



**Université de Strasbourg**  
**Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**  
**IGBMC – CNRS UMR 7104 – Inserm U 964**

# **THESE**

Présentée par:

**Georges Arielle PECHE**

Soutenue le : **20 Janvier 2017**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du Vivant  
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

## **Physiopathologie de la myopathie à agrégats tubulaires**

**Thèse dirigée par :**

**M. Jocelyn LAPORTE**

Docteur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS**

**M. Nicolas DEMAUREX**

Professeur, Université de Genève

**M. Olivier DORCHIES**

Docteur, Université de Genève

**EXAMINATEUR INTERNE**

**M. Daniel METZGER**

Docteur, Université de Strasbourg

**A mes parents et ma grand-mère,**

“My first, my last, my everything  
And the answer to all my dreams  
You're my sun, my moon, my guiding star  
My kind of wonderful, that's what you are...”  
Barry White

## Remerciements/Acknowledgements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury : le Pr Nicolas Demaurex, le Dr Olivier Dorchies, le professeur Jean Louis Mandel et le Dr Daniel Metzger pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci pour votre patience et pour le temps que vous m'avez accordé.

Un énorme merci à **Jocelyn**, pour m'avoir donné il y a 3 ans de cela, la chance d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire. Merci de m'avoir permis de vivre ces 3 ans au sein de la MAD team. Merci pour ta patience, ton calme, tes conseils et le temps que tu m'as accordé chaque fois que je suis venue cogner à ta porte pour discuter de x ou y résultat.

Merci à toute la MAD team passée et présente pour avoir contribué à faire de ces 3 années de ma vie des années riches et pleines de joie et de moments de partage. Et là je pense surtout à tous les kilos que j'ai gagnés grâce à vos délicieux gâteaux d'anniversaires, aux galettes des rois, aux crêpes « parties », aux barbecues chez le grand chef, aux multiples soirées/restos, tartes flambées, repas de Noël et j'en passe ! Merci d'avoir été ma famille ici en Alsace. ☺

Un grand merci à toi **Johann**, pour ton aide dans mes débuts, pour les corrections et les relectures que tu as fait minutieusement à chaque fois afin de t'assurer que je présentais toujours mon travail de la façon la plus positive !

**Belinda**, Belinda ❤️ !!! Thank you sooo much ! You taught me so many things through this thesis: patience, positivity, organization! I'm really grateful that you were around! Thanks for all the time you invest on me, though I wasn't your student.

**Vale**, bella! Non sono ancora in grado di scrivere in italiano e so che google t. non è granché. Non so da dove cominciare o dove finire quando penso a tutto quello che hai fatto per me! Grazie mille per tutto: your help, care, patience, love, friendship...there's so many things! Grazie per essere stata mia sorella e la mia roccia in questo posto. Ti amo tanto! In all case, I don't plan to leave you :p

**Pascal**, "Doudou"! Merci pour ta gentillesse, et surtout pour tous les trésors de patience que tu as déployés pour m'apprendre à me servir des différents confocaux, FiJi, ImageJ, Imaris etc, mais également pour le temps que tu m'as sans cesse accordé pour discuter de mes différentes idées, pas toujours de génie ☺.

**Hichem**, le « summum de la générosité » : merci de m'avoir initié aux joies du western blot, et merci pour ton aide à chaque fois que j'en ai eu besoin. Surtout, surtout, pour ta patience à chaque fois que je suis venue t'embêter. Comme dit l'adage, qui aime bien châtie bien...

**Suzie**, Suzette : Merci pour ta confiance, tes encouragements, ton aide, ta gentillesse, toutes les blagues et les bons moments passés à aller encourager la SIG, courir dans le froid ou non, ... à réviser la géographie de la France ;) !

**Ivana**, dear Ivana! You are an amazing woman! I just know how to say happy birthday in Serbian, but I have THOUSANDS of things I'm grateful for! Your patience, your listening, and I will never forget all you did for me when I was sick or beside that... хвала! **Catherine**, tu es un peu ma grande soeur dans ce labo: merci pour tous les bons moments passés ensemble, pour avoir partagé tes connaissances en culture cell et Cie, et merci de m'avoir toujours aidé à trouver des solutions à mes problèmes. **Cricri**, ma Cricri dame violette: comment je ferai plus tard sans ton énergie et ta sagesse? Merci, merci, merci pour ta gentillesse, tes plus belles fleurs que tu m'as toujours offert, et tous ces cadeaux ayant des papillons que tu as déniché pour mon plus grand plaisir. **Aymen**, le calme et la gentillesse absolus: c'était un réel plaisir de t'avoir pour « étudiant » indirectement ! Bon courage pour ta thèse et merci d'avoir su rester calme même quand je devenais un peu folle. **Raphael** le doux : un énorme merci pour ton aide précieuse et le temps que tu m'as accordé à chaque fois que j'ai eu besoin d'aligner, de vérifier, de prédire ! **Vanessa** : merci de m'avoir écouté râler sans t'en plaindre, pour les multiples services rendus avec les cellules et pour m'avoir sans cesse remonté le moral. **Anne-So** : Merci pour tous les protocoles partagés, ta franchise rafraichissante et ta motivation à toute épreuve! Merci à vous **Xavière, Matthieu, Maxime, Roberto, Elodie, Nicolas, Valérie, Chrystel, Xenia, Vasugi...** pour toutes les discussions constructives, non scientifiques ou scientifiques et intéressantes. Dommage, je n'aurai pas plus de temps pour mieux connaître certains d'entre vous, mais ainsi va la vie ☺. Je vous souhaite autant de bonheur que j'en ai eu dans ce labo !

Je voudrais dire un grand merci à **Jean-Louis Mandel**, pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse en 1<sup>ère</sup> année. Merci pour les discussions enrichissantes, et pour avoir tenu à être présent le jour de la soutenance. Merci à tous les membres de son équipe : **Angélique, Francesca, Florent, Timothée, Éric, Amélie et Andréa** pour avoir été des voisins drôles, gentils, pour les discussions intéressantes, votre aide quand j'en ai eu besoin et le partage de matériel.


Merci à **Jean-Marie Garnier** pour toutes les discussions intéressantes et les multiples astuces de clonage qui ont été salutaires pour la réalisation d'une grande partie de ma thèse.

Je ne saurais imaginer ces 3 ans et 4 mois à l'IGBMC sans de nombreuses personnes extérieures à mon équipe, qui sont devenues des amis, et qui ont chacun apporté à leur façon une pierre à l'édifice de ma thèse. **Sam**, mi amiga y mi pequena mama: Gracias por todas las cosas que hiciste por mi. This is where my spanish ends :p. Thanks for the support, the trust, the help, the care, the feeding, the girls nights, the get together, etc! You are an amazing friend and I couldn't dream better friend than you! **Tiphaine**, ma partenaire de la pièce de culture: Merci pour ton amitié, ton soutien, tes encouragements et d'avoir partagé tes réactifs avec moi, mais aussi tes « fermoirs » de boucles d'oreilles. Courage pour le reste du chemin! **Damy**, my American black sister ( :p) : thanks for your support, your help, your friendship and for all that time you helped me with the sonicator! **Chanchan**, mon autre petite mère: merci pour ta sagesse, tes multiples conseils, ton aide précieuse sur toutes ces petites choses nécessaires au quotidien, la chasse au chocolat de pâques toujours bien caché et pour m'avoir « adopté » alors que je n'étais même pas de ton labo. Qui dit Chanchan, dit **Mims** ! Ma belle dame, merci pour ta bonne humeur, tes sourires, ta joie de vivre, ton énergie et ces quelques cours de danse africaine qui m'ont fait tant de bien! **Adrien** : pour m'avoir servi x fois de chauffeur, d'hôte mais aussi pour ton amitié et tes conseils. **Nadia**, merci pour tes précieux conseils, ton écoute et ton aide chaque fois que j'en ai eu besoin.

Merci à tous les membres du département TMN pour toutes les discussions et échanges enrichissants que nous avons eu au cours des différentes retraites.

Merci à la plateforme de microscopie électronique et surtout à **Coralie** pour ta patience et les nombreuses coupes que tu as générées pour moi. Merci à **Denis de Mediaprep** pour les boîtes de Pétri in comptables, à toutes les personnes de la plateforme de microscopie pour leur aide, à **Betty et ses filles** en culture cellulaire pour les nombreuses cellules et les litres de milieux et à toutes les personnes de l'animalerie du RdC et du 1<sup>er</sup> étage, particulièrement **Djemo**. Merci également à **Pascale Koebel**, pour les discussions et la production d'AAV vides. Merci aussi à **Anne** du service de criblage pour son aide et les discussions sur le projet. Merci à **Gilles** pour la production des anticorps et à **Pascal E.** pour les peptides. Un énorme merci à **Maitey** pour son aide pour l'impression de ma thèse, des posters, et autres booklets réalisés...

Merci aux étudiants et post-doc du SPB, notamment David, Michel, Alexey et Cie qui m'ont permis de vivre une expérience enrichissante et de vrais moments de bonheur au sein de l'institut par l'organisation du Get Together, des retraites, des soirées...

A ma famille, celle des gènes, celle du sang, celle qu'on ne choisit pas, mais qui est une bénédiction et m'a porté jusqu'ici. En particulier, toi **mamie**, merci pour tes encouragements, la force et l'énergie que tu me transmets, et pour ton amour sans pareil. **Papa, maman**, vous êtes mon soutien sans faille, ceux qui m'ont toujours porté plus haut, plus loin, merci pour votre confiance et votre amour inconditionnel qui m'a réchauffé le cœur par les temps les plus difficiles. A ma sœur **Déogrâce**, mon frère **Din**, parce que sans vous je ne serai pas ce petit bout de femme qui veut toujours se surpasser, merci pour votre soutien et votre amour. **Maëlyss**, ma choupinet, si tu savais combien tu as été essentielle à ce travail par ton amour, tes sourires, ton adorable bouille...je t'aime ! Ma **tata Nounou** , tu as permis à cette histoire de commencer, merci pour ton accueil, ton amour, ton soutien, tes conseils et tout ce que tu m'as donné. Sans toi et les enfants, je n'aurais probablement jamais été là. **Tonton Is**, mon « ex », tu as été depuis toujours mon inspiration, mon modèle, mon mentor. Merci pour tes encouragements, les relectures, les conseils, et parce que tu as toujours cru en moi. **Nanou, Teddy, Bobby, Jenny**, merci pour votre soutien et votre confiance.

Pour finir, mon autre famille, celle qu'on se choisit et qui nous choisit : **Myriam** : parce que tu as toujours été ma locomotive, et que j'ai puisé en toi la force et le courage dont j'avais besoin tous les jours, merci! **Maurille**, mon béninois préféré : merci d'avoir toujours été là pour moi, pour m'écouter, me conseiller, me motiver et tant d'autres choses! Je finis par croire que ce jour-là quand je t'ai croisé, tu étais destiné à être mon cadeau d'anniversaire. Merci à toi ma grande sœur de cœur, **Sarah Vulcain**, parce que tu m'as toujours soutenu, tu as toujours cru en moi et m'as toujours poussé à travailler dur ! **Yanniss**, l'autre versant de moi, ma motivation, on en a parcouru du chemin depuis le temps, entre les terrains de basket et les moments de révision, cette envie tenace de passer le concours de médecine ensemble que tu as finalement fait tout seul (quelle lacheuse je fais !), les soirées et les journées à essayer de réviser, Grenoble, Strasbourg...bref ! Tu as été pour beaucoup dans ce parcours, depuis le début, toi et ton balai de commandant, toi et tes heures de révisions... merci pour tout ça, et pour la « pensée » que tu as pour moi chaque jour même si elle n'est pas toujours manifeste☺. Merci à my homie, **Isszy** pour tous les bons moments partagés et tes encouragements, à **Carole Derby, Irène Ekindy**

et **Nelly Meba'a** pour votre amitié inébranlable. Merci **Asmaa**, pour tous les bons plats que tu m'as préparés (car ventre affamé n'a point d'oreille), et qui ont contribué à mon rétablissement. Merci à toi **Arnaud**, pour m'avoir encouragé et nourri surtout quand j'étais fatiguée et agaçante, merci d'avoir été là pour me faire rire et me changer les idées. Last, but not least, les derniers mais pas les moindres: mes amis de toujours, dans toutes les situations, le groupe de chacun, **MERCI** d'avoir été mon roc depuis toujours, de m'avoir laissé me défouler sur vous quand j'étais au bout du rouleau, et d'avoir été, chacun à sa façon, d'une aide inestimable à la réalisation de ce travail: **Belange Fomethe, Sonia Mogo, Kelly Nguéké, Danielle Abougou, Harlem Tchipawu, William Mvondo, Guy Axel Zambo, Abel Hapi, Hess Nyabeu**. Harlem, il est indispensable que je te remercie encore pour les heures d'appel passées à m'écouter parler, de tout, de rien, et même parfois de choses que tu ne comprends pas. Merci pour ton soutien chaque jour depuis ce jour où j'ai été malade, toutes ces fois où tu m'agaces quand même parce que je ne mange pas assez ou que je mange tard, les appels pour que je ne rate pas mes interventions Téléthon du matin, tes encouragements jusqu'à la dernière minute, et même là au moment où j'écris☺.

## Résumé

STIM1 (stromal interaction molecule 1) est le senseur calcique du RE/RS. Il est majoritairement localisé au niveau de la membrane du RE/RS, mais il existe un pool de STIM1 localisé à la membrane plasmique. STIM1 est composé d'un domaine luminal comportant un signal peptidique, 2 EF-hand canonique et non canonique et un domaine SAM, ainsi que d'un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique constitué de 3 domaines coiled-coil, une hélice inhibitrice, un domaine inhibiteur, une région d'activation d'ORAI1 (SOAR), une région riche en proline et sérine et une région riche en lysine. L'EF-hand de STIM1 est impliqué dans la liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, suite à une vidange calcique, STIM1 se déplie, oligomérisse et migre aux jonctions RE-MP pour recruter et activer le canal calcique ORAI1, hautement sélectif pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce processus est connu sous le nom de store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE). STIM1 est une protéine exprimée de façon ubiquitaire, avec un fort niveau d'expression dans le muscle squelettique. Des mutations dans *STIM1* ont été identifiées par notre équipe et d'autres comme étant responsables de la myopathie à agrégats tubulaires (TAM, #160565), mais aussi du syndrome de Stormorken et du syndrome plaquettaire de York. La plupart des mutations retrouvées chez les patients sont des mutations hétérozygotes entraînant un gain de fonction. Ces 3 maladies ont en commun la myopathie à agrégats tubulaires, caractérisée par la présence d'agrégats tubulaires dans les biopsies musculaires de patients. Ainsi, le but de cette recherche était d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la TAM. Pour cela, nous avons étudié l'impact des mutations TAM et Stormorken à différentes étapes du SOCE dans des modèles cellulaires transfectés ou non, ainsi que dans un modèle murin par injection d'AAV STIM1 portant les mutations d'intérêt. Nous avons montré que les mutations TAM et Stormorken entraîne une augmentation du niveau d'expression protéique de STIM1 en endogène et en surexpression. Nous avons aussi montré que les mutations TAM et Stormorken ont un effet dominant négatif sur le clustering de la protéine WT et de son isoforme long. De plus, STIM1 mutant forme des clusters constitutifs localisés à proximité de la membrane plasmique et séquestre ORAI1 à ses clusters indépendamment de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce recrutement d'ORAI1 entraîne une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et par la suite l'activation de la translocation du facteur de transcription NFAT. *In vivo*, nous avons montré que la surexpression de STIM1 entraîne la formation d'agrégats tubulaires dans le muscle tibialis anterior de souris à 6 mois, ce qui suggère que l'expression de STIM1 doit être strictement régulée dans le muscle. De plus, la similarité des impacts des mutations TAM et Stormorken sur les différentes étapes du SOCE testées suggèrent que ces maladies peuvent être regroupées en une maladie ayant un large spectre. Comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la myopathie à agrégats tubulaires est essentiel pour définir des « readout » afin de développer des thérapies pour les patients atteints de myopathie à agrégats tubulaires.



# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations.....	1
Introduction.....	5
1. Le muscle squelettique.....	6
1.1. Généralités et organisation du muscle squelettique.....	6
1.2. Le sarcomère.....	7
1.3. Organisation membranaire du muscle squelettique.....	10
2. L'entrée capacitative du Ca <sup>2+</sup> (Store-operated Ca <sup>2+</sup> entry, SOCE).....	28
2.1. Mécanisme du SOCE médié par STIM1 et Orai1.....	29
2.2. Les mutations dans <i>STIM1</i> et <i>ORAI1</i> dans les pathologies humaines.....	34
3. La myopathie à agrégats tubulaires et le syndrome de Stormorken.....	36
3.1. La myopathie à agrégats tubulaires.....	36
3.2. Le syndrome de Stormorken.....	41
Matériels et méthode.....	43
Résultats.....	56
1. Recherche de nouvelles mutations à l'origine de la myopathie à agrégats tubulaires.....	57
1.1. Contexte.....	57
1.2. But de l'étude.....	57
1.3. Résultats.....	57
1.4. Conclusion.....	59
2. Etude <i>in vitro</i> de l'impact des mutations de TAM et Stormorken de <i>STIM1</i> sur le SOCE.....	60
2.1. Introduction.....	60
2.2. But de l'étude.....	61
2.3. Résultats.....	61
2.4. Conclusion.....	80
3. Etude comparative des myoblastes C2C12 et des cellules HeLa comme modèle cellulaire d'étude de TAM et Syndrome de Stormorken.....	82
3.1. Introduction.....	82
3.2. But de l'étude.....	82
3.3. Résultats.....	82
3.4. Conclusion.....	85
4. Physiopathologie de la myopathie à agrégats tubulaires : une étude <i>in vivo</i> .....	87

4.1. Introduction.....	87
4.2. But de l'étude.....	87
4.3. Résultats.....	88
4.4. Conclusion.....	96
Discussion & Perspectives.....	98
1. Identification de la variation STIM1 P165L.....	100
2. Impact des mutations TAM et Stormorken de STIM1 sur le SOCE et la formation des agrégats tubulaires.....	103
2.1. Surexpression de STIM1 dans les myoblastes de patients TAM.....	103
2.2. Clustering constitutif des mutants TAM et Stormorken de STIM1.....	104
2.3. Recrutement d'Orai1 aux clusters de STIM1.....	109
2.4. Impact des mutations TAM et Stormorken sur l'entrée du Ca <sup>2+</sup> .....	110
2.5. Activation des voies dépendantes du Ca <sup>2+</sup> .....	111
2.6. Formation des agrégats tubulaires <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	112
3. Les myoblastes C2C12 comme modèle d'étude de la TAM.....	118
4. Conclusion.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	121
Bibliographie.....	122

# Liste des figures

## Figure

1. Organisation schématique du muscle et de la fibre musculaire	p.6
2. Organisation du sarcomère	p.7
3. La jonction neuromusculaire	p.10
4. Représentation schématique du tubule T	p.11
5. Structure d'ORAI1 et homologues	p.15
6. Organisation structurale de STIM1	p.24
7. Mécanisme d'activation du SOCE	p.28
8. Localisation des mutations TAM et Stormorken dans STIM1	p.37
9. Classification des agrégats tubulaires et histologie	p.38

# Liste des abréviations

AAV: adeno-associated virus

Ach: acétylcholine

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADP: Adénosine diphosphate

ARC : arachidonic regulated channel

ARN: acide ribonucléique

ATP: adénosine triphosphate

bFGF: basic fibroblast growth factor

Ca<sup>2+</sup>: calcium

CASQ: calséquestrine

CAD: CRAC activation domain

CC1: coiled-coil 1

CDI: calcium dependent inactivation

CK: créatine kinase

CLEM: correlated light and electron microscopy

COX: cyclo-oxygenase

CRAC: calcium release activated channel

CRACM: calcium release activated channel modulator

DHPR: dihydropyridine receptor

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DTT: dithiothréitol

E.coli: Escherichia coli

ECC: excitation-contraction coupling

EGF: epidermal growth factor

eGFP: enhanced green fluorescent protein

EGTA: ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ERM: ezrin, radixin, moesin

GFP: green fluorescent protein

GoF: gain-of-function

GSK3 $\alpha$ : glycogen synthase kinase 3 alpha

HE: hematoxylin eosin

HEK: human embryonic kidney

HRP: horseradish peroxidase

HS: horse serum

HVA: high voltage activated

ICRC: intracellular calcium release channels

ID: inhibitory domain

IgG: immunoglobulin G

IP3R: inositol-3-phosphate receptor

K<sup>+</sup>: potassium

KO: knockout

LoF: loss-of-function

LVA: low voltage activated

ME: microscopie électronique

MHC: myosin heavy chain

MLC : myosin light chain

MP: membrane plasmique

MTJ : myotendinous junction

MyBPC: myosin binding protein C

Na<sup>+</sup>: sodium

NADH-TR: nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase

NCX: Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger

NFAT : nuclear factor of activated T cells

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B cells

NMJ: neuromuscular junction

OASF: ORAI1-activating small fragments

ORMLD3: mammalian ORM-(yeast) like protein isoform 3

PBS: phosphate buffer saline

PFA: paraformaldehyde

PIC: protease inhibitor cocktail

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PKC: protein kinase C

PMSF: phénylméthylsulfonyl fluoride

POST: partner of stromal interaction molecule

qsp: qui suit la prescription

RE: réticulum endoplasmique

ROC: receptor operated channel

RS: réticulum sarcoplasmique

RyR: ryanodine receptor

SAC: stretch activated channel

SAM: sterile alpha motif

SARAF: store-operated calcium entry associated regulatory factor

SCID: severe combined immunodeficiency

SDH: succinate deshydrogenase

SDS: sodium dodecyl sulfate

SERCA: sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase

SOAR: STIM-ORAI activating region

SOC: store operated channel

SOCE: store operated calcium entry

STIM: stromal interaction molecule

SVF: sérum de veau foetal

TA: tibialis anterior

TAM: tubular aggregate myopathy

TBS: Tris buffer saline

TBS-T: Tris buffer saline-tween

TIRF: total internal reflection fluorescence

Tn: troponine

TRP: transient receptor potential

WT: wild-type

YFP: yellow fluorescent protein

# Introduction



# 1. Le muscle squelettique

## 1.1. Généralités et organisation du muscle squelettique

Les muscles sont des organes spécialisés et constituent près de 40% de la masse corporelle du corps humain. Le muscle squelettique constitue l'un des 3 types de muscles du corps, les 2 autres étant les muscles lisses et le muscle cardiaque. Il est sous le contrôle du système nerveux central, et de ce fait, il est impliqué dans les mouvements réflexes et volontaires tels que la respiration, la motricité, la thermogénèse ou encore la stabilisation des positions du corps. Un tissu connecteur appelé fascia entoure la membrane de chaque muscle, l'épimysium, et le sépare du milieu environnant (Tortora et Gabrowski, DeBoeck Université, 2001). Chaque muscle squelettique est composé de paquets de fibres musculaires appelés faisceaux musculaires qui sont eux même composés de fibres musculaires (figure 1). Le muscle squelettique est rattaché aux os par le tendon, et grâce à ses propriétés de contractilité, d'excitabilité, d'extensibilité, de plasticité et d'élasticité, il est capable de se contracter et de générer de la force.

Les fibres musculaires, encore appelés myofibres, sont des cellules allongées d'un diamètre compris entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  (Tortora et Gabrowski, DeBoeck Université, 2001). Chaque fibre musculaire provient de la fusion de plusieurs cellules non matures appelées myoblastes au cours de la différenciation musculaire. Les myotubes formés à la suite de la fusion des myoblastes continuent le processus de différenciation pour former la fibre musculaire mature dont les noyaux sont situés en périphérie. On distingue différents types de fibres musculaires, en fonction de leurs propriétés :

- Les fibres de type I : ce sont des fibres à contraction lente, de couleur rouge, riches en oxygène, en mitochondries et en vaisseaux sanguins. Elles sont très résistantes à la fatigue.

- Les fibres de type IIa sont des fibres à contraction modérément rapide, riches en oxygène et en mitochondries.
- Les fibres de type IIx : ce sont des fibres à contraction rapide et ayant une résistance modérée à la fatigue.
- Les fibres de type IIb : encore connues sous le nom de fibres glycolytiques à contraction rapide, ces fibres sont de couleur blanche, du fait de leur faible contenu en myoglobine et donc en oxygène. Elles ont un métabolisme anaérobie et ne sont pas résistantes à la fatigue.

La fibre musculaire est délimitée par une membrane appelée sarcolemme. Chaque fibre musculaire contient dans son sarcoplasme des myofibrilles, contenant à leur tour des milliers de myofilaments qui forment l'unité de base de la contraction, appelé sarcomère (figure 2).

## 1.2.Le sarcomère

Le caractère strié du muscle squelettique est dû aux répétitions tous les 2 à 3  $\mu\text{m}$  des sarcomères (Huxley, AF, 1956). Le long de chaque myofibrille, on retrouve une alternance de bandes foncées, bandes A (anisotrope) et de bandes claires ou bandes I (isotrope) (Carlsen and Knappeis 1955). Au milieu de la bande I se trouve une zone foncée appelée ligne Z, et la zone H quant à elle est la région claire localisée au milieu de la bande A. Chaque sarcomère consiste en 2 lignes Z, suivie chacune d'une bande I, d'une bande A puis d'une zone H et de la ligne M au centre (figure 2). De nombreuses protéines sont impliquées dans l'organisation du sarcomère, mais les protéines les plus importantes sont les myofilaments d'actine et de myosine, qui constituent à eux seuls 70% des protéines myofibrillaires.

