273. TRIPET, B., VAN EYK, J.E. & HODGES, R.S. (1997). Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin and their importance in the Ca^{2+} -dependent regulation of muscle contraction. *J. Mol. Biol.*, **271**, 728-750.
274. TRYBUS, K.M. (1994). Role of myosin light chains. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **15**, 587-594.
275. VAN EERD, J.P. & KAWASAKI, Y. (1973). Effect of calcium (II) on Ca^{2+} interaction between the subunits of troponin and tropomyosin. *Biochemistry*, **12**, 4972-4980.
276. VAN EERD, J.P. & TAKAHASHI, K. (1975). The amino acid sequence of bovine cardiac troponin-C. Comparison with rabbit skeletal troponin-C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 122-127.
277. VAN EYK, J.E. & HODGES, R.S. (1988). The biological importance of each amino acid residue of the troponin I inhibitory sequence 104-115 in the interaction with troponin C and tropomyosin-actin. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1726-1732.
278. VANDEKERCKHOVE, J. & WEBER, K. (1979) The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation*, **14**, 123-133.

279. VANDEKERCKHOVE, J., BUGAISKY, G. & BUCKINGHAM, M. (1986). 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.
280. VIBERT, P. & COHEN, C. (1988). Domains, motions and regulation in the myosin head. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **9**, 296-305.
281. VIBERT, P., CRAIG, R. & LEHMAN, W. (1997). Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.*, **266**, 8-14.
282. VOGEL, S., CRAMPTON, R. & SPERELAKIS, N. (1979). Blockade of myocardial slow channels by bepridil (CERM-1978). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **210**, 378-385.
283. WADA, M., HAMALAINEN, N. & PETTE, D. (1995). Isomyosin patterns of single type IIB, IID and IIA fibers from rabbit skeletal muscle. *J. Muscle Res. cell Motil.*, **16**, 237-242.
284. WAGNER, P.D. & GINIGER, E. (1981). Calcium-sensitive binding of heavy meromyosin to regulated actin in the presence of ATP. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12647-12650.
285. WAHR, P.A. & METZGER, J. (1999). Role of Ca^{2+} and cross-bridges in skeletal muscle thin filament activation probed with Ca^{2+} sensitizers. *Biophys. J.*, **76**, 2166-2176.
286. WAKABAYASHI, T., HUXLEY, H.E., AMOS, L.A. & KLUG, A. (1975). Three-dimensional image reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponin I complex. *J. Mol. Biol.*, **93**, 477-497.
287. WANG, C.L., LEAVIS, P.C. & GERGELY, J. (1983). Kinetics of Ca^{2+} release shows interactions between the two classes of sites of troponin-C. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9175-9177.
288. WANG, C.K. & CHEUNG, H.C. (1985). Energetics of the binding of calcium and troponin I to troponin C from rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.*, **48**, 727-739.
289. WARRICK, H.M. & SPUDICH, J.A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **3**, 379-421.
290. WEBER, A. & MURRAY, J.M. (1973). Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiol. Rev.*, **53**, 612-673.
291. WHALEN, R.G., BUTLER-BROWNE, G.S. & GROS, F. (1976). Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 2018-2022.
292. WHITE, S.P., COHEN, C. & PHILLIPS, G.N. Jr. (1987). Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature*, **325**, 826-828.

293. WIDRICK, J.J., KNUTH, S.T., NORENBURG, K.M., ROMATOWSKI, J.G., BAIN, J.L., RILEY, D.A., KARHANEK, M., TRAPPE, S.W., TRAPPE, T.A., COSTILL, D.L. & FITTS, R.H. (1999). Effect of a 17 day spaceflight on contractile properties of human soleus muscle fibres. *J. Physiol.*, **516**, 915-930.
294. WILKINSON, J.M. (1980). Troponin C from rabbit slow skeletal and cardiac muscle is the product of a single gene. *Eur. J. Biochem.*, **103**, 179-188.
295. WILLADSEN, K.A., BUTTERS, C.A., HILL, L.E. & TOBACMAN, L.S. (1992). Effects of the amino-terminal regions of tropomyosin and troponin T on thin filament assembly. *J. Biol. Chem.*, **267**, 23746-23752.
296. WILLIAMS, D.L. Jr., GREENE, L.E. & EISENBERG, E. (1988). Cooperative turning on of myosin subfragment 1 adenosinetriphosphatase activity by the troponin-tropomyosin-actin complex. *Biochemistry*, **27**, 6927-6993.
297. WILSON, G.J. & STEPHENSON, D.G. (1990). Calcium and strontium activation characteristics of skeletal muscle fibres from the small marsupial *Sminthopsis macroura*. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **11**, 12-24.
298. WOODS, E.F. (1967). Molecular weight and subunit structure of tropomyosin B. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2859-2871.
299. WOOD D.S., ZOLLMAN, J., REUBEN, J.P. & BRANDT, P.W. (1975). Human skeletal muscle ; properties of the « chemically skinned » fiber. *Science*, **187**, 1075-1076.
300. WU, Q.L., JHA, P.K., RAYCHOWDHURY, M.K., DU, Y., LEAVIS, P.C. & SARKAR, S. (1994). 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.
301. XU, C., CRAIG, R., TOBACMAN, L., HOROWITZ, R. & LEHMAN, W., (1999). Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophys. J.*, **77**, 985-992.
302. YATANI, A., BROWN, A.M. & SCHWARTZ, A. (1986). Bepridil block of cardiac calcium and sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**, 9-17.
303. ZOT, H.G., & POTTER, J.D. (1982). A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7678-7683.
304. ZOT, A.S. & POTTER, J.D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **16**, 535-559.

305. ZOT, A.S. & POTTER, J.D. (1989). Reciprocal coupling between troponin C and myosin crossbridge attachment. *Biochemistry*, **28**, 6751-6756.