### *1.2.1. Les filaments fins*

Ils sont composés principalement des filaments d'actine sous forme d'hélice, retrouvés majoritairement au niveau de la bande I et qui s'étendent de la ligne Z à la bande H. Il existe 3 types d'actine,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , mais l'actine  $\alpha$  est la sous-famille exprimée dans le muscle (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/58>). Chaque molécule d'actine possède un site de fixation pour la tête de myosine. Les filaments d'actine sont recouverts au niveau de la ligne Z par la protéine CapZ et par la tropomoduline au niveau de la ligne M. La troponine et la tropomyosine sont 2 protéines clé attachées de façon régulière au filament d'actine et qui régulent sa contraction au niveau du sarcomère (Spudich, Huxley et al. 1972). La troponine régule directement la liaison de la myosine à l'actine et est faite de 3 sous-unités : la troponine I (TnI) est l'unité inhibitrice. Cette protéine se positionne le long du filament d'actine et positionne la tropomyosine sur le site actif de l'actine, inhibant ainsi la liaison à la myosine. La troponine C (TnC) est la sous-unité qui lie le  $\text{Ca}^{2+}$ . Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du réticulum sarcoplasmique (RS) se lie à la TnC, le complexe troponine-tropomyosine change de conformation, entraînant une exposition des sites de liaison de la myosine sur l'actine, et permettant ainsi la contraction musculaire (Hitchcock, Huxley et al. 1973). La troponine T (TnT) est la 3<sup>e</sup> sous-unité et connecte les 2 autres sous-unités à la tropomyosine et à l'actine. La tropomyosine joue un rôle dans le positionnement de la troponine et stabilise et renforce les filaments d'actine (figure 2).

### *1.2.2. Les filaments épais*

Les filaments épais sont faits de polymères de molécules de myosine. Chaque molécule de myosine ressemble à 2 bâtons de golf entrecroisés, et dont les queues sont faites de chaînes lourdes (Myosin Heavy Chain, MHC) qui s'associent à une chaîne légère formant la tête de myosine (Myosin Light Chain, MLC) dirigée vers les filaments d'actine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9961/>) (figure 2). La myosine est une protéine motrice et représente la protéine myofibrillaire la plus abondante. En microscopie électronique

(ME), elle apparaît comme un pont entre les filaments fins, donnant le couleur sombre à la bande A. La myosine joue un rôle structural de par sa queue, et un rôle enzymatique par sa tête. En effet, les têtes globulaires de la myosine possèdent une activité ATPase qui constitue la source majeure d'énergie pour la contraction (Biro and Szent-Gyorgyi 1949). Les molécules d'ATP liées à la tête de myosine sont hydrolysées en ADP (adénosine diphosphate) et phosphate inorganique (Pi), libérant de l'énergie. L'énergie ainsi libérée active les têtes de myosine qui changent de conformation et lient les filaments d'actine. Ce processus conduit à la contraction musculaire. Seule la liaison d'une nouvelle molécule d'ATP à la tête de myosine déstabilise sa liaison avec l'actine, entraînant ainsi le détachement des 2 protéines. Cette molécule d'ATP sera à nouveau hydrolysée, ce qui va conduire à une nouvelle contraction lorsque les sites de liaison de l'actine seront disponibles. La créatine kinase (CK ou CpK) est une enzyme qui sert de tampon dans le muscle, en catalysant la formation d'ATP à partir d'ADP et de Pi libérés suite à l'hydrolyse des molécules d'ATP par les têtes de myosine.

La structure et l'organisation des filaments épais est assurée par un groupe de protéines appelées protéines associées à la myosine. La titine est la 3<sup>e</sup> protéine la plus abondante dans le muscle après l'actine et la myosine. Elle s'étend de la ligne Z à la ligne M et définit la longueur et l'organisation du filament de myosine. Elle est ancrée en N-terminal à la ligne Z grâce à une protéine de coiffe appelée T-cap (coiffe de la titine) et en C-terminal elle lie la myoméline et MyBP-C (myosin-binding protein C). Dans le muscle mature, la titine maintient l'intégrité du sarcomère, que le muscle soit en état d'étirement ou de relaxation (Tskhovrebova and Trinick 2010).

La contraction musculaire se fait par glissement des filaments fins et épais les uns sous les autres, selon un mécanisme décrit par Hanson et Huxley et qui conduit au raccourcissement des sarcomères (Huxley and Hanson 1959).

### 1.3. Organisation membranaire du muscle squelettique

Le fascia protège le tissu musculaire de l'environnement extérieur. S'en suit une 2<sup>e</sup> couche plus interne qui entoure tout le muscle appelée épimysium. Le pérимysium entoure ensuite les faisceaux de fibres musculaires, et chaque fibre est entourée par l'endomysium. La membrane de la fibre musculaire est le sarcolemme.

#### 1.3.1. Le sarcolemme

C'est la membrane plasmique qui entoure chaque fibre musculaire. Elle a une organisation spécifique, avec différents domaines très spécialisés tels que les tubules T, les cavéoles et les jonctions neuromusculaires et myotendineuses. Elle possède également de nombreux canaux nécessaires au transport des ions, notamment les canaux calciques.

##### 1.3.1.1. La jonction neuromusculaire (NMJ)

C'est un type de synapse particulier au muscle. Elle est composée d'un neurone moteur (motoneurone) qui fournit la membrane pré-synaptique, d'une fente synaptique et d'une membrane post-synaptique provenant de la myofibre (figure 3). L'arrivée d'un potentiel d'action au travers de l'axone du motoneurone déclenche l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, entraînant ainsi une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  conduit à la fusion des vésicules contenant le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) avec la membrane pré-synaptique, ce qui conduit à la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique. L'ACh va ainsi se lier à ses récepteurs localisés sur le sarcolemme, entraînant leur ouverture et donc le passage de cations, notamment des ions sodium ( $\text{Na}^+$ ). Cet échange d'ions conduit à la dépolarisation de la membrane musculaire, activant une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme suivie par la contraction musculaire et ainsi le couplage excitation-contraction.

#### 1.3.1.2. La jonction myotendineuse (MTJ)

Ce type de jonction est localisée à l'endroit où le sarcoplasme se connecte aux faisceaux de fibres de collagène formant les tendons. Cette jonction permet la transmission de la tension générée par la contraction des protéines myofibrillaires aux protéines extracellulaires (Tidball 1991).

#### 1.3.1.3. Les cavéoles

Ce sont des sous-compartiments du sarcolemme consistant en des invaginations de 50 à 100 nm de diamètre et constitués principalement de cavéolines. Les cavéoles sont des radeaux lipidiques riches en cholestérol et en sphingolipides, contrairement aux autres régions membranaires (Al-Qusairi and Laporte 2011). Elles forment des vésicules qui sont principalement alignées de façon adjacentes en rangée de 7 à 15 au niveau des bandes I, mais peuvent se retrouver de façon éparse sous le sarcolemme. Les cavéoles servent de réservoir de membranes et jouent un rôle dans le trafic vésiculaire et la transduction du signal. Dans le muscle squelettique, la formation des cavéoles repose principalement sur cavéoline-3, un membre de la famille des cavéolines. Il a été suggéré que les cavéoles pourraient participer à la formation des tubules T (Zampighi, Vergara et al. 1975).

#### 1.3.1.4. Les tubules T

Encore appelés tubules transverses, les tubules T sont des invaginations régulières du sarcolemme à l'intérieur de la fibre musculaire, entre les myofibrilles. Ces structures spécialisées permettent la propagation rapide du potentiel d'action à la fibre musculaire entière. En coupe transversale, le tubule T est flanqué de chaque part par 2 citernes terminales du RS formant la triade (figure 4) (Franzini-Armstrong and Porter 1964). Les triades sont impliquées dans le couplage excitation-contraction (ECC) qui permet la contraction musculaire.

### 1.3.1.5. Les canaux calciques du sarcolemme

#### Le récepteur aux dihydropyridines (DHPR)

Le couplage excitation-contraction au niveau du muscle conduit à une libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme. Ce mécanisme fait principalement intervenir les canaux calciques DHPR localisés de façon majoritaire au niveau des tubules T (Fosset, Jaimovich et al. 1983, Rios and Brum 1987). DHPR est un canal calcique sensible au voltage, appartenant à la sous-famille des canaux  $\text{CaV}$  HVA (pour high voltage activated) de type L (pour long lasting). De ce fait, une fois activé suite à la dépolarisation membranaire arrivant au niveau du tubule T, DHPR peut activer RyR (voir ultérieurement chapitre RyR) pour permettre la libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS ou générer une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  durable (Cognard, Romey et al. 1986).

DHPR tient son nom de sa sensibilité aux dihydropyridines (exemple : nifédipine), mais il est également sensible aux phénylalkylamines (exemple : vérapamil) et aux benzothiazépines (exemple : diltiazem). Il est formé de 4 sous-unités membranaires:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  et d'une sous-unité cytosolique  $\beta$  (Jay, Sharp et al. 1991). Dans le muscle squelettique, l'interaction entre DHPR et RyR se fait grâce à une boucle de la sous-unité  $\alpha 1$  de DHPR (Tanabe, Beam et al. 1990). En effet, l'arrivée d'un potentiel d'action entraîne la dépolarisation membranaire qui, une fois au niveau du T-tubule va permettre l'activation du canal DHPR via un changement de conformation. La sous-unité  $\alpha 1$  de DHPR peut alors activer physiquement RyR1 pour permettre la libération des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme. Cette libération massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme va permettre l'initiation de la contraction musculaire (couplage excitation-contraction). Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue également un rôle de second messager dans l'activation de différentes voies cellulaires dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  telles que la voie du NFAT ou du NF- $\kappa$ B.

### Les canaux calciques de type T

Ils sont présents dans les cellules du muscle squelettique à des stades précoces du développement. Ces canaux sont de type LVA (pour low voltage activated) et ne présentent pas de ligands spécifiques contrairement aux canaux de type HVA. Ils sont activés et désactivés de façon rapide. Il a été suggéré que ces canaux sont très importants au cours de la myogenèse. En effet, le courant calcique qu'ils génèrent constitue la plus grande fraction de courant calcique dans les cellules musculaires non matures (Garcia and Beam 1994).

### Les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR)

Ce sont des canaux cationiques ligand-dépendant et capables de lier l'ACh (nAChR). Ils sont majoritairement perméables aux ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et potassium ( $\text{K}^+$ ), mais peuvent également laisser passer des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Dix-sept sous-unités des récepteurs nicotiques ont été clonées chez les vertébrés, dont 5 sous-unités exprimées dans les cellules musculaires ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) (Fucile 2004). Ces récepteurs permettent la transmission du signal au niveau de la NMJ.

### L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

Cette pompe a pour rôle d'extruder le  $\text{Ca}^{2+}$  du sarcoplasme vers le milieu extracellulaire en conditions normales, mais elle est également capable de faire rentrer du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la fibre musculaire (Lytton 2007). La stœchiométrie est de 3  $\text{Na}^+$  / 1  $\text{Ca}^{2+}$  (Donoso and Hidalgo 1989). Chez les mammifères, il existe 3 isoformes d'échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) de 1 à 3, et NCX3 est l'isoforme exprimée dans le muscle squelettique (Lytton 2007). Les NCX peuvent également faire des échanges de type  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$  (Reeves and Sutko 1983).

Les NCX ont une activité réversible et indépendante de l'ATP. En effet, le transport des ions se fait en fonction de leur gradient électrochimique. Suite à la dépolarisation de la membrane plasmique, la concentration en  $\text{Na}^+$  augmente, entraînant une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Lorsque la



concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme est élevée, NCX fonctionne à nouveau normalement et permet la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire.

#### Les canaux TRPs (transient receptor potential)

Ces canaux présentent une réponse transitoire, d'où leur nom de TRP, et ont été mis en évidence dans les cellules photoréceptrices de la drosophile (Cosens and Manning 1969). Il existe 7 sous-familles de canaux TRPs, qui sont majoritairement perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce sont : les TRPAs (ankyrin), les TRPCs (canoniques), les TRPMs (mélastatine), les TRPMLs (mucolipine), les TRPNs (non mécano-sensibles), les TRPPs (polycystine) et les TRPVs (vanilloïdes). Les canaux TRPs possèdent une grande diversité de mécanismes d'activation et de sélectivité pour les ions. Ils jouent un rôle critique dans la réponse aux stimuli extérieurs tels que la lumière, le son, la température et le toucher, mais également dans la réponse à des stimuli cellulaires. Un type de canal TRP peut être activé par différents stimuli mais les mécanismes d'activation des TRPs ne peuvent pas être prédits du fait de leur appartenance à une sous-famille (Venkatachalam and Montell 2007). Les TRPs peuvent être activés en réponse à la liaison d'un ligand sur son récepteur (on parle de ROC pour receptor-operated channels (Bolton 1979)), en réponse à la vidange des stocks calciques intracellulaires (SOC pour store-operated channels (Putney 1986)) ou suite à un étirement de la membrane plasmique (on parle de SACs pour stretch-activated channels (Guharay and Sachs 1984)).

#### Les canaux CRAC ( $\text{Ca}^{2+}$ release-activated $\text{Ca}^{2+}$ channels)

Ce sont des canaux activés suite à la vidange des stocks calciques, selon un mécanisme connu sous le nom de store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry ou encore entrée capacitative du  $\text{Ca}^{2+}$  (SOCE). Ils se distinguent des autres canaux calciques par leur haute sélectivité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , leur faible perméabilité aux gros cations monovalents, leur faible conductance unitaire et par le fait qu'ils laissent passer un courant rectifiant vers l'intérieur (inwardly rectifying current-voltage) (Lewis and Cahalan 1989, Prakriya 2013). De plus les canaux CRAC sont inactivés rapidement par un

mécanisme d'inhibition rétrocontrôle suite à une augmentation de  $Ca^{2+}$  au niveau local (CDI :  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation). Les canaux TRP ont été proposés comme sous-unités constitutives des canaux (Mori, Wakamori et al. 2002, Philipp, Strauss et al. 2003, Prakriya and Lewis 2003), mais le courant qu'ils génèrent présente des propriétés biophysiques très différentes de celui des canaux CRAC. Une approche par analyse de liaison génétique dans une famille d'immunodéficiences combinées sévères (SCID) couplée à un criblage d'ARN d'interférence chez la drosophile a permis l'identification d'ORAI comme l'une des sous-unités du canal CRAC (Feske, Gwack et al. 2006, Prakriya, Feske et al. 2006). Trois homologues d'ORAI de drosophile ont été retrouvés chez l'Homme, et nommés ORAI1, ORAI2 et ORAI3 en référence aux 3 gardiens de la porte du paradis dans la mythologie grecque : Eunomia (Harmonie), Dyke (Justice) et Eireine (Paix) (Feske, Gwack et al. 2006). Ces 3 isoformes diffèrent par leurs séquences C-terminales, sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et capables d'induire un courant calcique  $I_{CRAC}$  lorsque surexprimés dans des cellules HEK 293T en présence de STIM1. Les 3 isoformes d'ORAI codent des protéines localisées à la membrane plasmique.

ORAI1 (TMEM142A ou CRACM) est une protéine ubiquitaire à 4 domaines transmembranaires possédant une partie N-terminale et une partie C-terminale cytosoliques (Feske, Gwack et al. 2006, Prakriya, Feske et al. 2006) (figure 5). Les domaines N- et C-terminaux d'ORAI1 sont impliqués dans l'interaction avec STIM1, et de plus le domaine N-terminal est également impliqué dans l'interaction avec PIP2 au niveau de la membrane plasmique (Calloway, Owens et al. 2011) et dans l'interaction avec la cavéoline (Yu, Sun et al. 2010). Plusieurs évidences ont permis l'identification d'ORAI1 comme la sous-unité essentielle qui forme le pore du canal calcique CRAC : 1) l'expression d'ORAI1 dans les lymphocytes T de patients T déficients en  $Ca^{2+}$  permet de retrouver un courant calcique présentant les propriétés du  $I_{CRAC}$  (Feske, Gwack et al. 2006), 2) la surexpression d'ORAI1 avec STIM1 dans

des cellules HEK 293T produit de larges courants calciques (Mercer, Dehaven et al. 2006), 3) la mutation d'un résidu acide très conservé E106 dans ORAI1 en aspartate ou en glutamine réduit considérablement la sélectivité du canal CRAC et altère ses propriétés (Prakriya, Feske et al. 2006, Vig, Beck et al. 2006, Yeromin, Zhang et al. 2006).

Plusieurs modifications post-traductionnelles ont été révélées pour ORAI1, dont la glycosylation de l'asparagine en position 223 (N223) et la phosphorylation des sérines 27 et 30. Tandis que Gwack *et al* (Gwack, Feske et al. 2007) n'avaient déterminé aucun rôle de la glycosylation du N223 sur la fonction du canal dans les cellules HEK 293T, Dorr *et al* (Dorr, Kilch et al. 2016) ont récemment montré qu'une modification du site de glycosylation unique d'ORAI1 entraîne une augmentation du SOCE dans les cellules Jurkat T. ORAI1 est également régulé par des phosphorylations des sérines 27 et 30 par la protéine kinase C (PKC) qui ont un effet inhibiteur de la fonction du canal CRAC (Kawasaki, Ueyama et al. 2010).

Il existe 2 isoformes d'ORAI1 : ORAI1 $\alpha$  et ORAI1 $\beta$ . OrAI1 $\beta$  provient d'une initiation alternative de la traduction de la protéine au niveau des méthionines 64 et 71, mais majoritairement en position 64. Bien que ne possédant pas la partie N-terminale d'ORAI1 $\alpha$ , ORAI1 $\beta$  est capable d'activer le SOCE de manière similaire et localise également à la membrane plasmique. La seule différence mise en évidence à ce jour entre les 2 protéines dans des cellules humaines réside dans la mobilité plus rapide de l'isoforme ORAI1 $\beta$  à la membrane plasmique (Fukushima, Tomita et al. 2012).

Le nombre de sous-unités d'ORAI1 nécessaires pour la formation des canaux CRAC au repos ou à l'état actif est très controversé. Plusieurs études ont longtemps montré que des tétramères d'ORAI1 formeraient le canal actif (Yamashita, Somasundaram et al. 2011, Thompson and Shuttleworth 2013). Des études récentes ont montré qu'au repos, le canal ORAI1 non activé se retrouve à 90% sous forme de dimères (Li, Miao et al. 2016) et forme des oligomères allant

jusqu'aux hexamères suite à la vidange des stocks calciques. Néanmoins, les hexamères d'ORAI1 constituent la forme active du canal (Cai, Zhou et al. 2016).

ORAI2 et ORAI3 sont 2 homologues d'ORAI1 retrouvés chez l'homme (Feske, Gwack et al. 2006) et la souris (Takahashi, Murakami et al. 2007). Ces 2 protéines possèdent une structure similaire à celle d'ORAI1, avec 4 domaines transmembranaires, une partie N-terminale et une partie C-terminale cytosoliques (figure 5). ORAI2 et ORAI3 sont exprimés dans de nombreux types et tissus cellulaires, et l'expression d'ORAI3 est similaire à celle d'ORAI1 (Darbellay, Arnaudeau et al. 2009). Les séquences d'acides aminés des 3 homologues sont très conservées en ce qui concerne le filtre du canal (acide aminé E106), ainsi que les domaines transmembranaires. ORAI2 et ORAI3 possèdent les mêmes propriétés biophysiques qu'ORAI1, mais induisent une entrée de  $Ca^{2+}$  plus faible qu'ORAI1 (Mercer, Dehaven et al. 2006, DeHaven, Smyth et al. 2007, Takahashi, Murakami et al. 2007). Cependant, plusieurs études ont montré que tandis que l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre ORAI1 ou ORAI3 entraînent une diminution considérable du SOCE, le silencing d'ORAI2 n'a pas d'effet sur l'entrée de  $Ca^{2+}$  (Takahashi, Murakami et al. 2007, Darbellay, Arnaudeau et al. 2009). ORAI3 semble être impliqué dans l'activation du SOCE dans certaines lignées de cellules cancéreuses et non cancéreuses du sein (Motiani, Abdullaev et al. 2010) mais également dans l'activation de l'entrée du  $Ca^{2+}$  indépendante de la vidange des stocks calciques. En effet, ORAI3 est capable de former des canaux régulés par l'acide arachidonique (ARC) - en se complexant avec ORAI1- dont l'activation se fait indépendamment de la concentration de  $Ca^{2+}$  dans le RE/RS (Mignen, Thompson et al. 2001).

### 1.3.2. *Le réticulum sarcoplasmique*

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est un réseau membranaire fenêtré qui entoure chaque myofibrille et forme des compartiments fermés à l'intérieur des cellules musculaires. Il sert de lieu de stockage pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et contrôle finement leur libération et leur absorption par le biais de nombreuses protéines. Le RS est un réseau composé de 2 domaines distinctifs : les tubules formant le RS longitudinal et les citernes terminales formant le RS jonctionnel (Costello, Chadwick et al. 1986). Le RS longitudinal est localisé au niveau de la bande A alors que les citernes terminales formant le RS jonctionnel sont localisées de part et d'autre du RS longitudinal, à proximité des tubules T. Le RS longitudinal est le site majeur d'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  du fait de la présence de la pompe SERCA (sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase).

De nombreuses protéines interviennent dans la régulation de l'homéostasie calcique au niveau du RS. On peut les classer en plusieurs groupes : les protéines luminales liant le  $\text{Ca}^{2+}$  ou protéines de stockage (calséquestrine, junctate, sarcalumenine et la protéine riche en histidine liant le  $\text{Ca}^{2+}$  (histidine-rich  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein), les canaux de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  (récepteur à la ryanodine de type 1 (RyR1) et les récepteurs à l'inositol-3-phosphate (IP3R)), les senseurs de  $\text{Ca}^{2+}$  STIM et la pompe SERCA servant à l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 1.3.2.1. *Les protéines de stockage du $\text{Ca}^{2+}$*

**Calséquestrine** (CASQ) est la protéine la plus abondante dans l'espace luminal du RS et représente 27% des protéines de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  (Costello, Chadwick et al. 1986). CASQ est nommée du fait de sa faible affinité et de sa grande capacité à lier le  $\text{Ca}^{2+}$  (MacLennan and Wong 1971), ce qui lui permet de le séquestrer dans le RS. Sous sa forme libre, CASQ est un polymère composé d'un tiers de résidus acides, localisés en C-terminal, et qui sont importants dans la liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ . CASQ joue un rôle important dans le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du RS en formant une surface ou une poche qui lie le  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang, Trumble et al. 1998). Les polymères de CASQ ne sont pas liés à la membrane plasmique mais plutôt ancrés au RS jonctionnel par

des interactions avec triadine, junctine et RyR, pour permettre la libération rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  (Fliegel, Ohnishi et al. 1987, Zhang, Kelley et al. 1997, Boncompagni, Thomas et al. 2012). Les polymères de CASQ peuvent être observés par ME au niveau des citernes terminales (Franzini-Armstrong, Kenney et al. 1987). Il existe 2 isoformes de CASQ: CASQ1 exprimé dans les fibres musculaires à contraction lente et rapide, et CASQ2 uniquement exprimé dans les fibres à contraction lente et le tissu cardiaque.

**Triadine** est une protéine transmembranaire du RS qui joue un rôle dans le couplage excitation-contraction en participant à la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à son interaction avec RyR. Elle est localisée au niveau des triades, d'où son nom de triadine (Brandl, Green et al. 1986, Kim, Caswell et al. 1990) et interagit avec junctine (Zhang, Kelley et al. 1997), RyR (Liu and Pessah 1994) et CASQ (Kobayashi, Alseikhan et al. 2000). Quatre isoformes de triadine ont été identifiés, dont Trisk 95 et Trisk 51 qui constituent les isoformes majeures exprimées dans le muscle squelettique (Marty, Thevenon et al. 2000, Vassilopoulos, Thevenon et al. 2005). Dans le muscle squelettique, l'interaction de Trisk 95/51 avec d'autres protéines dépend du  $\text{Ca}^{2+}$ , et les expériences *in vitro* suggèrent une forte interaction en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lee, Kang et al. 2001).

**Junctine** est une protéine transmembranaire du RS qui interagit également avec RyR et CASQ (Jones, Zhang et al. 1995, Zhang, Kelley et al. 1997, Li, Mirza et al. 2015). Avec la triadine, la junctine est impliquée dans l'ancrage de CASQ au niveau des triades (Boncompagni, Thomas et al. 2012). La structure de la junctine et de la triadine sont très similaires, avec une courte queue terminale, un domaine transmembranaire et une longue queue luminale contenue dans le RS. Cette similarité de structure suggère une redondance de fonction entre les 2 protéines, mais des études plus récentes soulignent un rôle spécifique de la junctine. Par exemple, Wei *et al* (Wei, Gallant et al. 2009) ont montré que le complexe junctine-RyR1 est inhibé par ajout de

CASQ, alors que cette addition de CASQ n'a pas d'effet sur le complexe formé par la triadine et RyR1.

**Junctate**, junctine et la  $\beta$ -hydroxylase aspartate sont 3 protéines issues d'un épissage alternatif du même gène (Treves, Feriotto et al. 2000). La junctate est une protéine transmembranaire du RS qui possède une région N-terminale identique à celle de la junctine. Cette protéine est capable de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  en C-ter (Treves, Feriotto et al. 2000) et, contrairement à CASQ, ses sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  sont situés à proximité de la membrane du RS jonctionnel grâce à un domaine d'ancrage localisé en C-terminal de la protéine. Srikanth *et al* (Srikanth, Jew et al. 2012) ont montré l'implication de la junctate dans le recrutement des clusters de STIM1 au niveau des jonctions RE-MP de façon indépendante d'ORAI1 et de la queue polybasique de STIM1. De plus, junctate a été impliquée dans l'activation de la phagocytose en recrutant le RE à proximité des phagosomes (Guido, Demaurex et al. 2015).

La **protéine histidine-riche liant le  $\text{Ca}^{2+}$  (HRC, Histidine rich  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein)** est une protéine très peu abondante dans le RS comparé à CASQ et interviendrait de façon secondaire dans la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle contient un domaine central riche en histidine impliqué dans la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  et les interactions protéine-protéine (Hoffman *et al*, 1989). Cette protéine interagit avec triadine (Sacchetto, Turcato et al. 1999) et SERCA dans des cardiomyocytes (Arvanitis, Vafiadaki et al. 2007).

**Sarcaluménine** est également une protéine du RS impliquée dans la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ , mais contrairement aux autres protéines du RS décrites préalablement, sarcaluménine est localisée dans le RS longitudinal (Leberer, Timms et al. 1990). Elle colocalise avec SERCA, ce qui suggère une interaction entre les 2 et l'implication potentielle de sarcaluménine dans l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Toutes ces protéines ont une grande capacité de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  avec des affinités faibles à modérées pour ce cation. La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à ces protéines est régulée de diverses façons, ce qui complique la compréhension de leur implication individuelle dans le stockage et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 1.3.2.2. Les canaux d'extrusion du $\text{Ca}^{2+}$

Les canaux de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (ICRC, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels) sont une classe unique de canaux caractérisés par leur grande taille et leur symétrie, et permettant la libération et la disponibilité du  $\text{Ca}^{2+}$ . Deux classes d'ICRC ont été identifiées, comprenant chacune 3 isoformes il s'agit notamment des récepteurs à la ryanodine (RyR1-3) et des récepteurs à l'IP3 (IP3R1-3). RyR1 est localisé de façon majoritaire dans le muscle squelettique, RyR2 est l'isoforme cardiaque, et RyR3 est exprimé dans de nombreux tissus incluant le muscle squelettique (Fill and Copello 2002).

**Les récepteurs à la ryanodine de type 1 (RyR1)** sont des canaux calciques responsables de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'origine de l'activation du couplage excitation-contraction. RyR1 est localisé au niveau des triades (RS jonctionnel) où il interagit directement et physiquement avec DHPR localisé sur la membrane plasmique au niveau des tubules T (Block, Imagawa et al. 1988). RyR1 est une protéine de 565 kDa qui forme des homotétramères. Son domaine N-terminal permet l'ancrage de la protéine à la membrane du RS, tandis que la plus grande partie de RyR1 est localisée dans l'espace entre le RS et le tubule T où elle interagit avec DHPR et d'autres protéines (Fill and Copello 2002).

**Les récepteurs à l'IP3 (IP3R)** sont des canaux calciques activés par la liaison du ligand IP3. Ils jouent un rôle dans l'élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  à long terme et de ce fait, influencent l'activation des voies cellulaires dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  (Cardenas, Liberona et al. 2005). IP3R est faiblement exprimé dans le muscle squelettique et son activation est beaucoup plus lente que celle de RyR.



Il est généralement accepté que ce canal ne participe pas au couplage excitation-contraction (Kockskamper, Zima et al. 2008) et sa fonction est sujette à de nombreux débats. Blaauw *et al* (Blaauw, Del Piccolo et al. 2012) ont montré que la surexpression d'IP3R dans les myoblastes issus de muscle squelettique de souris adulte n'a pas d'effet sur le niveau global de  $Ca^{2+}$ . Toutefois, IP3R1 est nécessaire à la différenciation en myotubes et à l'expression des facteurs de transcription muscle-spécifiques Myogenin et MEF2, ce qui souligne son importance dans la différenciation du muscle squelettique (Antigny, Konig et al. 2014).

### 1.3.2.3. L'absorption du $Ca^{2+}$

#### SERCA

La pompe SERCA (Sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase) est la protéine majeure impliquée dans la clairance du  $Ca^{2+}$  contenu dans le cytoplasme. Elle permet également de remplir les stocks calciques nécessaires à la contraction. Pour cela, SERCA utilise de l'énergie produite à partir de l'hydrolyse d'ATP et transporte les ions à travers la membrane du RS. Deux ions  $Ca^{2+}$  sont pompés dans le RS à partir de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Inesi, Kurzmack et al. 1980). Il existe 3 isoformes majeures de la pompe SERCA avec une dizaine de « sous-isoformes »: SERCA1 est exprimé de façon prédominante dans les muscles à contraction rapide, tandis que SERCA2 est retrouvé dans le muscle cardiaque, les muscles à contraction lente, les muscles néonataux, les muscles lisses et certains tissus non-musculaires (Wuytack, Raeymaekers et al. 1992, Wu, Lee et al. 1995). SERCA3 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques notamment les plaquettes, les lymphocytes et les mastocytes (Wuytack, Raeymaekers et al. 1992, Wuytack, Papp et al. 1994), ainsi que dans les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes (Periasamy and Kalyanasundaram 2007). L'activité des pompes SERCA est régulée de façon tissu-spécifique et au cours du développement par 2 petites protéines exprimées de façon muscle-spécifique : phospholamban et sarcolipine.

SERCA1 est l'isoforme majoritaire dans le muscle squelettique et est localisé au niveau des membranes du RS longitudinal (Zhang, Fujii et al. 1995). SERCA contient 10 hélices transmembranaires (M1-M10), 3 domaines cytoplasmiques A (domaine d'ancrage), P (domaine de phosphorylation) et N (site de liaison de l'ATP) (MacLennan, Brandl et al. 1985).

#### 1.3.2.4. Les senseurs de $Ca^{2+}$ du RE/RS

##### STIM1 (Stromal interaction molecule)

###### Structure

C'est une protéine de 685 acides aminés (77 kDa) dont le gène a été cloné pour la première fois en 1996 et impliqué dans de nombreux types de tumeurs dont la tumeur de Wilms (Parker, Begley et al. 1996). Ce gène possède 12 exons, avec un exon alternatif 11b, conduisant à la formation d'un 2<sup>e</sup> isoforme de STIM1, nommé STIM1L (pour long) de 791 aa (Sabbioni, Veronese et al. 1999, Darbellay, Arnaudeau et al. 2011). Il existe un 3<sup>e</sup> isoforme de STIM1 possédant 540 aa qui reste encore mal caractérisé. Les séquences nucléotidiques et protéiques de STIM1 sont très conservées entre l'homme et la souris, avec environ plus de 90% d'homologie. STIM1 est exprimé dans de nombreux tissus à des niveaux variables, avec les niveaux d'expression les plus élevés dans le muscle squelettique et le poumon et dans de nombreux types cellulaires (Sabbioni, Barbanti-Brodano et al. 1997, Manji, Parker et al. 2000).

STIM1 est une protéine transmembranaire localisée majoritairement au niveau de la membrane du RE/RS avec une partie N-terminale luminale et une partie C-terminale cytosolique. Un pool de STIM1 est localisé à la membrane plasmique, avec le domaine N-terminal extracellulaire et le domaine C-terminal cytosolique. Dans sa partie N-terminale STIM1 contient un signal peptidique d'environ 22 aa, un domaine EF-hand avec un EF-hand canonique (cEF) capable de lier le  $Ca^{2+}$  et un EF-hand caché ou non canonique (hEF pour hidden ou nCEF) dont la liaison au  $Ca^{2+}$  reste à ce jour controversée (Parker, Begley et al. 1996, Williams, Senior et al. 2002, Stathopoulos, Li et al. 2006), et un domaine SAM (SAM : sterile  $\alpha$ -motif) contenant 2 sites de

glycosylation au niveau des sérines 131 et 171 et impliqué dans les interactions protéine-protéine (Williams, Senior et al. 2002). La partie N-terminale de STIM1 n'est pas nécessaire pour l'interaction STIM1-STIM1 (Williams, Senior et al. 2002) mais suffit à induire son oligomérisation (Stathopoulos, Li et al. 2006). Le domaine EF-hand de STIM1 lie le  $\text{Ca}^{2+}$  avec une faible affinité, ce qui est adapté aux concentrations calciques élevées dans le RE/RS. L'EF-hand de STIM1 est retrouvé sous forme de monomères en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et forme des dimères et des oligomères en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Stathopoulos, Li et al. 2006). Dans sa partie C-terminale, STIM1 contient 3 domaines coiled-coil nommés CC1, CC2 et CC3, avec une région impliquée dans l'interaction avec ORAI1 nommée OASF (ORAI1-activating small fragments), SOAR (STIM-ORAI activating region), ou encore CAD (CRAC activation domain) (Muik, Fahrner et al. 2009, Park, Hoover et al. 2009, Yuan, Zeng et al. 2009). Le SOAR est la séquence minimale nécessaire à l'activation d'ORAI1 du fait de la séquence polybasique KIKKKR, cruciale pour l'interaction avec ORAI1. STIM1 contient également en C-terminal une hélice inhibitrice au niveau du domaine CC1 qui inhibe la fonction du SOAR, un domaine inhibiteur (ID) qui intervient dans l'inactivation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  d'ORAI1 (CDI :  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent inactivation ; (Zweifach and Lewis 1995, Zweifach and Lewis 1995, Derler, Fahrner et al. 2009, Mullins, Park et al. 2009). La queue C-terminale contient une région riche en proline et sérine (PS), un domaine TRIP impliqué dans l'interaction avec les microtubules, et une région riche en lysine (K) qui intervient dans l'interaction avec les phospholipides de la membrane plasmique (figure 6) (Soboloff, Rothberg et al. 2012). STIM1 contient également un domaine ERM (ezrin, radixin, moesin) impliqué dans la liaison des protéines à l'actine et qui est nécessaire pour son activité et au recrutement des canaux TRPC (Huang, Zeng et al. 2006).

#### *Fonction*

STIM1 est le senseur calcique majeur du RE/RS et constitue avec ORAI1 l'unité élémentaire du (SOCE). En effet, l'utilisation d'ARN interférents (siRNA) dirigés contre STIM1 entraîne

une diminution quasi-complète (90%) du courant calcique  $I_{CRAC}$  et une diminution de la translocation du facteur de transcription NFAT régulé par la concentration de  $Ca^{2+}$  cytosolique. En revanche, la surexpression de STIM1 dans des cellules entraîne une augmentation modérée de l'amplitude du courant  $I_{CRAC}$  (17%), ce qui a permis de conclure que STIM1 n'est pas une composante du canal CRAC ni le canal lui-même, mais participerait à son activation (Liou, Kim et al. 2005, Roos, DiGregorio et al. 2005, Peinelt, Vig et al. 2006, Spassova, Soboloff et al. 2006). STIM1 est également impliqué dans l'entrée du  $Ca^{2+}$  via les canaux TRP notamment TRPC (Huang, Zeng et al. 2006, Lopez, Salido et al. 2006) ainsi que dans l'activation des canaux régulés par l'acide arachidonique (ARC). Cette dernière activation se fait indépendamment de la concentration de  $Ca^{2+}$  contenue dans le RE/RS (Mignen, Thompson et al. 2007). STIM1 est capable d'interagir avec STIM2 (Williams *et al*, 2001), ainsi qu'avec les 3 isoformes d'ORAI (Mercer, Dehaven et al. 2006).

Suite à la vidange calcique du RE/RS, STIM1 est phosphorylé par ERK1/2 au niveau des sérines 575, 608 et 621, ce qui entraîne sa dissociation de la protéine EB-1 (end binding protein 1) un régulateur de la croissance des microtubules. En effet, une conversion de ces 3 sérines en alanine pour mimer l'absence de phosphorylation empêche STIM1 de se dissocier d'EB1 et donc d'activer le SOCE même en cas de vidange des stocks. Inversement, lorsque ces 3 sérines sont mutées en acide glutamique pour mimer une phosphorylation constitutive, STIM1 se dissocie d'EB1 et active le SOCE (Pozo-Guisado, Casas-Rua et al. 2013, Pozo-Guisado and Martin-Romero 2013).

## STIM2

C'est une protéine à un domaine transmembranaire, homologue de STIM1 chez les vertébrés avec 53% d'identité de séquences codantes (Williams, Manji et al. 2001). STIM1 et STIM2 possèdent également une forte homologie structurale, avec des différences uniquement dans une région située en amont de l'EF-hand et dans la queue C-terminale (Stathopoulos, Zheng et

al. 2009). L'EF-hand de STIM2 possède une affinité au  $\text{Ca}^{2+}$  plus faible que celle de STIM1, ce qui rend cette protéine plus sensible aux variations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE. Néanmoins la région précédant l'EF-hand/SAM de STIM2 présente une stabilité accrue et une conformation « anarchique ». Ceci va permettre à STIM2 d'exister sous forme de monomère (contrairement à STIM1 qui est un dimère au repos), mais va surtout créer de grandes contraintes, qui vont limiter son dépliement et son oligomérisation suite à la vidange des stocks calciques (Stathopoulos and Ikura 2009, Zhou, Mancarella et al. 2009). A l'instar de STIM1, STIM2 est exprimé dans de nombreux tissus adultes tels que le pancréas, le foie, le rein, le muscle squelettique, le cerveau ou encore le poumon. La diminution de l'expression de STIM2 en utilisant des siRNA n'a pas d'effet sur le SOCE dans les HEK (Roos, DiGregorio et al. 2005) mais entraîne une diminution du SOCE dans les cellules HeLa (Liou, Kim et al. 2005). STIM2 est exclusivement localisé dans le RE/RS où il joue un rôle de senseur calcique et est capable d'activer les différents isoformes d'ORAI suite à une vidange des stocks calciques. STIM2 est également capable d'activer l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via ORAI1 de façon indépendante de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE (Parvez, Beck et al. 2008). Il est de plus impliqué dans la régulation du niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme et le RE (Brandman, Liou et al. 2007). Il a été rapporté plus récemment l'existence de 2 isoformes de STIM2 (STIM2.1 ou STIM2 $\beta$  et STIM2.2 ou STIM2 $\alpha$ ), provenant d'un épissage alternatif de l'exon 9 de *STIM2*, et exprimés dans de nombreux types cellulaires dont les cellules de la lignée hématopoïétique et les cellules C2C12 (Miederer, Alansary et al. 2015, Rana, Yen et al. 2015). STIM2 $\beta$  (STIM2.1) n'interagit pas directement avec ORAI1 du fait de l'insertion d'acides aminés supplémentaires au niveau du SOAR/CAD, mais est recruté au niveau des clusters par STIM1, où il régule négativement le SOCE. En effet, une diminution de l'expression de STIM2 $\beta$  entraîne une augmentation du SOCE dans les cellules tandis que sa surexpression conduit à une baisse du SOCE (Miederer, Alansary et al. 2015, Rana, Yen et al. 2015).

STIM1 et STIM2 interagissent de façon synergique au cours de la différenciation des myoblastes en myotubes, avec un clustering de STIM au cours des heures et des premiers jours suivant la différenciation, ainsi que pour le remplissage des stocks calciques dans les myotubes suite à des excitations répétées (Darbellay, Arnaudeau et al. 2009, Darbellay, Arnaudeau et al. 2010).

## 2. L'entrée capacitative du $\text{Ca}^{2+}$ (Store-operated $\text{Ca}^{2+}$ entry, SOCE)

L'entrée capacitative du  $\text{Ca}^{2+}$  ou entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  opérée par les stocks (SOCE) est une voie de signalisation calcique très conservée entre les espèces par laquelle la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans le RE/RS vers le cytoplasme ou le milieu extracellulaire va provoquer l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules (figure 7). Dans le muscle squelettique, la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RS se fait via RyR1, conduisant à la contraction musculaire mais également à l'activation de voies de signalisation dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  telles que la voie calcineurine/NFAT. Toute diminution importante de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS conduit à l'activation des senseurs calciques STIM1 et STIM2 localisés à la membrane du RS. L'activation de STIM conduit au recrutement et à l'activation de différents types de canaux calciques localisés au niveau de la membrane plasmique ou du sarcolemme pour permettre le remplissage des « entrepôts » calciques. Malgré l'affinité plus faible de son EF-hand pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , les contraintes structurales dans STIM2 ralentissent son dépliement et son clustering suite à la déplétion des stocks calciques. De ce fait, STIM1 représente le senseur majeur du RE/RS, et STIM2 constituerait le modulateur de l'activité de STIM1 par interaction directe. STIM1 est capable de lier les canaux ARC, qui sont des hétéromères d'ORAI1 et d'ORAI3 (Mignen, Thompson et al. 2008), pour permettre l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  de façon indépendante des stocks calciques. En effet, cette activation est médiée par le pool de STIM1 localisé au niveau de la membrane plasmique (Shuttleworth and Thompson 1998, Mignen, Thompson et al. 2001, Mignen, Thompson et al. 2008). Le courant généré ( $I_{\text{ARC}}$ ) présente des propriétés similaires à celles du courant  $I_{\text{CRAC}}$ , mais est de plus faible amplitude. STIM1 est également capable d'activer les canaux TRPC (TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPC7) en réponse à la vidange calcique des stocks. Le courant généré dans ce cas, nommé  $I_{\text{SOC}}$  est un courant non sélectif pour les cations, avec une faible sélectivité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Finalement, STIM1 active massivement les canaux CRAC qui sont composés d'ORAI1

en réponse à la vidange calcique des stocks, conduisant à un courant calcique  $I_{CRAC}$  très sélectif et ayant des propriétés spécifiques (voir chapitre sur les canaux CRAC). Avec STIM1, ORAI1 constitue l'unité élémentaire du SOCE. En effet, la surexpression simultanée de STIM1 et d'ORAI1 génère une entrée massive de  $Ca^{2+}$  dans les cellules, avec un courant calcique présentant toutes les propriétés de l' $I_{CRAC}$  (Mercer, Dehaven et al. 2006, Peinelt, Vig et al. 2006, Prakriya, Feske et al. 2006). L'entrée de  $Ca^{2+}$  via les TRPC active le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B cells) (Ong, Jang et al. 2012) tandis que le SOCE opéré via les canaux CRAC (ORAI1) active le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Parekh 2011).

### 2.1.Mécanisme du SOCE médié par STIM1 et ORAI1

Dans des conditions de repos, c'est-à-dire lorsque les entrepôts calciques sont pleins, STIM1 est sous forme de dimère (Stathopulos, Li et al. 2006, Stathopulos, Zheng et al. 2008) et lie le  $Ca^{2+}$  au niveau de la poche formée par l'EF-hand et le SAM, qui adopte une conformation fermée. Suite à la libération du  $Ca^{2+}$  du RE/RS, la dissociation du  $Ca^{2+}$  de l'EF-hand/SAM de STIM1 entraîne un changement de conformation de cette région et l'exposition de résidus hydrophobes, permettant ainsi l'interaction des régions N-terminales de la protéine. Le dépliement et l'interaction des domaines luminaux de STIM1 via l'EF-hand et le SAM promeut le dépliement de la partie cytosolique de STIM1 en déstabilisant l'interaction entre le SOAR/CAD et le domaine coiled-coil 1 (CC1). Ce dépliement permet : 1) l'interaction de STIM1 avec les phospholipides à la membrane plasmique grâce à la queue polybasique riche en lysine pour permettre sa migration au niveau des jonctions RE-MP, 2) à STIM1 de franchir l'espace entre la membrane du RE et la membrane plasmique, 3) l'exposition du SOAR/CAD afin de permettre une interaction directe STIM1-ORAI1. Le domaine SOAR/CAD de STIM1



est également impliqué dans des interactions intramoléculaires permettant le repliement de la protéine au repos (Korzeniowski, Manjarres et al. 2010).

Les jonctions RE-MP sont des régions où la membrane du RE/RS et la membrane plasmique sont séparées de 10-25 nm et seraient un équivalent des triades/dyades, à la différence que ces jonctions sont labiles et les protéines n'y résident pas (Luik, Wu et al. 2006, Wu, Buchanan et al. 2006). La formation des oligomères (clusters) de STIM1 est une étape indispensable à l'activation du canal CRAC. En effet, au niveau des jonctions RE-MP, les oligomères de STIM1 vont recruter ORAI1 et l'activer (Wu, Buchanan et al. 2006, Xu, Lu et al. 2006). Jousset *et al* (Jousset, Frieden et al. 2007) ont montré que la protéine SERCA serait également localisée au niveau des jonctions RE-MP pour permettre une réabsorption directe du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE/RS.

Le SOCE participe à la régulation de l'homéostasie calcique et est de ce fait un mécanisme très important pour les cellules et très régulé. Plusieurs régulateurs du SOCE ont été rapportés, mais seuls les plus pertinents seront décrits par la suite. Cependant, la liste n'est pas exhaustive, du fait que les protéines majeures du SOCE n'ont été découvertes que récemment (2005 et 2006), et que certains mécanismes restent encore incompris et tous les acteurs et les intervenants du SOCE n'ont pas encore été identifiés.

### *2.1.1. Les activateurs du SOCE*

#### *2.1.1.1. Les activateurs intrinsèques*

On y retrouve STIM1 lui-même. En effet, plusieurs études ont rapporté que la surexpression de STIM1 conduit à une augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules transfectées (Liou, Kim et al. 2005, Roos, DiGregorio et al. 2005, Mercer, Dehaven et al. 2006). Par ailleurs, Phuong *et al* (Phuong, Yun et al. 2013) ont rapporté l'existence d'un rétrocontrôle positif entre l'expression de STIM1 et l'activation de la voie NFAT dépendante du SOCE dans les cellules C2C12. Le clustering de STIM1 entraîne l'activation du SOCE, et l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$

cytosolique qui en découle contribuerait à activer la translocation du facteur de transcription NFAT qui à son tour activerait la transcription de STIM1, conduisant à sa surexpression.

#### 2.1.1.2. Les activateurs extrinsèques

**Junctate** interagit avec STIM1 et facilite son recrutement au niveau des jonctions RE-MP sans interagir avec ORAI1 (Srikanth, Jew et al. 2012).

**CRACR2A** (EFCAB4B) est un senseur calcique du cytoplasme qui module l'interaction entre STIM1 et ORAI1, régulant ainsi l'activité du canal et le SOCE. CRACR2A permet la translocation et le co-clustering de STIM1 et ORAI1 en formant un complexe ternaire avec les 2 protéines. Cette protéine interagit avec ORAI1 dans sa région C-terminale et lie STIM1 dans sa région cytosolique, grâce au CC et à la région riche en proline/lysine. L'implication de CRACR2A dans la régulation du SOCE a été montrée par différentes expériences : 1) l'extinction de l'expression de CRACR2A par des petits ARN interférents (siRNA, small interfering RNA) entraîne une diminution du SOCE induit par la thapsigargine, une drogue qui inhibe la pompe SERCA1 et permet de mimer la vidange calcique du RE/RS, 2) la surexpression simultanée de STIM1, CRACR2A et ORAI1 entraîne une augmentation significative du SOCE dans les cellules HeLa et Jurkat T. Néanmoins, CRACR2A ne remplace pas STIM1. Son expression simultanée avec ORAI1 seulement n'entraîne pas une entrée de  $Ca^{2+}$  dans les cellules. Il a de plus été montré que lorsque les stocks calciques sont pleins, CRACR2A se dissocie de STIM1 et d'ORAI1 (Srikanth, Jung et al. 2010). Il existe un homologue de CRACR2A nommé CRACR2B (EFCAB4A) qui a une fonction redondante dans la régulation du SOCE.

**STIMATE** (STIM activating enhancer ou TMEM110) est une protéine du RE exprimée dans de nombreux tissus humains (Jing, He et al. 2015) et initialement identifiée comme régulateur du facteur de transcription NFAT (Sharma, Quintana et al. 2013). STIMATE interagit avec le

domaine CC1 de STIM1, facilitant ainsi la dissociation d'avec le SOAR/CAD et permettant l'activation et la translocation de STIM1 au niveau des jonctions RE-MP. Ceci entraîne la formation des clusters avec ORAI1 et donc l'activation du SOCE (Jing, He et al. 2015). L'utilisation de siRNA spécifiques de STIMATE entraîne une diminution du SOCE dans les cellules.

Les **septines** sont des protéines appartenant à la famille des protéines liant le GTP et localisées à la membrane plasmique des cellules. Elles ont été identifiées comme activateurs du SOCE au cours d'un criblage utilisant des siRNA pour identifier les activateurs du NFAT. La vidange des stocks calciques entraîne une redistribution des septines au niveau de la membrane plasmique, favorisant une co-localisation rapide avec STIM1 et ORAI1. La diminution de l'expression des septines entraîne une diminution de la formation des co-clusters de STIM1 et d'ORAI1 au niveau des jonctions RE-MP, ce qui suggère que cette protéine est nécessaire au recrutement de STIM1 à ces jonctions et donc à l'activation du SOCE (Sharma, Quintana et al. 2013).

### *2.1.2. Les inhibiteurs du SOCE*

#### *2.1.2.1. Les inhibiteurs intrinsèques*

Le repliement du domaine EF-hand/SAM de STIM1 joue un rôle auto-inhibiteur, empêchant ainsi la protéine liée au  $\text{Ca}^{2+}$  de se déplier, d'interagir et d'activer le SOCE (Stathopoulos, Zheng et al. 2009). L'hélice inhibitrice contenue dans le domaine cytosolique de STIM1 permet également une régulation négative du SOCE. En effet, lorsque les stocks calciques sont pleins, le CC1 et le CAD interagissent, empêchant ainsi l'exposition du SOAR/CAD et l'activation d'ORAI1. Le domaine inhibiteur ID de STIM1 situé en aval des domaines CC permet l'inactivation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  d'ORAI1. En effet, cette inactivation des canaux CRAC intervient de façon dépendante de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , et une délétion du domaine ID de

STIM1 empêche l'inactivation rapide des canaux CRAC (Derler, Fahrner et al. 2009, Mullins, Park et al. 2009).

#### 2.1.2.2. Les inhibiteurs extrinsèques

**Calséquestrine (CASQ)** est une protéine du RE/RS qui forme des polymères capables de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  et de le séquestrer. Wang *et al* (Wang, Zhang et al. 2015) ont montré que les formes peu polymérisées de CASQ interagissent avec STIM1 dans les cellules HEK293T, empêchant ainsi son oligomérisation et donc l'activation du SOCE.

**SARAF** (SOCE-associated regulatory factor) est une protéine localisée dans le RE ou à la membrane plasmique décrite comme un régulateur du SOCE via son interaction avec STIM1 (Palty, Raveh et al. 2012). SARAF empêche l'activation spontanée de STIM1 en interagissant avec cette dernière au niveau du domaine ID, via sa partie C-terminale. Au repos, le domaine ID facilite l'accès de SARAF au SOAR, tandis qu'en conditions de faible concentration calcique dans les stocks, SARAF se dissocie du SOAR/CAD de STIM1, permettant ainsi son activation.

**ORMLD3** (mammalian ORM-(yeast) like protein isoform 3) est une protéine résidente du RE ayant un domaine N-terminal et un domaine C-terminal localisés dans le cytoplasme et impliquée dans la régulation de l'activité de la pompe SERCA et donc la signalisation calcique au niveau du RE/RS. Elle interagit avec STIM1 au repos et sa surexpression entraîne une diminution du courant calcique  $I_{\text{CRAC}}$  dans les cellules HEK 293 et Jurkat T (Carreras-Sureda, Cantero-Recasens et al. 2013).

D'autres protéines telles que les Golli (isoformes provenant de l'épissage alternatif de la protéine basique myéline (Feng, Hu et al. 2006, Fulton, Paez et al. 2010)), et POST (partner of stromal interaction molecule, (Krapivinsky, Krapivinsky et al. 2011)) ainsi que de nombreux

autres facteurs externes tels que la température (Xiao, Coste et al. 2011, Yarotsky and Dirksen 2012), le pH (Beck, Fleig et al. 2014) peuvent également réguler le SOCE.

## 2.2. Les mutations dans *STIM1* et *ORAI1* dans les pathologies humaines

Le  $Ca^{2+}$  étant un second messager impliqué dans une grande diversité de fonctions cellulaires, toute perturbation de l'homéostasie calcique entraîne des maladies de divers types. Ainsi, plusieurs mutations dans les gènes *STIM1* et *ORAI1* ont été décrites et sont associées à différentes maladies, selon qu'elles conduisent à une perte ou à un gain de fonction.

Les maladies associées à une perte de fonction (LoF, loss-of-function) de *STIM1* ou d'*ORAI1* décrites jusque-là sont dues à des mutations à transmission récessive qui conduisent pour la plupart à une absence totale de la protéine et par la suite à une abolition de la fonction du CRAC et donc du SOCE (Feske, Gwack et al. 2006, McCarl, Picard et al. 2009). Une mutation faux-sens dans *ORAI1* (p.R91W) a été décrite et conduit à une absence totale de SOCE malgré l'expression de la protéine. Cette mutation a un effet dominant négatif sur la fonction du canal normal. En effet, *ORAI1* R91W est incorporé dans la formation du canal fonctionnel chez les patients hétérozygotes, entraînant ainsi sa « fermeture » (Feske, Gwack et al. 2006). En ce qui concerne les pertes de fonction de *STIM1*, 3 mutations faux-sens ont été décrites : 1) *STIM1* p.P165Q localisée dans le domaine SAM de *STIM1* entraîne une diminution de l'expression de la protéine et une diminution du SOCE, cependant le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé (Schaballie, Rodriguez et al. 2015). Il se pourrait que cette mutation altère l'auto-inhibition formée par le repliement de l'EF-hand et du domaine SAM en N-terminal. 2) La mutation *STIM1* p.R426C localisée dans le SOAR/CAD, altère la localisation de *STIM1* et induit une absence totale de SOCE (Wang, Choi et al. 2014). 3) *STIM1* p.R429C, également localisée dans le domaine SOAR/CAD, conduit à une diminution modérée de l'expression de *STIM1*, mais à une absence totale de SOCE (Maus, Jairaman et al. 2015). Toutes ces mutations

perte de fonction d'ORAI1 ou STIM1 sont associées à un phénotype d'immunodéficience associant pour la plupart des patients auto-immunité, thrombocytopénie, hypotonie musculaire et défauts de l'émail dentaire.

Plusieurs mutations gain de fonction (GoF, gain-of-function) ont été décrites dans *STIM1* et *ORAI1*, conduisant à une activation constitutive de la protéine ou à une perméabilité plus importante des canaux CRAC. Ces mutations sont associées à un large spectre de symptômes qui affectent différents organes et différents types cellulaires. Le spectre clinique se décline en 3 principales maladies : la myopathie à agrégats tubulaires (TAM, tubular aggregate myopathy), le syndrome plaquettaire de York et le syndrome de Stormorken. Les phénotypes cliniques des 2 derniers syndromes sont très similaires et dominés par la myopathie et les défauts de plaquettes, mais de façon générale ces 3 maladies partagent le même spectre de symptômes cliniques.

### 3. La myopathie à agrégats tubulaires et le syndrome de Stormorken

#### 3.1. La myopathie à agrégats tubulaires

##### *3.1.1. Généralités et caractéristiques cliniques*

La myopathie à agrégats tubulaires (TAM) est une maladie musculaire rare qui se caractérise généralement par une faiblesse musculaire progressive, des myalgies, des crampes et une fatigue musculaire induite par l'exercice (Chevessier, Bauche-Godard et al. 2005). Les muscles majoritairement affectés chez les patients sont les muscles proximaux des membres inférieurs, suivis des muscles des membres supérieurs. Les patients TAM rapportent généralement des difficultés à monter les escaliers, à courir ou encore à passer d'une position assise à debout. Toutefois, la sévérité de la maladie ainsi que les symptômes cliniques sont très hétérogènes d'un individu à un autre. La majorité des patients TAM présente également un taux élevé de créatine kinase (CK ou CpK) d'environ 8 x la normale. Les patients TAM présentent des agrégats tubulaires dans les biopsies musculaires en tant que seule caractéristique histologique. La TAM n'a pas d'âge d'apparition précis, et peut se manifester au cours de l'enfance, à l'adolescence ou à l'âge adulte.

##### *3.1.2. Cause génétique et mécanismes physiopathologiques*

La majorité des mutations à l'origine de la TAM sont des mutations à transmission autosomale dominante dans *STIM1* ou dans *ORAI1* qui conduisent à un gain de fonction de la protéine, mais il existe des cas de transmission autosomale récessive sans diagnostic moléculaire (Pandit, Narayanappa et al. 2009). Quatre mutations d'*ORAI1* ont été rapportées chez des patients ayant un phénotype TAM à Stormorken-like : p.S97C (Garibaldi, Fattori et al. 2016), p.G98S et L138F (Endo, Noguchi et al. 2015), et p.P245L (Nesin, Wiley et al. 2014). D'autre part, une autre mutation dans *ORAI1* a été identifiée dans notre laboratoire conduisant à la protéine p.V107M (data non publiés). Aucune de ces mutations dans *ORAI1* n'altère sa structure ni son

expression, mais elles conduisent toutes à une activation constitutive des canaux CRAC et de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans des myotubes et des cellules HEK 293 (Endo, Noguchi et al. 2015).

De nombreuses mutations ont été identifiées dans *STIM1* chez des patients atteints de TAM. Ces mutations, en majorité dominante sont toutes localisées dans le domaine EF-hand de *STIM1* (aa 63-128) (H72Q, N80T, G81D, D84E/G, L96V, F108L/I, H109N/R, I115F) (figure 8). Toutes ces mutations conduisent à un clustering constitutif de *STIM1* indépendamment de la vidange des stocks calciques (Bohm, Chevessier et al. 2013, Hedberg, Niceta et al. 2014, Tasca, D'Amico et al. 2015, Noury, Bohm et al. 2016). De plus, les myoblastes de patients portant la mutation p.D84G présentent un niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  basal supérieur à celui observé dans les myoblastes contrôles et activent plus intensément le SOCE en réponse à une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (Bohm, Chevessier et al. 2013). De façon intéressante, la moitié des mutations TAM dominantes identifiées sont localisées dans l'EF-hand non canonique, et seules 2 mutations affectent un acide aminé clé intervenant directement dans la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (D84E/G). Ceci suggère que les mutations dans l'EF-hand altèrent le repliement de l'EF-hand et du domaine SAM de *STIM1*, empêchant ainsi son auto-inhibition. De plus, il existe une très grande variabilité entre les phénotypes des patients, même lorsque le même acide aminé est substitué par des acides aminés différents. Les mécanismes précis qui conduisent des mutations dans *STIM1* au clustering constitutif de la protéine, à la formation des agrégats tubulaires et à la TAM ne sont pas encore connus, et restent à identifier.

### 3.1.3. Les agrégats tubulaires

Les agrégats tubulaires sont des structures en forme de ruche d'abeille qui consistent en des empilements de tubes de simple ou de doubles membranes. Ils ont été décrits pour la première fois en 1964 par Engel *et al* (Engel 1964) chez 3 patients atteints de myotonie congénitale et de paralysie périodique hypokalémique. Les agrégats tubulaires ne sont pas spécifiques à la TAM, mais sont également retrouvés dans le muscle normal de souris âgées (Chevessier, Marty et al.



2004) ainsi que dans différentes conditions pathologiques telles que les myopathies induites par les médicaments ou par l'alcool (Chui, Neustein et al. 1975, del Villar Negro, Merino Angulo et al. 1982), dans des myopathies induites par les stéroïdes (Gilchrist, Ambler et al. 1991), les myasthénies, ou la paralysie périodique (Grumer 1966, Engel, Bishop et al. 1970). L'origine des agrégats tubulaires a été très longtemps controversée (Novotova, Zahradnik et al. 2002), mais il est maintenant accepté que ces structures dérivent du réticulum sarcoplasmique (Chevessier, Marty et al. 2004, Chevessier, Bauche-Godard et al. 2005). Les agrégats tubulaires sont capables de stocker le  $Ca^{2+}$  (Salviati, Pierobon-Bormioli et al. 1985) et sont retrouvés majoritairement dans les fibres musculaires de type II chez la souris, mais aussi bien dans les fibres de type I que II chez l'homme (Jacques, Holton et al. 2002, Chevessier, Marty et al. 2004, Chevessier, Bauche-Godard et al. 2005).

#### 3.1.3.1. Histologie

Les agrégats tubulaires sont des accumulations basophiles centrales ou subsarcolemmales à l'intérieur des fibres musculaires. Par microscopie électronique, on observe des empilements de tubules de doubles ou de simples membranes réparties en différentes catégories en fonction de leur diamètre et de leur contenu (figure 9) (Muller, Vielhaber et al. 2001). En histologie, les agrégats tubulaires sont marqués en rouge par la coloration de Gomori trichrome, positifs en coloration NADH-TR et à l'acide périodique de Schiff (PAS), et différentes protéines comme SERCA, CASQ1, RyR1, Sarcalumenine, Triadine, STIM1, ORAI1 et GRP78 ont été trouvées dans ces structures (Chevessier, Marty et al. 2004, Chevessier, Bauche-Godard et al. 2005) (figure 9). Les agrégats tubulaires sont négatifs pour les marquages suivants : SDH, spectrine, dystrophine, desmine, Oil red O, ATPase, émerine, COX2, et COX7.

### 3.1.3.2. Modèles murins présentant des agrégats tubulaires dans le muscle squelettique

De nombreuses souches de souris obtenues par croisement consanguin et utilisées en laboratoire développent des agrégats tubulaires dans leurs muscles de façon naturelle au cours du temps, sans pour autant développer de myopathie à agrégats tubulaires (Agbulut, Destombes et al. 2000). L'apparition des agrégats tubulaires dans le muscle des souris sauvages est fonction du sexe (uniquement chez les mâles), de l'âge des souris, de leur souche mais également du muscle et du type de fibres qui le composent. Par exemple, chez les souris, les agrégats tubulaires ne se développent que dans les fibres de type II, et de petits agrégats sont observés dans le gastrocnémien de souris C57B6 à 5 mois alors que dans le tibialis antérieur (TA) les agrégats tubulaires sont observés à 14 mois (Agbulut, Destombes et al. 2000). De nombreux modèles de souris générés présentent des agrégats tubulaires dans leurs muscles, de façon variable en fonction du gène invalidé ou muté : souris à senescence accélérée SAMP8 (agrégats tubulaires à 6 mois chez 2 mâles /5 (Nishikawa, Takahashi et al. 2000)), souris déficientes en CK ((Steeghs, Oerlemans et al. 1998, Novotova, Zahradnik et al. 2002)), souris MRL<sup>+/+</sup> (agrégats tubulaires dans le muscle de souris entre 12 et 24 mois (Kuncl, Pestronk et al. 1989)), souris déficiente en GSK3 $\alpha$  (glycogène synthase kinase 3 $\alpha$ , agrégats tubulaires à 12 mois (Zhou, Srinivasan et al. 2013)), souris déficientes en cavéoline-2 (agrégats tubulaires à 3 mois (Schubert, Sotgia et al. 2007)). Ces dernières souris représentent le modèle murin le plus précoce présentant des agrégats tubulaires.

Pour l'étude de la myopathie à agrégats tubulaires, il n'existe pas de modèle murin qui récapitule les symptômes de la TAM ou du syndrome de Stormorken. Le modèle de souris *Stim1*<sup>Sax</sup> généré de façon aléatoire et portant la mutation de patient D84G n'est pas viable à l'état homozygote, suggérant que l'homozygotie des mutations dominantes dans l'EF-hand de STIM1 ne sont pas compatibles avec la vie (Grosse, Braun et al. 2007). Les souris hétérozygotes

sont viables et présentent des hémorragies dues à un turnover rapide des plaquettes, mais aucun phénotype musculaire n'a été rapporté jusque-là. Il existe une souris transgénique pour *STIM1* dans le muscle squelettique présentant un taux élevé de  $\text{Ca}^{2+}$  basal et de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique mesuré suite à la vidange des stocks calciques. Cette souris présente une nécrose des myofibres avec des mitochondries élargies, une infiltration des cellules inflammatoires, une augmentation de la fibrose interstitielle et une augmentation du taux de CK (Goonasekera, Davis et al. 2014). Bien que certains phénotypes musculaires soient similaires à ceux retrouvés chez les patients TAM, ce modèle ne reproduit pas la myopathie à agrégats tubulaires et est plutôt utilisé comme modèle de dystrophie.

De nombreuses études s'intéressent à la compréhension des mécanismes qui conduisent à la formation des agrégats tubulaires dans les cellules musculaires. Boncompagni *et al* ont suggéré (Boncompagni, Protasi et al. 2012) que les agrégats tubulaires sont le résultat d'une succession de modifications qui se produisent progressivement dans le muscle au cours du temps, à commencer par une accumulation de CASQ1 au niveau des bandes I, conduisant à un élargissement des citernes du RS. Cependant, cette première étape est quelque peu remise en question du fait de l'accumulation de CASQ1 observée dans le muscle de souris femelle qui ne développent pas les agrégats tubulaires. Néanmoins, il est généralement reconnu que les agrégats tubulaires se forment par petits groupes à différents endroits de la fibre musculaire, puis fusionnent pour former un seul ou deux gros agrégats (Boncompagni, Protasi et al. 2012).

## 3.2. Le syndrome de Stormorken

Le syndrome de Stormorken est une maladie génétique à transmission autosomale dominante décrite pour la première fois en 1985 (Stormorken, Sjaastad et al. 1985). Il se caractérise au niveau clinique par une thrombocytopénie, une diathèse hémorragique, la myopathie à agrégats tubulaires et par un myosis (diminution du diamètre de la pupille par contraction du muscle constricteur de l'iris). Les autres symptômes sont variables en fonction des patients et consistent en une asplénie (absence de rate), l'ichthyose, une altération de la fonction cognitive, une petite taille, et une hypocalcémie (Misceo, Holmgren et al. 2014, Morin, Bruechle et al. 2014, Nesin, Wiley et al. 2014).

### 3.2.1. Cause génétique et conséquences physiopathologiques

Trois groupes ont rapporté chez 21 patients issus de familles non apparentées la même mutation à l'état hétérozygote dans l'exon 7 de *STIM1* (Misceo, Holmgren et al. 2014, Morin, Bruechle et al. 2014, Nesin, Wiley et al. 2014). Cette mutation (c.910C>T) entraîne la substitution de l'arginine en position 304 par un tryptophane (p.R304W), et a également été identifiée chez 2 patients atteints du syndrome plaquettaire de York (Markello, Chen et al. 2015).

Les expériences réalisées *in vitro* ont mis en évidence une entrée constitutive de  $Ca^{2+}$  dans les lymphocytes de patients (Misceo, Holmgren et al. 2014, Nesin, Wiley et al. 2014). La surexpression de *STIM1* R304W dans des cellules conduit à la formation de clusters de *STIM1* indépendamment de la concentration en  $Ca^{2+}$  du RE/RS, et conduit à une activation maximale du courant calcique  $I_{CRAC}$  *in vitro* en présence d'ORAI1. Toutefois, les cellules de patients présentent une augmentation modérée du SOCE en réponse à un traitement à la thapsigargine. Ainsi, toutes ces expériences suggèrent une activation constitutive du SOCE chez les patients Stormorken.

Les mécanismes par lesquels la mutation *STIM1* R304W conduit à une activation constitutive du SOCE et au syndrome de Stormorken restent à élucider. La localisation de la mutation p.R304W dans le CC1 de *STIM1* gênerait le repliement de la partie C-terminale de *STIM1* nécessaire à son inactivation. Ceci pourrait être dû au fait que, bien que localisée en amont de l'hélice inhibitrice, cette mutation mettrait fin à l'interaction entre l'arginine en position 304, et les résidus E318 et Q314 de l'hélice inhibitrice avec lesquels elle interagit (Lacruz and Feske 2015).

Ainsi, les mécanismes conduisant à la formation des agrégats tubulaires ne sont toujours pas identifiés. La séquence d'évènements qui conduit des mutations dans *STIM1* à la formation d'agrégats tubulaires, à la TAM et au syndrome de Stormorken ainsi que l'étude des spécificités moléculaires de chacune des maladies restent à déterminer. De plus, il n'existe à l'heure actuelle aucun animal modèle mammifère pour l'étude de ces maladies ni aucun traitement pour soigner les patients atteints de la TAM ou des syndromes de Stormorken et plaquettaire de York.

Les objectifs de ma thèse ont été d'une part d'étudier la séquence d'évènements physiopathologiques qui conduisent des mutations dans *STIM1* à la TAM, et d'autre part de comparer l'impact des mutations TAM et Stormorken à différentes étapes du SOCE en utilisant des modèles cellulaires et animaux.

# Matériels et méthode

## Matériels

Les anticorps primaires utilisés sont : anti-STIM1 monoclonal (44/GOK; BD Biosciences), anti-STIM1 polyclonal (Sino Biological Inc), anti-ORAI1 polyclonal (ab78471; abcam), anti-NFATc1 polyclonal (H110; sc-13033; Santa Cruz), anti-NFATc1 monoclonal (clone7A6, Millipore), anti-CASQ1 monoclonal (VIIIID12, Thermo Fischer Scientific), anti-GAPDH monoclonal (MAB374, Millipore). Les anticorps secondaires conjugués à l'Alexa proviennent de chez Invitrogen. Les anticorps secondaires anti-IgG de lapin et de souris, conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) proviennent de Jackson ImmunoResearch Laboratories. La construction pCMV6-XL5 contenant l'ADNc STIM1 humain provient de chez Origene (untagged human cDNA clone, NM\_003156). Les produits suivants ont été utilisés : l'ADN polymérase Pfu ( Thermo Fisher Scientific), le kit de réaction LR Gateway (Thermo Fischer Scientific), le kit contenant le vecteur pGEM-T-easy (Promega), les kits d'extraction plasmidique (Macherey Nagel), le marqueur nucléaire Hoechst (B2883 ; Sigma-Aldrich), le marqueur nucléaire DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542 ; Sigma Aldrich), le kit de réaction chimiluminescente ECL (Pierce), le réactif Lipofectamine 2000 (Life Technologies), la thapsigargine (T-9033 ; Sigma-Aldrich), la caféine (C0750 ; Sigma-Aldrich). Les constructions suivantes sont des dons aimables : eGFP-NFATc2 (Dr Cristina Olivieri, Università degli Studi di Siena, Italie), NFATc1 (Dr Jelena Becanovic et Dr Meagan McGrath, Monash University, Australie), YFP-STIM1 et mCherry-STIM1 (Pr Nicolas Demaurex, Université de Genève, Suisse), YFP-STIM1L (Laurent Bernheim, Genève, Suisse), GFP-ORAI1 (Liangyi, Pékin, Chine).

## Méthodes

**Génomiphication d'ADN.** Elle se fait en utilisant le kit d'amplification d'ADN Illustra GenomiPhi V2 (GE Healthcare Life Sciences) selon le protocole suivant : 10 ng d'ADN de patients ont été repris dans un tampon puis incubés à 95°C pendant 3 minutes avant d'être refroidis à 4°C. Par la suite, un mix contenant du tampon de réaction et l'ADN polymérase sont ajoutés au mélange qui est ensuite incubé à 30°C pendant 1h30. A la fin de la réaction d'amplification, l'enzyme est inactivée par un passage à 65°C pendant 10 minutes.

**Génération des constructions pCMV contenant STIM1 muté D84G, F108L, H109R et R304W.** Les constructions mutées de STIM1 humain sans étiquette (tag) ont été générées par mutagenèse dirigée à partir de la construction pCMV6-XL5 contenant l'ADNc humain de STIM1 de chez Origene. La réaction de mutagenèse est la suivante : une étape de dénaturation pendant 5 minutes à 95°C, suivie de 14 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95°C, 1 minute d'hybridation des amorces à 55°C, puis 12 minutes d'amplification à 68°C, et enfin 10 minutes à 68°C. Les produits de PCR ont été traités à l'enzyme de restriction DpnI pendant 20 minutes à 80°C afin de se débarrasser des ADN qui ont servis de matrice. En effet, ces ADN matrices ont une capacité de transfection optimale par rapport aux ADN générés par mutagenèse, ce qui empêcherait d'obtenir les constructions souhaitées après transformation bactérienne. Les produits des PCR sont ensuite introduits dans des bactéries *E. coli* souche DH5 alpha par choc thermique. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu LB contenant de l'ampicilline, et l'ADN plasmidique a ensuite été extrait en utilisant un kit d'extraction plasmidique puis envoyé à séquencer à GATC afin de s'assurer de l'absence de mutations autres que celles introduites. Ces mutations ont été introduites de la même façon dans les constructions YFP-STIM1, mCherry-STIM1, ainsi que la mutation V107M introduite dans la construction GFP-ORAI1.



**Génération des constructions pAAV contenant STIM1 WT et muté (H72Q, N80T, D84G, L96V, F108L/I, H109N/R, I115F, P165L).** Une PCR utilisant le couple d'amorces STIM1\_BamHI et STIM1\_XhoI (voir séquences dans tableau d'amorces) a été réalisée à partir de l'ADNc humain STIM1 (Origene) et d'y introduire en 5' et 3' les séquences palindromiques pour les enzymes de restriction BamHI et XhoI. Le produit de PCR a été traité par les enzymes BamHI et XhoI, puis l'ADNc humain STIM1 a été introduit dans le vecteur pGEM-T-easy en utilisant la ligase T4. L'ADNc de STIM1 a ensuite été extrait du pGEM-T-easy par digestion avec les enzymes de restriction BamHI et XhoI pendant 1h à 37°C. Le vecteur pENTR1A a également été traité avec ces enzymes de restriction. Les produits de digestion sont ensuite migrés sur un gel d'agarose 2% puis extraits en utilisant le kit d'extraction d'ADN plasmidique (Macherey-Nagel). La ligation du vecteur et de l'insert a été réalisée sur la nuit à 4°C. Une fois l'ADNc de STIM1 dans le vecteur pENTR1A, des mutagenèses dirigées ont été réalisées afin d'introduire les différentes mutations TAM et Stormorken en utilisant les amorces correspondantes et dont les séquences sont listées dans le tableau. Les différents ADNc STIM1 mutés ont ensuite été introduits dans un pAAV-CMV-gateway par une réaction de recombinaison homologue (réaction LR).

**Culture cellulaire, différenciation et transfection.** La lignée de myoblastes humains 7156 portant la mutation D84G (patient âgé de 45 ans au moment de la biopsie) a été cultivée dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 1 g/l de glucose, supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal (SVF), 50 µg/ml de gentamycine, 1 µM de dexaméthasone et 1 ng/ml de facteur de croissance des fibroblastes basique (bFGF) humain. La lignée de myoblastes humains 1066441 portant la mutation L96V (patient âgé de 13 ans au moment de la biopsie), les myoblastes murins C2C12 et les myoblastes de rat L6 woody ont été cultivés dans du milieu DMEM contenant 1g/l de glucose, supplémenté avec 20% de SVF et 50 µg/ml de gentamycine. Les lignées de myoblastes humains contrôles LHCNM2 (myoblastes

immortalisés), KM49C19VE (individu mâle de 19 ans au moment de la biopsie), AB678C53Q (individu mâle de 53 ans au moment de la biopsie), et CHQ25 (individu femelle de 5 ans au moment de la biopsie) ont été cultivées dans du milieu DMEM à 4,5 g/l de glucose/M199 (4 :1) sans pyruvate de sodium et contenant en suppléments 20% de SVF, 50 µg/ml de gentamycine, 25 µg/ml de fétuines, 0,2 µg/ml de dexaméthasone, 5 µg/ml d'insuline humaine, 0,5 ng/ml de bFGF humain, et 5 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF) humain. Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM à 1g/l de glucose contenant 5% de SVF et 40 µg/ml de gentamycine. Les cellules HEK 293T ont été cultivées dans du milieu DMEM à 1 g/l de glucose supplémenté avec 10% de SVF et de pénicilline streptomycine. Tous les différents types cellulaires ont été cultivés à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Pour le passage, les cellules sont au préalable rincées au PBS 1X afin d'éliminer les traces de milieu, puis traitées avec de la trypsine diluée pendant 3 minutes. La trypsine est ensuite inactivée grâce au sérum contenu dans le milieu de culture, puis les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 1 200 rpm pour éliminer le milieu de culture contenant la trypsine. Les cellules sont ensuite reprises dans du milieu de culture frais et remises en culture à une confluence de 30%.

La différenciation des myoblastes humains et murins a été réalisée à une confluence cellulaire avoisinant 80-90%, dans du milieu DMEM 1g/l de glucose enrichi avec 2% de sérum de cheval (HS) et 40 µg/ml de gentamycine, durant 5 à 14 jours.

**Transfection de cellules.** Les transfections de cellules sont effectuées tel qu'il suit : lorsque les cellules sont à confluence optimale pour la transfection (50% de confluence pour les myoblastes C2C12 et 70% de confluence pour les cellules HeLa et les HEK 293T) elles sont rincées au PBS 1X pour éliminer les traces d'antibiotique contenu dans le milieu et qui empêcherait une transfection optimale. Les cellules sont ensuite placées dans du milieu Opti-MEM I dépourvu d'antibiotique. En parallèle, une solution A contenant 1,5 µg d'ADN et de l'Opti-MEM I qsp

100 µl par puits de plaque 6 puits (environ 10 cm<sup>2</sup> de surface) est préparée, ainsi qu'une solution B contenant 5 µl de lipofectamine 2000 et de l'opti-MEM I qsp 100 µl. Les solutions A et B sont ensuite mélangées l'une à l'autre en utilisant la pipette puis laissées à incuber pendant 15 minutes avant d'être mises au contact des cellules. Les cellules sont laissées dans le milieu de transfection pendant 4 à 6 heures avant d'être remises dans leur milieu de culture normal. Les expériences de co-transfection sont réalisées en utilisant un ratio de 1:1, et toutes les expériences ont été réalisées 24 heures post-transfection, hormis lorsque les cellules ont été différenciées.

**Localisation des protéines exogènes par immunofluorescence.** Les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 30 minutes. La PFA a par la suite été inactivée en réalisant un lavage de 15 minutes dans une solution de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) à 50mM, puis les cellules ont été rincées dans une solution saline tampon de phosphate (PBS) concentrée 1X. Les lamelles ont ensuite été montées en utilisant le Fluorsave (Calbiochem).

**Localisation de protéines endogènes par immunofluorescence.** Les cellules ont été fixées dans une solution de PFA à 4% pendant 30 minutes, puis la PFA inactivée par un lavage de 15 minutes dans une solution de 50mM de NH<sub>4</sub>Cl. S'en est suivi un rinçage dans une solution de PBS 1X, puis les membranes des cellules ont été perméabilisées pendant 10 minutes dans une solution de PBS contenant 0,2% de triton. Les cellules sont rincées dans du PBS 1X puis suit une étape de saturation dans une solution de PBS-triton à 0,1% contenant 10% de SVF. Après un rinçage dans une solution de PBS 1X, les cellules sont incubées sur la nuit à +4°C dans une solution de PBS-triton 0,1% contenant 3% de SVF et les anticorps primaires. Trois rinçages de 10 minutes chacun ont ensuite été réalisés dans du PBS-triton 0,1%, et les cellules ont été incubées pendant une heure dans une solution de PBS-triton 0,1% contenant 3% de SVF, le marqueur nucléaire DAPI/Hoechst et les anticorps secondaires couplés à un fluorophore Alexa.

Les cellules sont à nouveau lavées trois fois pendant 10 minutes dans une solution de PBS-triton 0,1% puis dans du PBS 1X. Les lamelles ont été montées en utilisant le réactif de montage Fluorsave. Les anticorps primaires sont utilisés en surexpression au 1 :1000 et en endogène au 1 :100.

**Etude de co-localisation.** L'étude de la co-localisation a été faite en utilisant le microscope confocal inversé TCS SP8 AOBS de Leica équipé d'un objectif 63x/1,4 à immersion à huile. Dans un premier temps, les acquisitions 3D de billes fluorescentes bleu/vert/orange/rouge lointain de 0,2 $\mu$ m de diamètre (TetraSpeck<sup>TM</sup> Microspheres) ont été réalisées afin de s'assurer de l'aptitude du système à réaliser cette étude (alignement des lasers, correction des aberrations chromatiques de l'objectif).

**Analyse de la translocation du NFAT.** Les cellules co-transfectées avec des constructions GFP-NFAT et mCherry-STIM1 ont été observées au microscope et classées en 2 catégories dépendant de la localisation nucléaire ou cytoplasmique du signal GFP. Un test statistique de Student à 2 variables a été utilisé pour l'analyse statistique, et pour une p-value < 0,05, la différence est considérée significative. Afin d'estimer la translocation nucléaire du NFAT, les images obtenues sur le système confocal SP5 droit (Leica) équipé d'un objectif 63x à immersion huile ont été traitées en utilisant une macro développée sur le logiciel Image J (Rasbnd, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) dans le laboratoire. Cette dernière permet de mesurer l'intensité du signal dans le cytoplasme de la cellule ainsi que dans le noyau, en soustrayant le bruit de fond et de calculer le ratio des intensités noyau/cytoplasme.

**Analyse de l'expression des protéines par western blot.** Afin d'extraire les protéines totales, les muscles ont été broyés en utilisant un broyeur homogénéiseur Ultra-Turrax (IKA-WERKE) dans une solution de RIPA contenant 50mM de Tris, 100mM de chlorure de sodium, 1mM d'EGTA, 0,5% de NP-40, 0,5% de triton 100X, 0,1% des SDS, et un cocktail d'inhibiteurs de

phosphatases et de protéases (PIC, Sigma-Aldrich, Roche), 1 mM de DTT et 1 mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle). Les culots cellulaires sont repris dans cette même solution. Les homogénats sont ensuite incubés à 4°C pendant 3 heures puis centrifugés pendant 4 minutes à 6 000 rpm afin d'éliminer les membranes. La concentration du surnageant protéique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre en utilisant une solution de Bradford (Protein Assay Dye reagent concentrate, Bio rad laboratoire GmbH). 20 µg de lysats ont été déposés par puits sur un gel de polyacrylamide 10% et la migration des protéines s'est effectuée pendant 1h20 à 120 V en présence d'un marqueur de poids moléculaire. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h20 à 200mA. La membrane est saturée avec une solution de TBS (Tris buffer saline) contenant 0,1% de tween (TBS-T) et 5% de lait pendant une heure. Les anticorps primaires sont incubés dans une solution de TBS-T 0,1% contenant 5% de lait sur la nuit à 4°C. Les dilutions d'anticorps primaires utilisées sont : anti-STIM1 (1 :100 en endogène ; 1 :1000 en surexpression), anti-ORAI1 (1 :100 en endogène ; 1 :1000 en surexpression), anti-CASQ1 (1 :100), anti-GAPDH (1 :20 000). S'en suivent 3 lavages de 10 minutes chacun avec une solution de TBS-T 0,1% puis la membrane est incubée pendant 1h30 avec une solution de TBS-T 0,1% contenant 5% de lait et les anticorps secondaires. Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps anti-lapin et anti-souris couplés à la HRP. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois avec une solution de TBS-T 0,1% puis incubés pendant 3 minutes avec un mélange équivalent des solutions du kit de chimiluminescence ECL. Les résultats de western blots sont obtenus par révélation sur des films ou par utilisation de l'appareil de révélation Amersham Imager 600 (GE Healthcare). L'intensité des bandes a été déterminée en utilisant le logiciel Image J (Rasbnd, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009). Les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs de la GAPDH.

**Microscopie à fluorescence par réflexion totale interne (TIRF).** Afin d'étudier la localisation des clusters de STIM1 à proximité de la membrane plasmique, des cellules C2C12

ont été transfectées avec de l'YFP-STIM1 sauvage ou muté. Le plan d'acquisition a été choisi en fonction du signal fluorescent de l'YFP détecté près de la membrane plasmique (PM) des cellules transfectées vivantes. Les images ont été acquises avant et après ajout de 2  $\mu\text{M}$  de thapsigargine dans le milieu en utilisant le microscope inversé Nikon TI-eclipse équipé d'un objectif 100x, d'ouverture numérique 1,49 à immersion à huile.

**Microscopie électronique couplée à l'imagerie photonique (CLEM).** Les cellules HeLa et C2C12 ont été cultivées sur des supports gravés d'aclar présentant une matrice permettant de géo-localiser les cellules d'intérêt. Les cellules ont ensuite été transfectées avec de l'YFP-STIM1 sauvage ou muté et observées par microscopie confocale 24 heures post-transfection en utilisant le système TCS SP2 UV de Leica. Les cellules transfectées ont été choisies puis traitées tel que décrit par Spiegelhalter *et al*, 2013. Des coupes sériées de 70nm ont été réalisées et observées par microscopie électronique grâce au système Philips CM12.

**Mesure de l'entrée du calcium cytosolique.** Afin de mesurer le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes dans une solution à 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  contenant 5  $\mu\text{M}$  de sonde calcique Indo-1 AM (Life Technologies) et 1  $\mu\text{M}$  d'acide pluronique F-127 (Life technologies). Les cellules sont ensuite laissées 30 minutes dans du milieu à 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant 30 minutes afin de permettre la dé-estérification. La fluorescence ratiométrique a été mesurée en utilisant le système confocal TCS SP2 UV de Leica avec un objectif 40x à immersion à huile. Toutes les expériences ont été conduites à 37°C avec des solutions préalablement chauffées. Le protocole d'acquisition est le suivant : 5 minutes d'acquisition dans un milieu sans  $\text{Ca}^{2+}$  et contenant le chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA, suivi d'une acquisition de 10 minutes dans un milieu contenant 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . La fréquence d'acquisition est d'une photo toutes les 5 secondes.

**Expérimentation animale.** Les protocoles d'expérimentation animale ont été approuvés par le comité éthique de l'institut Com'Eth IGBMC-ICS (2012-132). Les animaux ont été hébergés dans une animalerie conventionnelle ayant une température contrôlée (19-22°C) et sous un cycle lumière/obscurité de 12:12h. Les souris ont été sacrifiées selon les normes de la législation européenne en vigueur. Les muscles de souris ont été disséqués sous anesthésie et congelés dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide et de l'azote liquide pour les analyses histologiques et les expériences d'immunoblot respectivement.

**Production d'AAV.** Les AAV2/1 contenant l'ADNc sauvage ou muté de STIM1 ont été produits au laboratoire d'amplification de vecteurs (laboratoire de thérapie génique, CHU de Nantes, Inserm U1089) par tri-transfection de cellules HEK 293. Les particules physiques ont été quantifiées par PCR en temps réel et les titres de vecteurs sont exprimés en génome viral par ml (vg/ml).

**Transduction d'AAV dans le tibialis antérieur de souris sauvages.** Des souris sauvages de souche C57B6/J âgées de six semaines ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de 5 ml/g de kétamine (20mg/ml ; Virbac, Carros) et de Xylazine (0,4%, Rompun ; Bayer, Wuppertal). Les muscles tibialis antérieurs ont été injectés avec 20 µl de préparations d'AAV2/1 STIM1 sauvage ou muté ou d'AAV2/1 vide à une concentration de  $5-7 \cdot 10^{11}$  vg/ml.

**Microscopie électronique sur muscle squelettique.** Les muscles TA de souris ont été prélevés sous anesthésie, fixés par immersion dans un tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) contenant 2,5% de glutaraldéhyde et 2,5% de PFA puis à nouveau lavés dans du tampon cacodylate pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite post-fixés dans du tampon cacodylate contenant 1% de tetroxyde d'osmium pendant une heure à 4°C et marqués avec 2% d'acétate d'uranyle pendant une heure à 4°C. Les échantillons sont déshydratés en utilisant un gradient d'alcool (50, 70, 90 et 100%) et de l'oxyde de propylène pendant 30 minutes pour chaque étape

de gradient. Les échantillons sont ensuite incorporés dans de l'Epon 812. Des sections semi-fines de 2 µm et ultra-fines de 70 nm sont coupées et contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du nitrate de plomb. Les images ont été acquises manuellement en utilisant le microscope CM12 (Philips) de 100KV (FEI), équipé d'une caméra CDD ORIUS 1000 Gatan.

**Mesure de la force spécifique et absolue des muscles de souris.** Les mesures de force musculaire ont été faites en mesurant *in situ* la contraction musculaire en réponse à une stimulation du nerf sciatique et du muscle du TA, tel que décrit précédemment (Cowling, Toussaint et al. 2011). Les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de sodium pentobarbital (50 mg/kg). Le tendon distal du TA a été détaché, et attaché avec un lien à un transducteur isométrique (Harvard Bioscience, Holliston, MA). Le nerf sciatique a été stimulé, la réponse à une stimulation téτανique (fréquence d'impulsion de 50 à 143 Hz) a été mesurée, et la force maximale absolue a été déterminée. Après les mesures de contraction, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les TA ont été disséqués et pesés avant d'être congelés.

**Analyse histologique et immunofluorescence du muscle squelettique.** Des coupes longitudinales de muscles squelettiques du TA de souris ont été marquées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) ou par un marquage Gomori trichrome et les lames scannées au scanner de lames (NanoZoomer 2.0 HT Hamamatsu) équipé d'une lampe Lightningexciter LX2000 (modèle L11600-05). L'analyse qualitative des images a été faite en utilisant le logiciel NDPi (NanoZoomer digital pathology, Hamamatsu photonics). Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées telles que décrites précédemment pour les cellules.

**Analyse statistique.** Toutes les valeurs sont données avec pour erreur l'écart-type. Les différences entre deux groupes ont été étudiées en utilisant un test de Student à 2 variables.



L'analyse statistique a été réalisée sur Excel (Microsoft). Pour une p-value < 0,05, la différence est considérée significative.

**Table des couples d'amorces utilisés.**

Nom	séquence
STIM1_XhoI_Rev	CATCTACTCGAGAACTACTTCTTAAGAGG
STIM1_BamHI_Fw	CATCTAGGATCCAAATGGATGTATGCGTC
STIM1_D84G_Fw	GCCAATGGTGATGTGGGTGTGGAAGAAAGTGATG
STIM1_D84G_Rev	CATCACTTTCTTCCACACCCACATCACCATTGGC
STIM1_N80T_Fw	GATGGACGATGATGCCACTGGTGATGTGGATGTGG
STIM1_N80T_Rev	CCACATCCACATCACCAGTGGCATCATCGTCCATC
STIM1_H72Q_Fw	CAGTCCGTAACATCCAGAACTGATGGACGATG
STIM1_H72Q_Rev	CATCGTCCATCAGTTTCTGGATGTTACGGACTG
STIM1_L96V_Fw	GTTCTTGAGGGAAGACGTCAATTACCATGACCC
STIM1_L96V_Rev	GGGTCATGGTAATTGACGTCTTCCCTCAGGAAC
STIM1_F108L_Fw	GTGAAACACAGCACCTCCATGGTGAGGATAAG
STIM1_F108L_Rev	CTTATCCTCACCATGGAGGGTGCTGTGTTTCAC
STIM1_F108I_Fw	GTGAAACACAGCACCATCCATGGTGAGGATAAG
STIM1_F108I_Rev	CTTATCCTCACCATGGATGGTGCTGTGTTTCAC
STIM1_H109N_Fw	GAAACACAGCACCTTCAATGGTGAGGATAAGCTC
STIM1_H109N_Rev	GAGCTTATCCTCACCATTGAAGGTGCTGTGTTTC
STIM1_H109R_Fw	GAAACACAGCACCTTCCGTGGTGAGGATAAGCTC
STIM1_H109R_Rev	GAGCTTATCCTCACCACGGAAGGTGCTGTGTTTC
STIM1_I115F_Fw	CATGGTGAGGATAAGCTCTTCAGCGTGGAGGACCTG
STIM1_I115F_Rev	CAGGTCCTCCACGCTGAAGAGCTTATCCTCACCATG

STIM1_P165L_Fw	CAGTGGCCATGCCATGCTAAGGCTGGCTGTCACC
STIM1_P165L_Rev	GGTGACAGCCAGCCTTAGCATGGCATGGCCACTG
STIM1_R304W_Fw	CAGCGGCTGAAGGAGCTGTGGGAGGGTACTGAGAATG
STIM1_R304W_Rev	CATTCTCAGTACCCTCCCACAGTCCTTCAGCCGCTG

# Résultats

# 1. Recherche de nouvelles mutations à l'origine de la myopathie à agrégats tubulaires

## 1.1. Contexte

La myopathie à agrégats tubulaires (TAM) est une maladie musculaire progressive caractérisée au niveau clinique par une faiblesse musculaire, des crampes et des myalgies (OMIM#160565) touchant en premier lieu les muscles proximaux des membres inférieurs. Au niveau histologique, cette maladie se caractérise par des accumulations de tubules membranaires dans les fibres musculaires. Son mode de transmission est autosomal dominant ou récessif. Le premier gène identifié par séquençage d'exome comme muté et responsable de la TAM dominante est *STIM1*, et plus récemment des mutations dans le canal calcique *ORAI1* ont été associées à cette maladie (Nesin, Wiley et al. 2014, Endo, Noguchi et al. 2015) (Böhm *et al*, unpublished).

## 1.2. But de l'étude

Le but de cette étude a été de rechercher par séquençage Sanger des mutations dans *STIM1* et *ORAI1* chez quatre patients atteints de myopathie à agrégats tubulaires afin d'établir un diagnostic moléculaire.

## 1.3. Résultats

### *1.3.1. Identification de la variation P165L dans STIM1 chez un patient TAM*

Dans un premier temps j'ai procédé à l'amplification de l'ADN génomique (ADNg) de quatre patients dénommés TR TED, SO 112097, CE 108916 et HA 106217 par PCR Génomphi. La qualité des ADN générés a été vérifiée par une PCR contrôle d'amplification de l'exon 24 du

gène *DMXLI* qui code une protéine de la superfamille des WD repeat, exprimée de façon ubiquitaire (figure 1A). Des PCR et séquençages Sanger de tous les exons de *STIM1* et *ORAI1* ont ensuite été réalisés. L'analyse des résultats de séquençage n'a révélé aucune variation pathogénique dans *ORAI1*. De même, les patients SO 112097, CE 108916 et HA 106217 ne portaient aucune variation dans les 12 exons de *STIM1*. En revanche, une variation c.494C>T (p.P165L) a été détectée dans l'exon 4 de *STIM1* pour le patient TR TED (figure 1B). Cette variation n'était pas référencée dans les bases de données ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) ou EVS (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), mais estimée fortement pathogénique par l'outil dbNSFP combinant une dizaine d'outils de prédiction tels que PROVEAN, SIFT, LRT, Mutation Taster, Mutation Assessor, FATHMM et Polyphen2. Une nouvelle PCR et un nouveau séquençage de l'exon 4 de *STIM1* réalisés à partir d'ADN non génomiphilé du patient ont permis de confirmer la présence de cette variation chez le patient TR TED. La variation P165L est localisée dans le domaine SAM (sterile alpha motif) de *STIM1*, domaine luminaire qui interagit avec l'EF-hand. De plus la proline est un acide aminé intervenant dans les repliements de protéine. Un changement de la proline 165 en leucine pourrait donc altérer le repliement de *STIM1*, l'interaction entre l'EF-hand et le domaine SAM et par conséquent la sensibilité au  $Ca^{2+}$ , hypothèse qui restait à tester.

### *1.3.2. Etude fonctionnelle de l'impact de la variation P165L sur le «clustering» de STIM1*

Afin de tester cette hypothèse, j'ai étudié l'impact de la variation P165L sur le clustering de *STIM1* en introduisant cette mutation potentielle dans les constructions YFP-*STIM1* et mCherry-*STIM1*. Des myoblastes C2C12 ont ensuite été transfectés et la localisation de la protéine étudiée par immunofluorescence. Les cellules exprimant *STIM1* P165L ou sauvage (WT) présentent un signal majoritairement diffus et homogène dans le RE. En revanche les

cellules transfectées avec STIM1 WT ou P165L et traitées à la thapsigargine (un inhibiteur de la pompe SERCA (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase), qui permet de mimer une vidange des stocks calciques) présentent des clusters de STIM1 (figure 2). Ces résultats sont à l'opposé de ceux observés dans les cellules transfectées avec les mutants D84G ou R304W de STIM1, qui présentent des clusters de STIM1 indépendamment du traitement à la thapsigargine. Ces résultats suggèrent que la variation P165L n'altère pas la localisation ni le clustering de STIM1 de façon significative.

#### 1.4. Conclusion

Dans cette étude j'ai pu identifier la variation c.494C>T (p.P165L) dans STIM1 chez un patient atteint de TAM par séquençage ciblé. Cette mutation n'a pas d'impact mesurable sur la localisation et le clustering de la protéine puisque ces deux paramètres sont similaires entre cellules transfectées avec les constructions STIM1 WT ou P165L. Cependant il est important de noter que cette mutation est localisée dans le domaine SAM de la protéine, et pas dans l'EF-hand. Ainsi, elle n'est pas directement impliquée dans la détection et la liaison du  $Ca^{2+}$  par STIM1. Il serait intéressant d'obtenir de l'ADN d'autres individus de la famille du patient afin d'établir la ségrégation de la variation. Il n'est également pas exclu que la variation en question puisse avoir un effet à un autre niveau de la voie du SOCE, indépendamment du clustering de STIM1. La potentielle pathogénicité de cette variation reste donc encore à élucider.

## 2. Etude *in vitro* de l'impact des mutations de TAM et Stormorken de *STIM1* sur le SOCE

### 2.1. Introduction

L'entrée capacitative du  $\text{Ca}^{2+}$  ou SOCE (store-operated calcium entry) est un mécanisme cellulaire qui permet l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme puis dans le RE des cellules suite à une vidange des stocks calciques. Elle implique 2 protéines principales : le senseur calcique du RE, *STIM1*, et le canal calcique *ORAI1* situé à la membrane plasmique. Des mutations dans *STIM1* sont à l'origine de la TAM et du syndrome de Stormorken. Ce sont principalement des mutations hétérozygotes dominantes avec gain de fonction. Elles sont localisées dans le domaine EF-hand de *STIM1* dans le cas des patients TAM (Bohm, Chevessier et al. 2013), et leur impact sur le clustering de la protéine tel que décrit précédemment (partie 1, résultats) suggère une altération de l'aptitude de la protéine à détecter et à lier le  $\text{Ca}^{2+}$ . La mutation p.R304W identifiée chez de nombreux patients atteints du syndrome de Stormorken est quant à elle localisée dans le domaine coiled-coil 1 de *STIM1* (Nesin, Wiley et al. 2014). Elle présente le même impact sur le clustering de *STIM1* que les mutations TAM, et cet effet proviendrait d'un changement dans la structure de la protéine qui empêcherait le repliement de l'hélice inhibitrice, rendant la protéine tout le temps active.

D'autre part, des mutations à l'origine de la TAM avec des signes de syndrome de Stormorken ont également été trouvées dans le gène *ORAI1* (Nesin, Wiley et al. 2014, Endo, Noguchi et al. 2015) (Böhm *et al*, unpublished). L'une de ces mutations est la mutation p.V107M, conduisant à un canal perméable au  $\text{Ca}^{2+}$  de façon permanente, ce qui conduit à un SOCE plus important.

Plusieurs étapes sont nécessaires à l'activation du SOCE suite à une vidange du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu et stocké dans le RE: diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  lié par *STIM1*, dépliement et oligomérisation de *STIM1*, migration des clusters de *STIM1* à proximité de la membrane plasmique, recrutement

du canal calcique ORAI1, ouverture des canaux calciques, entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme puis dans le RE.

## 2.2. But de l'étude

L'objectif de ce travail a été d'étudier et de comparer l'impact des mutations TAM et Stormorken de *STIM1* à différentes étapes de la voie du SOCE dans des cellules de patients et des cellules transfectées.

## 2.3. Résultats

### *2.3.1. Impact des mutations de STIM1 sur le niveau d'expression protéique*

Afin d'étudier l'effet des mutations dans *STIM1* sur le niveau d'expression protéique, les protéines totales de 2 lignées de myoblastes de patients (7156 portant la mutation D84G et 106441 portant la mutation L96V) ont été extraites. L'expression endogène de *STIM1* a été analysée par western blot et comparée à celle d'autres lignées de myoblastes (myoblastes humains contrôles LHCNM2 et CHQ25, myoblastes murins C2C12 et myoblastes de rat L6 woody) et à d'autres types cellulaires (cellules épithéliales cancéreuses HeLa). Les lignées de myoblastes de patients ont un niveau d'expression endogène de *STIM1* environ deux fois supérieur à celui des autres lignées de myoblastes humains et murins testés, mais similaire à l'expression endogène de *STIM1* dans les cellules HeLa (figures 3A et 3B).

Le niveau d'expression de *STIM1* a également été quantifié dans des cellules C2C12 transfectées avec des constructions sans tag *STIM1* WT, D84G ou R304W de *STIM1*. On observe à l'image des cellules de patients une expression de *STIM1* supérieure dans les cellules exprimant *STIM1* muté par rapport aux cellules transfectées avec *STIM1* WT (figure 4A). En



effet, les cellules transfectées avec STIM1 muté expriment 1,6 fois plus de STIM1 que celles transfectées avec STIM1 WT (figure 4B), et cette différence d'expression est significative.

Ainsi, les résultats obtenus à la fois à partir de myoblastes de patients et de myoblastes murins transfectés suggèrent que les mutations TAM et Stormorken dans *STIM1* entraînent une augmentation de l'expression ou de la stabilité de la protéine.

### *2.3.2. Effet des mutations de STIM1 sur le clustering de la protéine*

#### *2.3.2.1. Etude du clustering de STIM1 dans des myoblastes et myotubes de patients*

Afin d'étudier l'impact des mutations TAM sur la localisation de protéines impliquées dans le SOCE et dans le stockage de  $Ca^{2+}$  au niveau du RE, j'ai marqué STIM1, ORAI1 et calséquestrine (CASQ1) dans les lignées de myoblastes humains portant la mutation D84G ou L96V et dans une lignée de myoblastes humains contrôle (KM49C19VE). Le signal endogène de STIM1 est diffus et majoritairement localisé autour du noyau aussi bien dans la lignée de myoblastes contrôles que dans les lignées de myoblastes de patients TAM (Panel 1, figure 5). Dans la lignée de myoblastes contrôles et la lignée de myoblastes L96V, le signal d'ORAI1 est localisé au niveau de la membrane mais également autour du noyau. En revanche, ORAI1 présente un signal filamenteux dans les myoblastes de la lignée D84G (panel 2, figure 5). La protéine CASQ1 présente un signal homogène et diffus dans les myoblastes contrôles, mais un signal majoritairement réticulaire dans les myoblastes D84G. A l'inverse dans la lignée de myoblastes L96V, CASQ1 semble former des dots dans le RE des cellules, mais il faudrait effectuer des co-marquages avec une protéine du RE tel que KDEL pour conclure (Panel 3, figure 5). Ces résultats suggèrent que la localisation de STIM1 n'est pas altérée dans les lignées de myoblastes de patients D84G et L96V. De plus, les myoblastes de patients ne présentent pas un clustering constitutif de STIM1 dans des conditions physiologiques de  $Ca^{2+}$ . Il est plus

difficile de conclure en ce qui concerne la localisation d'ORAI1 et de CASQ1 étant donné les différences de localisation observées entre les deux lignées de myoblastes de patients. Il est néanmoins possible que les mutations dans *STIM1* aient un effet sur la localisation intracellulaire d'ORAI1 et/ou CASQ1.

Afin d'étudier la localisation de STIM1 dans un modèle musculaire plus mature, j'ai différencié la lignée de myoblastes contrôle KM49C19VE (KM49) et les lignées de myoblastes de patients D84G et L96V pendant 12 jours. Le signal endogène de STIM1 a été marqué par immunofluorescence à 5 jours et à 12 jours de différenciation. Par microscopie « brightfield » (lumière transmise) la différenciation des myoblastes contrôles a bien été effective au bout de 12 jours. En effet on observe des cellules fines et très allongées correspondant à des myotubes (panel 1, figure 6). En revanche, les myotubes correspondant aux lignées de patients sont beaucoup plus courts, et dans le cas de la lignée D84G on note de nombreuses ramifications (panels 2 et 3, figure 6). Cette différence de longueur des myotubes suggère un problème de fusion des myoblastes de patients au cours de la différenciation *in vitro*. Le signal de STIM1 est homogène et diffus dans les myotubes contrôles dans lesquels on peut noter la présence d'au moins 4 noyaux, témoignant d'une fusion des myoblastes (panel 1, figure 7). On observe également un signal homogène et diffus de STIM1 dans les cellules de patients 12 jours après différenciation. En revanche, contrairement aux myotubes contrôles qui sont plurinucléés, les cellules de patients bien qu'allongées ne présentent qu'un seul noyau, confirmant le défaut de fusion soupçonné après observation par microscopie brightfield (panels 2 et 3, figure 7). Les cellules allongées provenant de la différenciation des lignées de myoblastes de patients ne semblent pas présenter de défauts dans la localisation et de STIM1, et on n'observe pas de clustering constitutif de la protéine mutée. Toutefois, l'absence de fusion de ces cellules empêche une conclusion concernant l'impact des mutations dans les myotubes de patients.

### 2.3.2.2. Impact des mutations de *STIM1* sur le clustering dans des cellules transfectées

#### Effet du tag sur le phénotype de clustering

Les mutations TAM de *STIM1* décrites jusque-là conduisent à un clustering constitutif de la protéine marquée par un tag YFP. Afin d'exclure un effet du tag sur le phénotype observé, des cellules C2C12 et HeLa ont été transfectées avec des constructions de *STIM1* WT ou mutées possédant un tag mCherry ou sans tag. La protéine mCherry-*STIM1* WT a un signal diffus dans les cellules et forme des clusters dans les cellules traitées à la thapsigargine. En revanche les cellules transfectées avec mCherry *STIM1* D84G ou R304W présentent des clusters de *STIM1* indépendamment du traitement à la thapsigargine (figure 8A). Les mêmes observations sont faites dans des myoblastes C2C12 transfectés avec des constructions de *STIM1* WT ou muté en l'absence de tag (figure 8B).

La similarité des résultats obtenus dans les cellules transfectées avec *STIM1* WT ou muté sans tag ou possédant un tag YFP ou mCherry permet de conclure que la présence du tag n'a pas d'influence sur la localisation intracellulaire de *STIM1* WT ou mutant, ni sur le phénotype de clustering. Ces résultats justifient donc l'utilisation des constructions mCherry et YFP-*STIM1* pour la suite de notre projet.

#### Impact des mutations dans *STIM1* sur la localisation des clusters

Suite à une déplétion des stocks calciques, *STIM1* forme des clusters qui migrent et localisent près de la membrane plasmique. Les résultats obtenus précédemment montrent que la protéine *STIM1* portant les mutations TAM et Stormorken forme des clusters de façon constitutive et indépendamment de la déplétion des stocks calciques. Afin d'analyser l'influence potentielle des mutations de *STIM1* sur la localisation des clusters formés, des cellules C2C12 ont été transfectées avec des constructions YFP *STIM1* WT ou muté D84G, et R304W. La localisation du signal YFP à proximité de la membrane plasmique a été étudiée par microscopie TIRF en

« time-lapse ». Les cellules qui expriment STIM1 WT montrent un signal diffus de la protéine, plus prononcé autour du noyau (panel 1, Figure 9). L'ajout de thapsigargine dans le milieu entraîne l'apparition progressive de clusters de STIM1 dont la taille, le nombre et l'intensité à proximité de la membrane plasmique augmentent au fur et à mesure de leur formation. A l'inverse, les cellules transfectées avec des constructions mutées de STIM1 D84G et R304W présentent des clusters de la protéine avant traitement à la thapsigargine. L'intensité du signal de ces clusters augmente suite au traitement à la thapsigargine, suggérant un rapprochement de la membrane plasmique ou que les mutations n'entraînent pas un clustering total de STIM1 (panels 2 et 3, figure 9).

Ces résultats viennent confirmer que les clusters formés par les mutants TAM et Stormorken de STIM1 sont localisés à proximité de la membrane plasmique, suggérant que les mutations n'impactent pas sur leur localisation. De plus, nous avons montré ici que l'intensité du signal de STIM1 D84G et R304W augmente à proximité de la membrane plasmique suite au traitement à la thapsigargine, suggérant ainsi que ces mutations n'entraînent pas un clustering total de STIM1. Ces résultats laissent penser que les clusters de STIM1 mutés localisés près de la membrane plasmique seraient fonctionnels et pourraient ainsi activer le SOCE de façon permanente, hypothèse qui reste à démontrer.

#### Effet dominant négatif des mutations de STIM1 sur le clustering de la protéine sauvage

Les mutations de TAM et Stormorken de STIM1 de cette étude sont toutes des mutations hétérozygotes entraînant un gain de fonction. Ainsi, afin d'étudier l'effet dominant négatif de la protéine STIM1 mutée sur la protéine WT, des cellules C2C12 et HeLa ont été co-transfectées avec des constructions mCherry-STIM1 WT et YFP-STIM1 WT ou muté. Par de simples transfections des constructions mCherry et YFP STIM1 WT et mutés je me suis assurée de l'absence de passage du signal vert dans le rouge et inversement. J'ai également vérifié que dans cette expérience seuls les mutants de STIM1 forment des clusters de façon constitutive

(figure 10A). Les cellules co-transfectées avec les deux constructions STIM1 WT présentent des signaux YFP et mCherry diffus et qui se superposent, évoquant une localisation identique des protéines. Le traitement des cellules à la thapsigargine entraîne un « co-clustering » des deux protéines (panel vertical 2, figure 10B). En revanche, on observe des clusters du mCherry STIM1 WT dans les cellules qui co-expriment STIM1 D84G ou R304W sans traitement à la TG. On note une co-localisation des clusters de la protéine WT en mCherry avec ceux en YFP de la protéine mutée (panels 3 et 4, figure 10B). Mes résultats montrent que la protéine STIM1 mutée séquestre la protéine sauvage dans les clusters sans déplétion des stocks de calcium, ce qui démontre un effet dominant négatif de la protéine mutée sur la protéine WT. Toutefois, on observe encore du signal diffus de STIM1 en observant la cellule en Z, ce qui suggère que STIM1 WT n'est pas complètement recruté aux clusters qui sont majoritairement formés par la protéine mutée.

#### Effet dominant négatif des mutations de STIM1 sur le clustering de STIM1L

J'ai également étudié l'effet des mutations de STIM1 sur l'isoforme long STIM1L. Cet isoforme de STIM1 provient d'un épissage alternatif de l'exon 11 et la protéine STIM1L contient 106 acides aminés supplémentaires en C-terminal par rapport à STIM1. Cette extension contient un domaine de liaison à l'actine. STIM1L est exprimé spécifiquement dans le muscle chez l'homme, et exclusivement dans le muscle squelettique et le cerveau chez la souris (Darbellay, Arnaudeau et al. 2011). Le signal de STIM1L dans les myoblastes C2C12 est un signal diffus et homogène similaire à celui de STIM1 (panels 1 et 2, figure 11A). Suite à l'ajout de thapsigargine, STIM1 forme de gros clusters tandis que STIM1L forme des clusters plus discrets (figure 11A). En co-transfection, STIM1 et STIM1L montrent le même aspect diffus. Le traitement à la thapsigargine des cellules co-transfectées induit la formation de co-clusters de STIM1 et de STIM1L de grande taille (figure 11B). Les cellules co-transfectées avec STIM1L WT et les mutants de STIM1 montrent également un co-clustering majeur de STIM1L

et STIM1 mutée. Ces résultats suggèrent que les mutants TAM et Stormorken de STIM1 recrutent STIM1L au niveau de leurs clusters, altérant ainsi son clustering normal.

#### Rôle du réseau d'actine dans le maintien des clusters de STIM1

Afin d'étudier le rôle du réseau d'actine dans le maintien des clusters de STIM1, des cellules C2C12 ont été transfectées avec des constructions YFP STIM1 WT ou muté, et les filaments d'actine ont été marqués en utilisant de la phalloïdine. Le signal de STIM1 WT dans les cellules est diffus et homogène et indépendant de la localisation des filaments d'actine (panel 1, figure 12A). Le traitement des cellules à la thapsigargine entraîne le clustering de STIM1. On peut également noter que les filaments d'actine ont un signal plus prononcé et semblent plus épais, et les clusters de STIM1 sont localisés le long de ces filaments (panel 2, figure 12A). Les cellules exprimant STIM1 D84G ou R304W présentent une localisation de STIM1 et de l'actine similaire à celle observée dans les cellules transfectées avec STIM1 WT et traitées à la thapsigargine (panels 3 et 4, figure 12), avec un clustering majeur le long des filaments d'actine marqués. Le traitement de ces cellules à la cytochalasine D 24h post-transfection entraîne une disruption du réseau de filaments d'actine. On observe la formation de petits clusters de STIM1 WT en absence de thapsigargine et de STIM1 muté (figure 12B). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des polymères d'actine par la cytochalasine D impacte simultanément la localisation de la protéine sauvage ou mutée, ainsi que l'organisation et la distribution des clusters. Ainsi, l'actine semble jouer un rôle dans la localisation de STIM1 au repos ainsi que dans le maintien des clusters dans les cellules C2C12.

#### Effet des mutations de STIM1 sur la localisation de la protéine dans les myotubes

Afin d'étudier l'impact des mutations de STIM1 sur la localisation de la protéine dans des myotubes, des myoblastes murins C2C12 ont été transfectés avec des constructions YFP ou mCherry STIM1 WT, D84G ou R304W puis différenciés pendant 5 et 12 jours. Des myoblastes non transfectés ont été différenciés en parallèle pendant 12 jours afin d'avoir un contrôle

négatif. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI afin de s'assurer de la fusion des myoblastes et donc de la différenciation. On observe un signal vert non spécifique à proximité des noyaux dans les myotubes non transfectés, mais aucun signal rouge aspécifique n'est détecté (figure 13A). Ce signal est un signal d'auto-fluorescence des myotubes non transfectés. J'ai donc par la suite travaillé avec des cellules transfectées en mCherry ou en YFP uniquement lorsque le signal détecté était supérieur au bruit de fond. La reconstruction 3D des images montre que le signal de STIM1 est similaire entre les myotubes exprimant STIM1 WT ou muté au bout de cinq jours de différenciation. On observe une distribution diffuse de STIM1 avec de nombreux dots (figure 13B). En revanche, on observe une différence dans la localisation de STIM1 12 jours après la différenciation entre myotubes transfectés avec STIM1 WT ou muté. En effet, les myotubes exprimant STIM1 WT montrent un signal dense de la protéine autour des noyaux et dans les repliements de la membrane plasmique (figure 14A). Les myotubes exprimant STIM1 D84G montrent un signal de la protéine qui semble principalement localisé à proximité de la membrane plasmique. On observe des structures longilignes similaires à des clusters qui présentent des prolongements dans le cytoplasme des myotubes (figure 14B). Ces structures sont également visibles dans les myotubes transfectés avec STIM1 R304W, mais dans ceux-ci on note encore la présence de nombreux dots de STIM1 (figure 14C). Ces résultats suggèrent qu'au cours de la différenciation en myotubes, STIM1 forme d'abord des dots dans le cytoplasme des myotubes. Cependant dans des myotubes plus matures on observe que STIM1 WT est plus diffus ou localisé autour des noyaux tandis que STIM1 muté forme des clusters localisés à la membrane plasmique avec des intrusions cytoplasmiques.

Mes résultats confirment un clustering constitutif de la protéine STIM1 suite à des mutations TAM ou Stormorken indépendamment du tag. J'ai également montré que la localisation des clusters de STIM1 à proximité de la membrane plasmique n'est pas affectée par les mutations TAM et Stormorken, ce qui suggère que ces clusters seraient fonctionnels et donc capables d'activer le canal calcique ORAI1. Toutefois, l'augmentation du signal de STIM1 muté à proximité de la membrane plasmique après traitement à la thapsigargine suggère qu'une partie de STIM1 muté forme des clusters. De plus, j'ai pu établir un effet dominant négatif de la protéine STIM1 mutée sur le clustering de la protéine WT ainsi que sur l'isoforme STIM1L, puisque ces protéines sont retrouvées au niveau des clusters de STIM1 muté. Mes résultats montrent également que les filaments d'actine jouent un rôle dans la localisation et le clustering de STIM1 dans les cellules C2C12. Mes résultats suggèrent aussi que STIM1 forme des petits clusters dans les myotubes très tôt au cours de la différenciation. Dans des myoblastes matures, STIM1 muté semble localisé près de la membrane plasmique, à l'inverse de STIM1 WT qui semble localisé autour des noyaux. La présence de clusters de STIM1 dans les myotubes transfectés avec la protéine STIM1 mutée suggère que ce type cellulaire serait un bon modèle d'étude de la formation et de la dynamique des clusters.

#### *2.3.2.3. Capacité des mutations STIM1 à induire la formation d'agrégats tubulaires*

La seule marque histologique retrouvée dans les biopsies musculaires de patients TAM est la présence d'empilements de simple ou double membranes similaires à des nids d'abeilles nommés « agrégats tubulaires » (Engel 1964). Ces agrégats marqués en rouge par la coloration de Gomori trichrome proviennent du RS. Les agrégats tubulaires sont également retrouvés dans le muscle normal de personnes et de souris âgées (Chevessier, Marty et al. 2004, Chevessier, Bauche-Godard et al. 2005), de même que dans diverses autres pathologies telles que la paralysie périodique, les syndromes congénitaux de myasthénie, ou encore des myopathies



causées par des médicaments ou l'alcool. Cependant, la pathogénicité de ces agrégats membranaires ainsi que les mécanismes qui conduisent à leur formation restent inconnus.

Afin d'étudier l'aptitude des mutations TAM et Stormorken à induire la formation d'agrégats tubulaires, j'ai transfecté des cellules C2C12 ou HeLa avec des constructions YFP-STIM1 WT, D84G ou R304W et étudié par CLEM la structure des cellules 24h post-transfection.

#### Etude de la formation des agrégats tubulaires dans des myoblastes murins (C2C12)

Afin d'être dans un type cellulaire proche du muscle pour induire la formation des agrégats tubulaires, j'ai étudié par CLEM des myoblastes murins C2C12 transfectés avec des constructions YFP-STIM1 WT ou muté. En microscopie confocale, les cellules C2C12 exprimant STIM1 WT ont un signal homogène et diffus tandis que les cellules exprimant STIM1 D84G ou R304W présentent des clusters. L'observation des coupes obtenues en microscopie électronique (ME) montrent un RE normal et continu à proximité du noyau dans les cellules transfectées avec STIM1 WT (figure 15A). On observe une abondance de structures en forme d'anneaux d'oignons similaires à celles observées dans les cellules HeLa, ainsi que des mitochondries défectueuses et des phagosomes. Les myoblastes transfectés avec STIM1 D84G présentent également un RE normal à proximité du noyau, ainsi que de nombreuses structures en forme d'anneaux d'oignons. On observe cependant dans ces cellules un rapprochement du RE de la membrane plasmique, ainsi que la présence d'empilements de membranes à proximité de la membrane plasmique et dans le cytoplasme (figure 15B). Ces structures membranaires étaient absentes dans les myoblastes exprimant STIM1 R304W, bien que nous ayons également observé la présence de structures en rond d'oignons et des mitochondries endommagées (figure 15C). En résumé, les cellules C2C12 transfectées avec STIM1 D84G présentent des empilements de membranes à proximité de la membrane plasmique, contrairement aux cellules exprimant STIM1 WT ou R304W. Néanmoins, on note la présence de structures en rond d'oignons dans les cellules exprimant STIM1 WT ou muté.

## Etude de la formation des agrégats tubulaires dans les cellules humaines HeLa

Je me suis ensuite intéressée à l'aptitude des mutants TAM et Stormorken de STIM1 à induire la formation d'agrégats tubulaires dans un modèle cellulaire humain. Pour cela j'ai travaillé sur des cellules HeLa, bien que ce modèle cellulaire n'ait pas une origine musculaire. Conformément aux observations faites dans les myoblastes C2C12, les cellules HeLa qui expriment STIM1 WT présentent un signal homogène et diffus en microscopie confocale alors que des clusters de STIM1 sont identifiables dans les cellules transfectées avec les mutants de STIM1. Ces cellules ont ensuite été étudiées en microscopie électronique. Dans les cellules HeLa transfectées avec la protéine STIM1 WT, j'ai noté une abondance de mitochondries qui semblent gonflées avec une structure altérée (figure 16A). On note également la présence de structures en forme d'anneaux d'oignons, similaires à des enroulements de membranes dont l'origine pourrait être réticulaire ou mitochondriale. Ces cellules ne présentent pas d'empilements de membranes à proximité de la membrane plasmique, ce qui suggère que la surexpression de STIM1 WT n'entraîne pas la formation d'agrégats tubulaires.

Dans les cellules HeLa qui expriment la protéine STIM1 D84G, j'ai également noté une abondance de mitochondries présentant une structure endommagée, avec un RE normal et continu à certains endroits, mais quelques fois élargi à proximité des mitochondries (figure 16B). Ces cellules ne présentaient pas non plus d'empilements de membranes autres que les structures en rond d'oignons, à proximité de la membrane plasmique. Les cellules HeLa transfectées avec STIM1 R304W présentent également des mitochondries endommagées montrant un défaut de disposition des crêtes mitochondriales, ainsi qu'un RE élargi à certains endroits. J'ai pu noter qu'aux endroits où le RE est élargi, il semble à chaque fois en contact avec la membrane des mitochondries, suggérant une interaction entre les deux organelles (figure 16C). En revanche, à l'opposé des cellules exprimant STIM1 WT et D84G, les cellules transfectées avec STIM1 R304W présentent des empilements de membranes à proximité de la

membrane plasmique ainsi que dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent que la transfection de STIM1 WT ou muté a des effets sur la structure des mitochondries et induit la formation de structures en ronds d'oignons. J'ai également montré ici que la surexpression de STIM1 muté entraîne par endroit un élargissement du RE à proximité des mitochondries. Pour finir, j'ai montré que le mutant STIM1 R304W induit la formation d'empilements de membranes à proximité de la membrane plasmique dans les cellules HeLa.

Pris tous ensemble, mes résultats montrent que la transfection de STIM1 WT ou muté entraîne un gonflement des mitochondries, la présence de structures en rond d'oignons et de nombreux phagosomes. Il conviendrait d'étudier la structure de cellules transfectées avec un plasmide contrôle afin de lier la surexpression de STIM1 à ces différentes structures retrouvées dans les cellules surexprimant STIM1 WT ou muté. J'ai également montré ici que les mutations TAM et Stormorken de STIM1 sont capables d'induire *in vitro* la formation d'empilements de membranes dans le cytoplasme et à proximité de la membrane plasmique dans les cellules C2C12 et HeLa transfectées.

#### 2.3.2.4. *Impact des mutations de STIM1 sur le recrutement d'ORAI1*

J'ai montré dans les précédentes expériences que les mutations TAM et Stormorken de STIM1 entraînent un clustering constitutif de la protéine, et que les clusters ainsi formés sont correctement localisés à proximité de la membrane plasmique. L'étape suivante dans la cascade du SOCE était d'étudier la fonctionnalité de ces clusters de STIM1 muté, c'est-à-dire leur habilité à recruter et à activer le canal calcique ORAI1. Pour cela, des cellules C2C12 et HeLa ont été co-transfectées avec des constructions mCherry-STIM1 WT ou muté et GFP-ORAI1 WT et la co-localisation des protéines a été étudiée par immunofluorescence.

Dans un premier temps, je me suis assurée que le système utilisé était apte pour des études de co-localisation. Pour cela, des images de billes fluorescentes ont été acquises dans les plans X, Y et Z et l'alignement des lasers vert et rouge dans ces trois plans a été analysée. La parfaite

co-localisation du signal des billes en vert et rouge ainsi que la superposition des signaux en vert et rouge dans les trois plans confirment que le système est optimal pour répondre à la question de co-localisation posée (figure 17A).

Dans les cellules C2C12 transfectées, on observe une répartition diffuse et homogène de STIM1 WT dans le RE, qui forme des clusters suite à l'ajout de thapsigargine. A l'opposé, les cellules HeLa et C2C12 transfectées avec STIM1 D84G ou R304W présentent des clusters en absence de traitement à la thapsigargine (figure 17B). Les cellules transfectées avec la construction GFP-ORAI1 WT ou portant la mutation V107M ne présentent pas de clusters, et ce indépendamment du traitement à la thapsigargine (figure 17C). Ceci indique que la protéine ORAI1 par elle-même ne forme pas de clusters. Ces contrôles négatifs m'ont également permis de m'assurer qu'il n'y a aucun passage du signal vert dans le rouge et inversement.

De façon surprenante, la co-expression de STIM1 WT et d'ORAI1 WT dans les cellules C2C12 conduit à la formation de « co-clusters » de STIM1 et d'ORAI1, identifiables par une co-localisation des signaux GFP et mCherry au niveau des clusters de STIM1, alors qu'en simple transfection aucune des deux protéines ne clusterise. La même observation a été faite dans des cellules HeLa transfectées avec des constructions de STIM1 muté et ORAI1 WT. Ces résultats suggèrent que la surexpression de STIM1 en présence d'ORAI1 conduit au co-clustering des protéines (figure 17D) indépendamment du niveau de calcium dans les stocks et indépendamment d'une mutation de gain de fonction.

Afin de savoir si le clustering constitutif de STIM1 WT en présence d'ORAI1 WT est lié à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , des cellules C2C12 et HeLa ont été co-transfectées avec du STIM1 WT et une construction ORAI1 portant la mutation V107M. Cette mutation altère la structure du canal, le rendant perméable de façon permanente au  $\text{Ca}^{2+}$  (Böhm *et al*, unpublished). A l'opposé des cellules C2C12 co-transfectées avec STIM1 et ORAI1 WT qui présentent des co-clusters, les

cellules C2C12 qui surexpriment STIM1 WT et ORAI1 V107M montrent des dots de STIM1 dont la taille est beaucoup plus petite que celle des clusters (figure 17D). Ceci indique que l'entrée permanente de  $Ca^{2+}$  a un effet réducteur sur le nombre et la taille des clusters et des co-clusters de STIM1 WT et ORAI1 WT. Afin d'analyser l'effet des mutations STIM1 sur le recrutement d'ORAI1, j'ai co-transfecté les cellules C2C12 avec STIM1 D84G ou R304W et le mutant V107M d'ORAI1. J'ai pu constater une augmentation de la mortalité cellulaire dans ces conditions, suggérant ainsi un effet synergique d'entrée de calcium et d'expression des mutants STIM1 et ORAI1, provoquant un effet toxique.

La localisation d'ORAI1 WT et V107M dans les cellules HeLa est similaire à celle observée dans les myoblastes C2C12, c'est-à-dire membranaire (figure 18A). Dans les cellules HeLa co-transfectées avec STIM1 WT ou muté et ORAI1 WT, j'ai fait les mêmes observations que dans les myoblastes C2C12 à savoir que la surexpression simultanée de STIM1 WT ou muté et d'ORAI1 WT entraîne un co-clustering des 2 protéines (figure 18B). En revanche, dans les cellules HeLa qui surexpriment STIM1 WT et ORAI1 V107M, STIM1 a un signal diffus et homogène dans la majorité des cellules observées (panel 3, figure 18B). Mes résultats suggèrent que l'entrée de  $Ca^{2+}$  à travers le canal ORAI1 muté prévient le clustering de STIM1 WT, ou conduit à la dissociation des clusters de STIM1 WT. La co-expression de STIM1 D84G ou R304W avec le mutant V107M d'ORAI1 ne semble pas avoir d'effet sur la viabilité des cellules HeLa. Dans ces conditions on observe une persistance des co-clusters de STIM1 muté avec ORAI1 V107M (figure 18C).

Afin d'étudier la diminution des co-clusters de STIM1 et d'ORAI1 WT en présence d'ORAI1 V107M, j'ai procédé à une analyse quantitative des cellules classées en trois catégories : absence totale de clusters (STIM1 diffus), petits clusters de STIM1, gros clusters de STIM1. Les cellules C2C12 co-transfectées avec STIM1 et ORAI1 WT présentent à environ 62% des gros clusters, 26% de petits clusters et 12% sans clusters. La co-transfection de STIM1 WT et

ORAI1 muté entraîne la formation de gros clusters dans 10% des cellules, de petits clusters dans 60% des cellules et une absence de clusters dans 30% des cellules (figure 19A). Ainsi, dans les cellules C2C12 la co-transfection STIM1 WT avec ORAI1 V107M au lieu d'ORAI1 WT entraîne un phénotype majoritairement et significativement différent, où l'on passe des gros clusters (STIM1 WT + ORAI1 WT) à des petits clusters (STIM1 WT + ORAI1 V107M). Dans les cellules HeLa co-exprimant STIM1 WT et ORAI1 WT, on observe à 75% des gros clusters, 12,5% de cellules avec des petits clusters et 12,5% de cellules ne présentant pas des clusters (Figure 19B). La co-expression de STIM1 WT et ORAI1 V107M dans les cellules HeLa entraîne la formation de gros clusters dans 5% des cellules, la formation de petits clusters dans 25% des cellules, et une absence de clusters dans 70% des cellules. La transfection des cellules HeLa avec STIM1 muté et ORAI1 WT ou V107M entraîne la formation de gros clusters dans 80 à 90% des cellules HeLa.

En résumé, la co-expression de STIM1 et ORAI1 induit la formation de clusters indépendamment de la vidange des stocks calciques. Néanmoins, ce phénotype de clustering constitutif est fortement réduit en cas de surexpression simultanée de STIM1 avec un canal ORAI1 perméable au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces résultats indiquent que la formation et la maintenance des clusters dépendent de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . En revanche, STIM1 D84G et R304W forment des clusters avec ORAI1 indépendamment de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ , suggérant un effet dominant négatif de ces protéines sur le recrutement d'ORAI1 qui serait ainsi séquestré au niveau des clusters de STIM1 et activé indépendamment de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### *2.3.2.5. Effet des mutations TAM et Stormorken de STIM1 sur l'entrée du $\text{Ca}^{2+}$*

Des expériences de mesure de  $\text{Ca}^{2+}$  menées précédemment dans notre laboratoire ont montré un niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et un niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE supérieur dans les myoblastes de patients TAM par rapport à des myoblastes contrôles (Bohm, Chevessier et al.

2013). De même, l'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire entraîne une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique plus importante dans les myoblastes de patients TAM par rapport à des myoblastes contrôles. J'ai montré ci-dessus que les mutations dans STIM1 causant la myopathie à agrégats tubulaires ou le syndrome de Stormorken entraînent un recrutement permanent d'ORAI1 au niveau des clusters, indépendamment de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Activation de l'entrée de $\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules C2C12 et HeLa par les mutants de STIM1

Afin d'étudier l'ouverture effective des canaux calciques induite par le recrutement constitutif d'ORAI1 par les mutants STIM1, des myoblastes murins C2C12 ont été transfectés avec des constructions YFP STIM1 humain WT, D84G ou R304W. Le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique a été mesuré en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et suite à l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  en utilisant la sonde calcique Indo-1. Aucune entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  n'a été détectée dans le cytoplasme des myoblastes C2C12 transfectés avec STIM1 WT ou muté en milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ajout de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  et de thapsigargine dans le milieu n'induit pas non plus d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules C2C12 exprimant STIM1 WT ou muté (figure 20).

Ainsi, j'ai étudié l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules HeLa non transfectées et transfectées avec STIM1 WT, D84G ou R304W. Le niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces cellules est mesuré dans un milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ajout de 2mM de  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne une entrée progressive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules non transfectées d'une amplitude de 0,1, et d'une amplitude de 0,2 dans les cellules HeLa exprimant STIM1 WT (figure 21). Dans les cellules transfectées avec STIM1 D84G, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  se fait également de manière progressive, mais avec une amplitude deux fois supérieure à celle observée dans les cellules exprimant STIM1 WT. En revanche, les cellules exprimant STIM1 R304W montrent une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  immédiate en réponse à l'ajout de 2mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu (figure 21). On peut également noter une diminution rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules qui expriment STIM1 R304W par rapport à celles qui expriment STIM1 WT ou

D84G. Toutefois, le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces cellules devient stable sans retrouver les valeurs basales.

Mes résultats montrent que la surexpression de STIM1 entraîne une entrée plus importante de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules suite à une augmentation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, et cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est plus accrue dans les cellules qui expriment STIM1 muté D84G ou R304W. Ceci suggère que les mutants de STIM1 activent de façon plus importante le SOCE avec des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  physiologiques.

#### Etude comparative du niveau basal de $\text{Ca}^{2+}$ cellulaire en fonction du milieu

Le niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans des cellules transfectées est un paramètre important pour évaluer l'impact de mutations STIM1 sur l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Afin de déterminer quel milieu permet d'obtenir une ligne de base stable et donc plus fiable, j'ai mesuré le niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans des cellules HeLa non transfectées dans un milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$  ou contenant une concentration physiologique de  $\text{Ca}^{2+}$ , c'est-à-dire à 2 mM. On observe que le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  mesuré dans le cytoplasme des cellules placées en milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$  augmente pendant les cinq premières minutes avant de diminuer et d'augmenter à nouveau (figure 22). En revanche, le niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  mesuré dans des cellules placées dans un milieu contenant 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  reste stable pendant les 24 minutes que dure le test. On remarque une augmentation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces cellules suite à l'ajout de vitamine D, preuve que ces cellules sont capables de réagir à un stimulus activant une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme.

Ces résultats permettent de considérer le milieu contenant 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  comme meilleur pour la mesure du  $\text{Ca}^{2+}$  basal dans les cellules, puisque très peu de variations du flux calcique sont détectées dans le cytoplasme des cellules placées dans ce milieu.



### 2.3.2.6. *Activation des voies dépendantes du Ca<sup>2+</sup> par STIM1 muté*

Les mutants de STIM1 activent plus fortement le SOCE que la protéine normale. De plus, les myoblastes de patients TAM présentent un taux basal de Ca<sup>2+</sup> supérieur à des myoblastes contrôles (Bohm, Chevessier et al. 2013). Une augmentation de Ca<sup>2+</sup> cytosolique active de nombreuses voies cellulaires, dont la voie du NFAT. Le NFAT (nuclear factor of activated T cells) est un facteur de transcription localisé dans le cytoplasme des cellules sous sa forme phosphorylée. Une augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> du cytoplasme entraîne une activation de la calcineurine qui va déphosphoryler le NFAT, permettant sa translocation dans le noyau des cellules. Ainsi, je me suis intéressée à la translocation du NFAT dans des cellules co-transfectées avec une construction eGFP-NFAT humain et les constructions mCherry-STIM1 WT ou muté.

#### Translocation du NFAT dans les cellules C2C12 et HeLa

Dans les myoblastes C2C12, on observe une localisation cytoplasmique du eGFP-NFATc2 qui reste la même suite à un traitement à la thapsigargine (figure 23). De même, les cellules transfectées avec STIM1 WT présentent un NFAT localisé dans le cytoplasme, et ce indépendamment du traitement à la thapsigargine (panels 1 et 2, figure 23). Les cellules transfectées avec STIM1 D84G ou R304W présentent de gros clusters de STIM1 mais aucune translocation du NFAT n'est observable. Ces résultats montrent que le traitement à la thapsigargine n'induit pas la translocation de cet isoforme du NFAT dans les cellules C2C12, malgré la vidange des stocks présumée par la formation de clusters de STIM1 WT. De plus, les mutants TAM et Stormorken de STIM1 n'induisent pas non plus la translocation de cet isoforme du NFAT, s'alignant ainsi probablement avec l'absence d'entrée de Ca<sup>2+</sup> mesurée au préalable dans ces cellules.

En l'absence de translocation de l'isoforme du NFAT utilisé dans les myoblastes C2C12 dans cette étude, j'ai étudié la translocation du NFAT dans les cellules HeLa transfectées avec

STIM1 WT ou muté. Dans les cellules HeLa, on observe une localisation majoritairement cytoplasmique du NFAT dans les cellules non transfectées ou transfectées avec du STIM1 WT (panels 1 et 3, figure 24A). Le signal du NFAT est localisé dans le noyau des cellules suite à un traitement à la caféine, qui induit une augmentation de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme des cellules HeLa, suivie d'une translocation du NFAT (panels 2 et 4, figure 24A). Contrairement aux cellules transfectées avec STIM1 WT, la majorité des cellules HeLa qui expriment STIM1 D84G ou R304W montrent une forte translocation du NFAT en absence de traitement à la caféine (figure 24B).

Le ratio des intensités du signal GFP nucléaire/cytoplasmique est inférieur à 1 dans les cellules transfectées avec STIM1 WT, il y a donc moins de NFAT nucléaire que cytoplasmique. Les cellules HeLa transfectées avec STIM1 WT et traitées à la caféine ont un ratio GFP nucléaire/cytoplasmique supérieur à 1 et 5 fois supérieur aux cellules non traitées, ce qui confirme la translocation du NFAT observée. Les cellules exprimant STIM1 D84G et R304W présentent des ratios GFP nucléaire/cytoplasmique de 11,7 et 6,8 respectivement (figure 24C). Ceci suggère que les mutants de STIM1 activent de façon plus considérable la translocation du NFAT dans les cellules HeLa.

Les cellules ont été classifiées en fonction de la localisation cytoplasmique ou nucléaire du NFAT et quantifiées de façon qualitative dans un premier temps. On note ainsi que le NFAT est localisé dans le noyau dans 20% des cellules HeLa transfectées avec STIM1 WT, et dans environ 70% de ces cellules lorsqu'elles sont traitées à la caféine (figure 24D). J'ai pu observer une localisation nucléaire du NFAT dans environ 60% des cellules qui expriment STIM1 muté D84G ou R304W. Dans un second temps, les cellules transfectées avec STIM1 WT ou muté ont été criblées, le ratio des intensités GFP nucléaire/cytoplasmique a été calculé et les cellules ont été classifiées en 2 catégories en fonction de la localisation du NFAT. Les cellules ont été considérées comme positives pour la translocation du NFAT lorsque ce ratio était supérieur à

1.5. On observe 40% de cellules HeLa transfectées avec STIM1 WT positives pour la translocation du NFAT, et un peu moins de 60% lorsque ces cellules sont traitées à la caféine (figure 24E). En revanche, environ 90% des cellules qui expriment STIM1 D84G ou R304W sont positives pour la translocation du NFAT.

Pris tous ensemble, ces résultats confirment dans un premier temps l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans les cellules HeLa transfectées avec STIM1 WT ou muté. J'ai également montré ici que les mutants de STIM1 entraînent une translocation accrue du NFAT dans le noyau des cellules HeLa par rapport à la protéine STIM1 WT.

## 2.4. Conclusion

Dans les myoblastes de patients TAM dans lesquels une augmentation de  $Ca^{2+}$  cytosolique a été mesurée dans des expériences précédentes, je n'ai pu identifier de différence avec les myoblastes contrôles en termes de clustering de STIM1 et de localisation des protéines ORAI1 et CASQ1. La seule différence notable reste une augmentation du niveau d'expression protéique de STIM1 dans les myoblastes de patients par rapport à des myoblastes contrôles.

J'ai montré dans des modèles de surexpression que les mutations TAM et Stormorken dans STIM1 impactent différentes étapes du SOCE. J'ai pu mettre en évidence une augmentation du niveau d'expression de la protéine STIM1 mutée par rapport à la protéine sauvage. Les mutants de STIM1 entraînent la formation constitutive de clusters, qui sont correctement localisés à proximité de la membrane plasmique, phénotype indépendant de la présence d'un tag. J'ai montré par des expériences de co-localisation que ces mutations ont un effet dominant négatif sur le clustering de la protéine normale, mais aussi sur celui de l'isoforme STIM1L. Mes résultats suggèrent également que les mutations dans *STIM1* entraînent une localisation plus

membranaire et un clustering de la protéine dans les myotubes, alors que la protéine WT est plus localisée en périphérie du noyau.

Concernant l'aptitude des mutations de *STIM1* à induire la formation des agrégats tubulaires, j'ai montré à la fois dans des cellules HeLa et dans des myoblastes C2C12 que ces mutations entraînent la formation d'empilements de membranes à proximité de la membrane plasmique et dans le cytoplasme des cellules.

Les mutants TAM et Stormorken de *STIM1* sont capables de recruter ORAI1 au niveau des clusters et semblent également séquestrer ce canal puisqu'on retrouve des co-clusters constitutifs de *STIM1* et d'ORAI1 indépendamment de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . J'ai montré que la surexpression de *STIM1* WT ou muté n'entraîne pas une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les myoblastes murins C2C12. A l'opposé, j'ai pu mettre en exergue une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules HeLa transfectées avec *STIM1* WT ou muté suite à l'ajout de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour finir, l'absence de translocation de l'isoforme du NFAT dans les cellules C2C12 transfectées avec *STIM1* WT ou muté semble confirmer l'absence d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  observée au cours des expériences de mesure de  $\text{Ca}^{2+}$  ou suggère que cet isoforme du NFAT n'est pas celui exprimé dans les myoblastes C2C12. A l'opposé, dans les cellules HeLa, j'ai observé une augmentation de la translocation du NFAT dans les cellules exprimant *STIM1* muté. Ceci confirme l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par les mutants de *STIM1* et par la suite l'activation des voies cellulaires dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3. Etude comparative des myoblastes C2C12 et des cellules HeLa comme modèle cellulaire d'étude de TAM et Syndrome de Stormorken

#### 3.1.Introduction

Mes travaux portent sur l'étude d'une maladie musculaire. Ainsi, mon premier choix de modèle cellulaire s'est porté sur les myoblastes. La lignée de myoblastes murins C2C12 est bien caractérisée et très utilisée dans le domaine. Néanmoins de façon intrigante, j'ai noté au cours de mes expériences une absence d'entrée de  $Ca^{2+}$  dans les myoblastes C2C12 par rapport à des cellules humaines HeLa. Cette absence de SOCE semble confirmée par des expériences de translocation du NFAT, une voie cellulaire activée suite à une augmentation du taux de  $Ca^{2+}$  cytosolique.

#### 3.2.But de l'étude

J'ai cherché à comprendre quel était le facteur limitant le SOCE dans les myoblastes murins C2C12.

#### 3.3.Résultats

##### *3.3.1. Mesure du niveau d'expression de la protéine ORAI1 dans les cellules*

Les cellules C2C12 transfectées avec STIM1 WT ou muté ne montrent aucune réponse suite à un ajout de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire contrairement aux cellules HeLa. ORAI1 étant un canal calcique directement impliqué dans le SOCE, j'ai dans un premier temps étudié son niveau d'expression protéique dans les cellules C2C12 par rapport aux cellules HeLa et à d'autres lignées de myoblastes. Les cellules HeLa expriment les isoformes ORAI1a et ORAI1b à des niveaux d'expression deux à trois fois supérieurs à ceux des autres cellules (figure 25).

Les myoblastes humains contrôles et de patients (D84G et L96V) expriment majoritairement l'isoforme ORAI1a, et plus faiblement ORAI1b. En revanche, on observe que les myoblastes murins C2C12 et les myoblastes de rat L6 woody expriment majoritairement l'isoforme ORAI1b et à peine l'isoforme ORAI1a. Cependant le taux d'expression d'ORAI1 total est similaire entre les différentes lignées de myoblastes humains et murins. Ces résultats montrent un niveau très faible de l'isoforme ORAI1a dans les lignées de myoblastes murins C2C12 et L6 woody, ce qui pourrait être à l'origine de l'absence d'entrée de  $Ca^{2+}$  observée dans les myoblastes murins C2C12.

### *3.3.2. Expression d'ORAI1 au cours de la différenciation en myotubes*

Les myoblastes étant des cellules musculaires non matures, je me suis par la suite interrogée sur l'expression de STIM1 et des isoformes d'ORAI1 au cours de la différenciation en myotubes. Pour cela, j'ai différencié en parallèle pendant 9 à 10 jours des myoblastes murins C2C12 et des myoblastes humains LHCNM2. Les niveaux d'expression protéique de STIM1 et d'ORAI1 ont été étudiés par western blot. Les protéines calséquestrine et desmine ont été utilisées afin de s'assurer de la différenciation en myotubes. En effet, ces protéines sont absentes dans les cellules au stade myoblastes et voient leur expression augmenter au cours de la différenciation musculaire.

Dans les myoblastes C2C12, le niveau d'expression de STIM1 augmente au cours de la différenciation en myotubes (figure 26A). On note également une apparition de la bande correspondant à la calséquestrine dès le cinquième jour de différenciation, avec une expression qui augmente au cours de la différenciation. En revanche, on observe que l'expression d'ORAI1b n'est pas modulée dans ces cellules, et que l'expression d'ORAI1a reste faible au cours de la différenciation en myotubes. Dans les myoblastes humains contrôles LHCNM2, on remarque une augmentation de l'expression de STIM1 entre le premier et le troisième jour de différenciation (figure 26B), puis une diminution progressive à partir du 4<sup>e</sup> jour. On note

l'apparition de la bande correspondant à la desmine dès le quatrième jour de différenciation. Les cellules LHCNM2 expriment majoritairement ORAI1a au cours de la différenciation en myotubes, et ni l'expression protéique d'ORAI1a ni celle d'ORAI1b ne semblent modulées pendant la période d'observation. Ces résultats montrent qu'ORAI1a n'est pas ou est très peu exprimé dans les myoblastes C2C12 au bout de 9 jours de différenciation.

### *3.3.3. Entrée de Ca<sup>2+</sup> dans des cellules C2C12 et HeLa exprimant ORAI1*

Afin de compléter cette étude, j'ai transfecté ORAI1 humain WT ou muté dans des cellules C2C12 et HeLa, puis mesuré le niveau de Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Dans les cellules C2C12 qui expriment ORAI1 WT ou portant la mutation V107M, l'ajout de 10 mM de Ca<sup>2+</sup> dans le milieu extracellulaire n'a pas d'effet significatif sur le niveau Ca<sup>2+</sup> cytosolique (figure 27). Dans les cellules HeLa, on n'observe pas d'augmentation significative de Ca<sup>2+</sup> cytosolique suite à l'ajout de 10 mM de Ca<sup>2+</sup> lorsque les cellules sont transfectées avec ORAI1 WT. En revanche, l'ajout de 10 mM de Ca<sup>2+</sup> au milieu extracellulaire entraîne une entrée majeure de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme des cellules transfectées avec ORAI1 V107M (figure 28). Mes résultats montrent que l'expression d'ORAI1 humain seul dans les myoblastes murins C2C12 ne permet pas de déclencher l'entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, même lorsqu'on exprime un mutant d'ORAI1 constamment perméable au Ca<sup>2+</sup>. Ces observations permettent de poser l'hypothèse selon laquelle STIM1 murin n'interagit pas avec la protéine ORAI1 humaine pour activer le SOCE ou qu'ORAI1 V107M nécessite d'autres co-facteurs pour une perméabilité constitutive.

### *3.3.4. Translocation du NFAT dans les cellules C2C12 ou HeLa exprimant ORAI1*

Afin d'étudier l'activation de la voie du NFAT, des cellules HeLa et C2C12 ont été co-transfectées avec des constructions NFATc1 et ORAI1 humain WT ou muté, et la localisation du NFAT a été étudiée. On observe une localisation cytoplasmique du NFAT dans les myoblastes murins C2C12 transfectés avec ORAI1 WT ou muté (panels 1 et 2, figure 29).

L'ajout de 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  au milieu extracellulaire n'entraîne pas de translocation nucléaire du NFAT dans les cellules C2C12 qui expriment le canal ORAI1 V107M, perméable au  $\text{Ca}^{2+}$  (panel 3, figure 29). Dans les cellules HeLa, le signal du NFAT est localisé dans le cytoplasme des cellules transfectées avec ORAI1 WT, avec un ratio d'intensité nucléaire/cytoplasmique inférieur à 1 (panel 1, figure 30). En revanche, les cellules HeLa qui expriment le canal ORAI1 perméable portant la mutation V107M montrent un signal de NFAT plus important dans le noyau, avec un ratio de 2,63 (panel 2, figure 30). Lorsqu'on surexprime un mutant d'ORAI1 qui entraîne la fermeture du canal (ORAI1 R91W), on observe une absence de translocation du NFAT dans le noyau des cellules (panel 3, figure 30), ce qui confirme que la translocation nucléaire du NFAT est directement proportionnelle à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via ORAI1.

Pris tous ensemble, mes résultats montrent que les myoblastes murins C2C12 n'expriment pas ou très peu l'isoforme ORAI1a, isoforme pourtant majoritaire dans les myoblastes humains et dans les cellules humaines HeLa. La surexpression d'ORAI1 humain dans les cellules HeLa ne permet pas de restaurer le SOCE, même lorsqu'il s'agit d'un mutant d'ORAI1 décrit pour rendre le canal perméable au  $\text{Ca}^{2+}$  indépendamment de la présence de STIM1. L'absence d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules C2C12 semble confirmée par une absence de translocation de l'isoforme NFATc1 dans le noyau des cellules en présence d'ORAI1 V107M.

### 3.4. Conclusion

L'absence d'influx calcique dans les myoblastes murins C2C12 surexprimant STIM1 humain WT ou muté m'a conduit à m'intéresser à l'expression du canal calcique ORAI1 dans ces cellules. J'ai ainsi mis en évidence l'absence ou du moins une réduction majeure de l'isoforme ORAI1a dans les myoblastes C2C12 par rapport à des lignées de myoblastes humains contrôles ou de patients TAM portant des mutations dans STIM1. Au cours de la différenciation en myotubes, l'expression d'ORAI1a n'est pas modulée dans les myoblastes humains LHCNM2 et murins C2C12. ORAI1a est absent ou peu exprimé dans les myotubes C2C12 au bout de 9



jours de différenciation. La surexpression d'ORAI1 humain WT ou muté dans les cellules C2C12 ne restaure pas l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces cellules, observation confirmée par l'absence de translocation du facteur de transcription NFAT. Pris tous ensemble, mes résultats suggèrent que STIM1 humain n'interagit pas avec ORAI1 murin et inversement. De façon plus importante, ces résultats suggèrent que les mécanismes du SOCE ne seraient pas identiques entre les cellules humaines et les cellules murines.

## 4. Physiopathologie de la myopathie à agrégats tubulaires : une étude *in vivo*

### 4.1. Introduction

Il n'y a à l'heure actuelle pas de mammifère comme modèle animal pour la myopathie à agrégats tubulaires. Pourtant il existe une souris portant la mutation D84G dans *STIM1* (souris *STIM1<sup>sax</sup>*), mutation retrouvée chez des patients atteints de TAM. En effet, cette souris générée par mutagenèse aléatoire présente un défaut d'activation des plaquettes sanguines et des saignements (Grosse, Braun et al. 2007), mais aucune caractérisation du phénotype musculaire n'a été rapportée jusque-là. L'homme et la souris possèdent 99% de gènes homologues, ce qui en fait un bon outil pour la compréhension des maladies génétiques humaines. De plus, la souris en tant que mammifère se pose comme un bon modèle pour l'étude des maladies musculaires. En effet, l'organisation et la structure du muscle squelettique humain et murin sont très similaires.

### 4.2. But de l'étude

Ce travail vise à introduire les mutations TAM de *STIM1* dans le muscle *tibialis anterior* (TA) de souris par l'utilisation d'adénovirus associés (AAV) et d'analyser l'impact de ces mutations sur la structure et la fonction du muscle.

## 4.3.Résultats

### 4.3.1. Expression d'ORAI1 et détermination de la concentration d'AAV à injecter

#### 4.3.1.1. Expression d'ORAI1 dans le muscle TA de souris

L'étude de l'expression d'ORAI1 dans des myoblastes et des myotubes murins C2C12 a révélé une expression très faible de l'isoforme ORAI1a et la présence majoritaire de l'isoforme ORAI1b, contrairement aux myoblastes et myotubes humains qui expriment majoritairement ORAI1a. Ainsi, je me suis intéressée à l'expression d'ORAI1 dans les muscles TA de souris âgées de 3 semaines, 6 semaines et 6 mois. Mes résultats de western blot montrent une expression d'ORAI1a dans tous les TA de souris, âgées de 3 semaines à 6 mois. On observe une augmentation de la taille de la bande correspondant à ORAI1a dans les TA de souris avec l'âge, ce qui suggère que l'expression d'ORAI1a est modulée au cours du temps dans les muscles TA de souris (figure 31).

#### 4.3.1.2. Détermination de la concentration d'AAV à injecter

Les mutations TAM retrouvées dans notre cohorte de patients sont des mutations hétérozygotes. Ainsi, dans un premier temps j'ai voulu déterminer la concentration d'AAV à injecter pour avoir un niveau d'expression de STIM1 muté similaire au niveau de STIM1 endogène dans des souris hétérozygotes pour STIM1. Trois concentrations d'AAV ont été utilisées :  $5 \times 10^{10}$  vg/ml,  $1 \times 10^{11}$  vg/ml, et  $5 \times 10^{11}$  vg/ml. Trois groupes de 3 souris âgées de 6 semaines ont été injectées dans le TA droit avec des AAV2/1 contenant STIM1 humain (figure 32A). Le TA contrôle latéral a été injecté avec une solution saline de chlorure de sodium (NaCl). Les souris ont été sacrifiées 4 semaines après injection, et le niveau d'expression de STIM1 analysé par western blot (figure 32B). Indépendamment de la concentration d'AAV utilisée, les TA droits de souris expriment fortement STIM1 par rapport aux TA injectés avec la solution saline (figure 32B), ce qui dénote d'une transduction efficace des AAV dans les muscles TA injectés. Les niveaux

de surexpression de STIM1 sont variables d'une souris à l'autre, même dans un groupe injecté avec la même concentration d'AAV. En moyenne, les TA injectés avec  $5 \times 10^{10}$  vg/ml,  $1 \times 10^{11}$  vg/ml et  $5 \times 10^{11}$  vg/ml surexpriment 15x, 20x et 38x plus de STIM1 que les TA contrôles injectés avec des AAV vides respectivement. Ceci traduit donc une corrélation entre la concentration d'AAV injectée et le niveau d'expression de STIM1 dans les TA.

Après m'être assurée de la surexpression de STIM1 dans les muscles injectés, j'ai étudié l'impact de la surexpression de STIM1 WT sur la structure du muscle par marquage hématoxyline et éosine (HE). Les fibres cellulaires présentent quelques noyaux centraux de façon localisée, aussi bien dans les TA injectés avec la solution saline qu'avec les AAV STIM1 (figure 32C). Ceci pourrait s'expliquer par des dommages mécaniques liés à l'introduction de l'aiguille. On observe aussi quelques zones d'infiltration dans les TA gauches et droits indépendamment de la concentration d'AAV injectée, ce qui suggère une légère inflammation. Ainsi, au vu des résultats obtenus par western blot et par marquage HE, j'ai décidé de retenir la plus petite concentration d'AAV de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml pour la suite de cette étude.

#### *4.3.2. Etude de l'impact des mutations dans STIM1 sur la structure et la fonction du muscle tibialis anterior (TA)*

Pour cette étude, différentes cohortes de souris ont été réalisées. Dans un premier temps, une cohorte de souris âgée de 6 semaines a été injectée dans le TA gauche avec une concentration de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml des AAV contenant STIM1 WT et dans le TA droit avec des AAV contenant STIM1 H109R. Les souris ont ensuite été sacrifiées à 4 et 6 mois, et la structure et la fonction du muscle TA ont été étudiées par marquage histologique et par mesure de force respectivement. Dans un second temps, une autre cohorte de souris a été injectée avec  $5 \times 10^{10}$  vg/ml d'AAV STIM1 WT ou D84G dans le TA gauche ou d'AAV vide dans le TA droit et les souris ont été sacrifiées à 6 mois. Pour finir, une dernière cohorte de souris âgées de 6 semaines a été injectée avec  $5 \times 10^{11}$  vg/ml d'AAV STIM1 WT ou D84G dans le TA gauche et une solution

de NaCl dans le TA droit. Les différentes cohortes de souris avec les temps de sacrifice et les expériences réalisées sont résumées dans la figure 33. Les agrégats tubulaires étant présents dans le muscle normal de souris âgées de 8 mois, j'ai choisi de sacrifier les cohortes de souris à 4 et 6 mois afin de déterminer l'aptitude de STIM1 muté à induire de façon précoce la formation des agrégats tubulaires.

#### 4.3.2.1. Impact de la mutation STIM1 H109R sur la physiologie des muscles

##### TA de souris âgées de 4 mois

##### Etude du niveau d'expression protéique

Dans un premier temps, j'ai analysé par western blot le niveau d'expression de STIM1 dans les TA de souris afin de vérifier l'efficacité de la transduction. Six souris sur 8 surexpriment STIM1 WT dans le TA gauche (souris 1, 2,3, 4, 6, et 8) et seulement deux souris sur huit surexpriment STIM1 H109R dans le TA droit (souris 5 et 7) (figure 34A). L'analyse quantitative de l'expression de STIM1 montre qu'un TA sur 2 par souris surexprime STIM1 (figure 34B) et que les TA qui surexpriment STIM1 ont une expression de 1,8 à 2 fois supérieure à celle du TA présentant la plus faible expression de STIM1 malgré l'injection d'AAV (figure 34C).

##### Impact de la surexpression de STIM1 WT ou muté sur la structure du muscle et localisation de STIM1 WT ou muté dans les TA de souris à 4 mois.

L'analyse de la structure des TA injectés avec STIM1 WT ou H109R par marquage HE ne révèle aucune altération de l'organisation ni de la structure des fibres musculaires. On distingue des fibres de petite et de grande taille, avec des noyaux majoritairement localisés en périphérie par marquage hématoxyline/éosine (panel HE, figure 35A). Les fibres musculaires ne présentent aucun agrégat rougeâtre à violacé à l'intérieur par marquage de Gomori, signe de l'absence d'agrégats tubulaires dans les TA injectés avec  $5 \times 10^{10}$  vg/ml d'AAV STIM1 WT ou H109R dans les TA de souris âgées de 4 mois (panel Gomori, figure 35A). On observe cependant que certaines fibres ont un marquage violacé à la périphérie à proximité des

membranes et présentent de nombreuses petites tâches violacées à l'intérieur. Ces tâches sont retrouvées majoritairement autour des fibres de petite taille et pourraient éventuellement marquer le début des agrégats tubulaires. Il est intéressant de noter que ces tâches violacées sont retrouvées aussi bien dans les TA qui surexpriment STIM1 WT que dans ceux qui surexpriment STIM1 H109R.

J'ai ensuite étudié par immunohistochimie la localisation de STIM1 WT et muté H109R dans les muscles TA de souris en coupes transversales (figure 35B). Un TA de souris âgée de 4 mois et non injecté avec des AAV a été utilisé comme contrôle afin de définir la localisation de STIM1 endogène. Dans le TA contrôle, on observe un signal de STIM1 au niveau des membranes des fibres musculaires, mais également des petits dots de STIM1 à l'intérieur des fibres musculaires. Le signal membranaire de STIM1 n'est pas spécifique, puisqu'il est également retrouvé dans le contrôle négatif marqué avec l'anticorps secondaire seul, qui est un anticorps anti-souris. Ainsi, cette comparaison se limitera au signal de STIM1 à l'intérieur des fibres musculaires. Dans les muscles TA injectés avec STIM1 WT, on observe un signal de STIM1 à l'intérieur de certaines fibres musculaires, mais pas de toutes. Ceci est généralement dû au fait que toutes les fibres musculaires ne sont pas transduites par les AAV. La localisation de STIM1 est similaire dans les fibres musculaires transduites avec STIM1 WT et STIM1 H109R. Ces résultats suggèrent que la surexpression de STIM1 WT ou muté n'altère pas la localisation de la protéine à l'intérieur des fibres musculaires de souris à 4 mois.

#### Effet de l'expression de STIM1 muté sur la fonction du muscle TA

Afin d'étudier l'impact de la surexpression de STIM1 muté sur la fonction du muscle, la force absolue des TA de souris injectés avec STIM1 WT ou muté a été mesurée. La force spécifique a par la suite été déterminée en faisant un rapport de la force absolue sur le poids du TA correspondant. La force spécifique moyenne obtenue pour les 5 TA de souris surexprimant STIM1 WT est comparée à la force spécifique du TA droit de souris surexprimant STIM1 muté.

On observe une diminution non significative de la force spécifique du TA de souris surexprimant STIM1 H109R par rapport aux TA qui surexpriment STIM1 WT. En absence de TA contrôle injecté avec des AAV vides, la force spécifique des TA de souris injectés avec STIM1 WT a été comparée à celles de souris du même âge, réalisée avec l'aide du même expérimentateur (Cowling, Chevremont et al. 2014) dans un autre fond génétique (129 Pas). On remarque que les TA de souris WT 129 Pas de 4 mois (16 wk) ont une force spécifique de 23 mN/mg tandis que les TA des souris injectés avec STIM1 WT ont une force spécifique de 10 mN/mg. Ces observations suggèrent une diminution de la force spécifique des TA de souris injectés avec STIM1 WT ou H109R par rapport à la force spécifique des TA de souris du même âge (figure 36A).

Nous avons également mesuré le temps que met le TA à se fatiguer suite à une stimulation continue. Les TA de souris injectés avec STIM1 WT ou H109R mettent entre 7 et 10 secondes à se fatiguer, ce qui est comparable au temps de fatigue mesuré dans les TA de souris 129 Pas à 4 mois (figure 36B). Ainsi, l'injection de STIM1 WT ou muté H109R ne semble pas avoir d'effet sur la fatigue musculaire des TA.

Pris tous ensemble, ces résultats suggèrent que l'injection de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml d'AAV contenant STIM1 WT ou muté n'induit pas la formation d'agrégats tubulaires et n'altère pas la structure des muscles TA de souris âgées de 4 mois et injectées à 6 semaines. En ce qui concerne la fonction musculaire, ils suggèrent une diminution de la force spécifique des TA de souris injectés avec STIM1 WT ou H109R, mais pas de différence dans le temps que met le muscle à se fatiguer suite à un stimulus téanique.

#### 4.3.2.2. Impact de la mutation H109R sur le muscle TA de souris âgées de 6 mois

##### Niveau d'expression protéique de STIM1

Afin de vérifier la transduction des TA de souris par les AAV STIM1 WT ou H109R dans le groupe de souris âgées de 6 mois, le niveau d'expression de STIM1 a été analysé par western blot. Toutes les souris surexpriment STIM1 WT dans le TA gauche, mais l'expression de STIM1 H109R dans les TA droits reste beaucoup plus faible. Il est impossible de comparer cette expression au niveau d'expression endogène, en l'absence de TA contrôle injecté avec des AAV vides (figure 37A). L'analyse quantitative montre que le niveau d'expression de STIM1 dans les TA injectés avec STIM1 H109R est de moitié plus faible que le niveau d'expression de STIM1 dans les TA injectés avec STIM1 WT. Ces résultats suggèrent que STIM1 H109R est quand même exprimé dans les TA, mais à des niveaux beaucoup plus faibles que STIM1 WT. En effet, j'ai trouvé ultérieurement une expression de STIM1 15x supérieure au niveau endogène avec cette concentration d'AAV, bien qu'étant à 4 semaines post-injection dans l'expérience précédente par rapport à 4 mois post-injection dans ce cas.

##### Impact de la mutation STIM1 H109R sur la formation des agrégats tubulaires *in vivo*

Afin d'étudier la capacité de la mutation STIM1 H109R à induire la formation d'agrégats tubulaires *in vivo*, les TA de souris injectés à 6 semaines et âgées de 6 mois ont été marqués par coloration de Gomori trichrome. On observe la présence de nombreux agrégats violacés signalés par des flèches dans les TA gauches injectés avec STIM1 WT (panel AAV STIM1 WT, figure 37B). Ceci suggère que la surexpression de STIM1 WT induit la formation d'agrégats tubulaires à 6 mois dans le TA de souris. En revanche, les muscles injectés avec STIM1 H109R ne présentent aucun agrégat rouge. On note toutefois la présence de tâches violacées autour de certaines fibres musculaires (panel AAV STIM1 H109R, figure 37B). Ces résultats suggèrent que les faibles niveaux de surexpression de STIM1 H109R ne sont pas suffisants pour induire la formation d'agrégats tubulaires dans le TA de souris à 6 mois.



Des coupes longitudinales des TA ont été étudiées par microscopie électronique. Aucune structure semblable à des agrégats tubulaires n'a pu être mise en évidence dans aucun des TA injectés avec STIM1 WT ou H109R à 6 mois par microscopie électronique (figure 38). Les muscles injectés montrent des sarcomères bien organisés avec des lignes Z alignées, et des mitochondries correctement localisées, ce qui suggère que la structure des muscles TA n'est pas endommagée par la surexpression de STIM1 WT ou H109R.

Tous ensemble, ces résultats suggèrent que la surexpression de STIM1 WT induit la formation d'agrégats tubulaires dans le TA de souris à l'âge de 6 mois visibles par coloration de Gomori mais pas observables en microscopie électronique. L'expression de STIM1 muté à de faibles niveaux ne suffit pas à induire la formation d'agrégats tubulaires dans les muscles TA de souris à 6 mois.

#### 4.3.2.3. Impact de la surexpression de STIM1 D84G dans les TA de souris

##### Impact de la surexpression de STIM1 D84G dans les TA de souris âgées de 6 mois

Dans les expériences précédentes, l'absence d'un TA contrôle latéral non injecté avec STIM1 rend difficile l'attribution de la formation des agrégats tubulaires à un effet dominant négatif causé par la surexpression de STIM1. Ainsi, j'ai réalisé une 3<sup>e</sup> cohorte de souris injectées à 6 semaines avec une concentration de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml d'AAV STIM1 WT ou D84G dans le TA gauche et avec des AAV vides dans le TA contrôle latéral. Les souris ont ensuite été sacrifiées à 6 mois et l'expression de STIM1 et la structure des muscles TA ont été étudiées.

L'analyse de l'expression de STIM1 montre que les TA de souris de 6 mois injectées avec STIM1 WT expriment de façon significative environ 2,4x plus STIM1 que les TA contrôles injectés avec des AAV vides ou les TA injectés avec STIM1 D84G (figure 39). Les TA injectés avec STIM1 D84G ont un niveau d'expression de STIM1 similaire au niveau endogène, ce qui reflète un problème d'injection ou un problème d'efficacité de transduction.

L'analyse histologique des coupes transversales des muscles TA injectés avec des AAV vides, contenant STIM1 WT ou D84G montre quelques infiltrations dans tous les TA indépendamment du contenu des AAV, ce qui suggère que l'inflammation ici est due à l'introduction de l'aiguille et aux AAV, plus qu'à la surexpression de STIM1 (figure 40, panel HE). La coloration de Gomori n'a pas révélé d'agrégats rouges dans les TA injectés avec les AAV vides ou avec STIM1 WT. En revanche, les coupes transversales de TA injectés avec STIM1 WT montrent quelques agrégats rouges par coloration Gomori dans quelques fibres musculaires (figure 40, panel Gomori). Ces résultats suggèrent que la surexpression de STIM1 WT a un effet dominant négatif sur la production des agrégats tubulaires *in vivo* dans les TA de souris, et confirment les résultats précédemment obtenus à 4 mois. STIM1 D84G n'est pas surexprimé dans les TA injectés, ce qui limite l'étude de l'impact de cette mutation sur la structure des muscles TA *in vivo*.

#### 4.3.2.4. Impact de la surexpression de STIM1 D84G sur la structure des muscles TA à 10 semaines

L'utilisation de la concentration  $5 \times 10^{10}$  vg/ml n'a pas permis d'obtenir une surexpression des mutants de STIM1 dans les TA de souris. De plus, j'ai observé des agrégats tubulaires en surexprimant STIM1 WT dans les TA de souris âgées de 6 mois. Ainsi, pour la suite de cette étude, j'ai injecté une 4<sup>e</sup> cohorte de souris avec des AAV contenant STIM1 WT ou D84G dans le TA gauche et avec une solution saline de NaCl dans le TA contrôle latéral.

L'analyse du niveau d'expression protéique montre que les TA de souris injectés avec STIM1 WT ou muté expriment de façon significative environ 1,5x plus de STIM1 que les TA contrôles injectés avec la solution saline (figure 41).

Les résultats de la coloration HE ne montrent pas de différence dans la structure des TA injectés avec STIM1 WT ou D84G ou avec la solution saline (panel HE, figure 42). On observe une

alternance de fibres de petite et de grande taille, avec des noyaux en périphérie. Quelques noyaux centraux sont observés de façon localisée dans les TA indépendamment de l'injection, et seraient dû à l'introduction de l'aiguille. La coloration de Gomori ne révèle aucune anomalie et pas d'agrégat rouge dans les fibres musculaires des TA injectés avec STIM1 WT, muté ou avec la solution saline (panel Gomori, figure 42). Ainsi, ces résultats montrent qu'une surexpression de STIM1 WT ou D84G ne suffit pas à induire la formation d'agrégats tubulaires de façon précoce dans les muscles TA de souris âgées de 10 semaines.

#### 4.4. Conclusion

Cette partie de mon étude a porté sur l'analyse de l'impact des mutations TAM H109R et D84G de STIM1 sur la structure et la fonction des muscles TA de souris. J'ai montré que la surexpression de STIM1 WT à partir d'une concentration d'AAV de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml ne suffit pas à induire précocement la formation d'agrégats tubulaires *in vivo* dans les TA de souris à 4 mois. En revanche, les TA de souris qui surexpriment STIM1 WT à 6 mois présentent des agrégats tubulaires par coloration de Gomori trichrome. Ceci suggère que la surexpression de STIM1 WT pourrait avoir un effet dominant négatif sur la formation des agrégats tubulaires *in vivo* chez les souris à 6 mois. Ces résultats suggèrent aussi que l'expression endogène de STIM1 doit être finement régulée. Aucun TA du groupe de souris âgées de 6 mois n'avait un fort niveau d'expression de STIM1 H109R permettant de confirmer l'efficacité de la transduction. L'on pourrait spéculer sur le fait que ces bas niveaux d'expression de STIM1 muté expliqueraient l'absence d'agrégats tubulaires observée dans les TA de souris injectées avec STIM1 H109R. J'ai également montré que la surexpression de STIM1 WT ou D84G en utilisant une concentration de  $5 \times 10^{11}$  vg/ml n'est pas suffisante pour induire la formation d'agrégats tubulaires dans les TA de souris à 10 semaines. Pris tous ensemble, mes résultats montrent que

la surexpression de STIM1 WT induit la formation des agrégats tubulaires dans les TA de souris à 6 mois.

# Discussion & Perspectives

La myopathie à agrégats tubulaires (TAM) est une maladie musculaire progressive qui se caractérise au niveau clinique par des symptômes hétérogènes parmi lesquels une faiblesse musculaire, des myalgies et des crampes. La principale et seule caractéristique histologique commune aux patients TAM est la présence d'agrégats tubulaires dans les biopsies de muscle squelettique. Les agrégats tubulaires sont des empilements de membranes simples ou doubles semblables à des nids d'abeilles. Ces structures ne sont pas spécifiques à la TAM et sont également retrouvées dans le muscle de personnes et de souris âgées (Chevessier, Marty et al. 2004, Chevessier, Bauche-Godard et al. 2005), ainsi que dans certains cas de myopathies induites par l'alcool ou les médicaments par exemple (Chui, Neustein et al. 1975, del Villar Negro, Merino Angulo et al. 1982). Le premier gène identifié comme muté dans la TAM est *STIM1* (Bohm, Chevessier et al. 2013). Cependant, certains patients TAM n'avaient pas encore été séquencés pour *STIM1* et chez de nombreux autres aucune mutation dans ce gène n'avait pu être identifiée. D'autre part, bien que l'origine réticulaire des agrégats tubulaires soit largement acceptée dans le domaine, leur pathogénicité reste encore à déterminer. Ainsi, le but de mon projet de thèse était de contribuer à identifier de nouvelles mutations chez des patients atteints de TAM. Mais plus particulièrement, ce projet a visé dans sa majeure partie à apporter une lumière sur les mécanismes physiopathologiques qui conduisent à la TAM suite aux mutations dans le gène *STIM1*.

## 1. Identification de la variation STIM1 P165L

C'est en 2013 que Böhm *et al* ont identifié *STIM1* comme le premier gène muté dans la TAM. De plus, plusieurs équipes ont décrits des mutations dans *ORAI1*, un gène codant un des canaux calciques localisés à la membrane plasmique et activé par STIM1 (Nesin, Wiley et al. 2014, Endo, Noguchi et al. 2015). Ainsi, en collaboration avec des cliniciens, j'ai procédé dans ce projet au séquençage de *STIM1* et *ORAI1* à partir d'ADN génomique de 4 patients TAM. Mes résultats de séquençage ont révélé et confirmé la présence d'une variation c.494C>T (p.P165L) dans l'exon 4 de *STIM1* chez le patient TR TED. Cette variation a été estimée fortement pathogénique par Polyphen-2 avec un score de 0.995, et délétère par Provean et SIFT. Néanmoins les expériences de clustering de la protéine réalisées dans des myoblastes murins C2C12 n'ont montré aucune différence entre la protéine STIM1 portant la mutation P165L et la protéine STIM1 sauvage. En effet, STIM1 P165L présente un aspect diffus et homogène similaire à la protéine WT dans les cellules C2C12 transfectées. Les mutations dans STIM1 précédemment décrites jusque-là pour causer la TAM conduisent à un clustering constitutif de STIM1 (Bohm, Chevessier et al. 2013, Bohm, Chevessier et al. 2014). Ainsi, l'absence de clustering constitutif de STIM1 P165L suggère que cette mutation n'a pas le même impact que les autres mutations TAM décrites, du moins pour l'analyse de clustering. Cette différence pourrait être due aux domaines de localisation des mutations. En effet, les mutations TAM publiées par sont toutes localisées dans le domaine EF-hand de STIM1, domaine directement impliqué dans la liaison du Ca<sup>2+</sup> (Bohm, Chevessier et al. 2013, Bohm, Chevessier et al. 2014). Ainsi, ces mutations changeraient l'aptitude de STIM1 à lier le Ca<sup>2+</sup>, entraînant ainsi le clustering constitutif de la protéine. D'autre part, la mutation Stormorken STIM1 R304W est quant à elle localisée dans le domaine CC1 de STIM1, et entrainerait un dépliement de STIM1 et ainsi un clustering constitutif de la protéine. La variation de STIM1 P165L identifiée est pour sa part localisée dans le domaine SAM de STIM1. Ce domaine interagit avec le domaine EF-

hand pour permettre le repliement de STIM1 (Stathopoulos, Li et al. 2006). Il est donc probable que cette variation n'affecte pas directement la liaison au  $Ca^{2+}$  et de ce fait, elle n'aurait pas d'effet sur le clustering. Toutefois, en l'absence d'accès aux données et à l'ADN d'autres membres de la famille du patient TR TED, l'on ne peut que spéculer sur la pathogénicité de la variation P165L de STIM1 identifiée. L'accès à ces informations permettrait d'étudier la ségrégation de cette mutation au sein de la famille et donc potentiellement de la valider d'un point de vue génétique. Des expériences supplémentaires sont encore à réaliser afin d'écartier l'implication éventuelle de cette variation dans la TAM. L'on pourrait étudier l'impact de cette mutation sur l'expression protéique de STIM1 ou encore sur l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans des cellules transfectées afin d'analyser son impact potentiel sur le SOCE. En effet, une autre mutation impliquant le même acide aminé (p.P165Q) a été rapportée par Schaballie *et al* (Schaballie, Rodriguez et al. 2015). Cette mutation a été identifiée à l'état homozygote chez des patients atteints de déficience immunitaire avec une myopathie non progressive. Elle conduit à une diminution de l'expression protéique de STIM1, mais aucune donnée concernant le clustering n'a été évoquée. L'existence de cette mutation confirme qu'une variation de la proline 165 est mal tolérée et conduit à des troubles de l'homéostasie calcique. Cependant la proline (P) et la leucine (L) sont 2 acides aminés polaires alors que la glutamine (Q) est un acide aminé polaire. Cette différence pourrait avoir un impact sur le repliement de la protéine et expliquerait la différence entre la variation que j'ai identifiée, et celle rapportée par Schaballie *et al*. D'une autre part, cela pourrait suggérer que la variation P165L identifiée chez le patient TR TED pourrait être impliquée dans une immunodéficience sévère associée à une myopathie. Il conviendrait de mesurer le courant calcique ou le SOCE dans des cellules KO pour *STIM1* et transfectées avec une construction *STIM1* P165L. Un courant calcique de plus faible intensité ou absent par rapport à celui mesuré dans des cellules KO *STIM1* et transfectées avec *STIM1* WT confirmerait l'implication de cette mutation dans cette maladie.



En ce qui concerne les 3 autres patients, aucune variation ni mutation n'a été identifiée dans les exons de *STIM1* et *ORAI1* séquencés. Plusieurs raisons pourraient expliquer nos résultats. Les mutations à l'origine de la TAM pourraient être localisées dans des régions introniques, et ne seraient donc pas détectées suite à un séquençage d'exons. Toutefois, les mutations introniques sont généralement associées à des pertes de fonction et ne sont de ce fait pas attendues pour les patients atteints de TAM. Les myopathies congénitales sont généralement hétérogènes et de nombreuses autres protéines jouant un rôle dans le SOCE pourraient être mutées dans la TAM. Il conviendrait donc de séquencer les exomes ou les génomes des patients TAM en vue d'identifier la ou les mutations à l'origine de la maladie.

En conclusion, j'ai identifié une nouvelle variation dans le domaine SAM de *STIM1* chez un patient atteint de TAM. Cependant le manque de données et l'absence d'accès à l'ADN d'individus de la famille du patient limitent l'étude de la ségrégation de la mutation et sa validation. Le clustering de *STIM1* P165L est similaire à celui de la protéine WT, néanmoins, des expériences supplémentaires à d'autres étapes du SOCE et relatives à l'expression de la protéine sont encore à réaliser afin d'étudier son potentiel pathogénique.

## 2. Impact des mutations TAM et Stormorken de STIM1 sur le SOCE et la formation des agrégats tubulaires

### 2.1. Surexpression de STIM1 dans les myoblastes de patients TAM

A l'inverse des résultats publiés par Böhm *et al* (Bohm, Chevessier et al. 2013) qui concluaient à une expression protéique similaire de STIM1 dans des myoblastes contrôles par rapport à des myoblastes de patients TAM, mes résultats montrent pour la première fois que les myoblastes de patients TAM ont une expression protéique endogène de STIM1 supérieure à celle de myoblastes contrôles. Cette augmentation du niveau d'expression protéique de STIM1 a également été retrouvée dans des cellules transfectées avec STIM1 muté D84G ou R304W par rapport à la protéine sauvage. Toutefois, il est important de préciser que les différences d'âges lors de la biopsie entre les individus dont proviennent les myoblastes contrôles ou de patients, ainsi que les différences de protocole en fonction des lieux où sont établies les lignées sont autant de facteurs pouvant influencer le niveau d'expression protéique analysé. Dans cette étude, les lignées de myoblastes CHQ25, KM49C19VE (contrôles) et 106441 (L96V) proviennent toutes 3 d'individus jeunes âgés respectivement de 5, 19 et 13 ans. La lignée 7156 (D84G) quant à elle a été établie à partir d'une biopsie d'un patient âgé de 45 ans. Mais malgré la différence d'âge entre les patients dont sont issues les 2 lignées de myoblastes TAM, j'ai retrouvé une surexpression similaire de STIM1 dans les myoblastes de ces patients par rapport à des myoblastes contrôles. Plusieurs études ont montré une augmentation du SOCE en réponse à une surexpression de STIM1 (Liou, Kim et al. 2005, Peinelt, Vig et al. 2006). Celle de Phuong *et al* (Phuong, Yun et al. 2013) notamment a rapporté un rétrocontrôle positif entre l'activation du SOCE et la surexpression de STIM1. En effet, lorsqu'on surexprime STIM1 dans des myoblastes, on observe une augmentation du SOCE, et de la même façon une augmentation du SOCE conduit à une augmentation de l'expression de STIM1. Böhm *et al* (2013) ont montré

une augmentation du SOCE dans les lignées de myoblastes de patients présentées dans cette étude. Ce SOCE accru pourrait donc justifier de l'augmentation de l'expression protéique de STIM1 dans les myoblastes de patients, et vice-versa.

## 2.2. Clustering constitutif des mutants TAM et Stormorken de STIM1

### 2.2.1. Localisation de STIM1 dans les myoblastes et myotubes

Il est largement connu que STIM1 WT a un aspect diffus dans les cellules, et forme des clusters suite à une vidange des stocks calciques du RE ou du RS. Böhm *et al* ont montré que les mutations retrouvées dans le domaine EF-hand de STIM1 ont le même impact que la mutation artificielle D76A sur le clustering de STIM1. En effet, toutes ces mutations conduisent à un clustering constitutif d'YFP-STIM1 (Liou, Kim *et al.* 2005, Huang, Zeng *et al.* 2006, Hewavitharana, Deng *et al.* 2008, Bohm, Chevessier *et al.* 2013). Mes résultats montrent que le phénotype de clustering constitutif des mutants TAM et Stormorken de STIM1 est indépendant de la présence d'un tag. En effet, les cellules transfectées avec les constructions YFP, mCherry ou sans tag de STIM1 D84G ou R304W présentent des clusters de STIM1 indépendamment de la vidange des stocks calciques. Les résultats obtenus par TIRF ont permis de montrer que les clusters formés par STIM1 D84G et R304W sont localisés à proximité de la membrane plasmique, tels que montré au préalable par Liou *et al* (2005) et Hewavitharana *et al* (2008) pour le mutant artificiel STIM1D76A. De plus, j'ai pu montrer que l'ajout de thapsigargine entraîne une augmentation de l'intensité du signal des clusters de STIM1 muté à proximité de la membrane plasmique. Cette étude ne permet pas de conclure sur une augmentation de la taille des clusters. Toutefois, l'augmentation du signal des clusters de STIM1 muté suggère que les clusters de STIM1 ne sont pas totalement localisés à la membrane plasmique, ou que STIM1 muté ne forme pas entièrement des clusters dans les cellules.

Contrairement aux résultats obtenus dans les cellules transfectées, le signal de STIM1 est diffus dans les myoblastes de patients TAM D84G et L96V, à l'exemple de celui observé dans les myoblastes contrôles. Ainsi, en l'absence de résultats concluants dans les myoblastes, je me suis intéressée à la localisation de STIM1 dans les myotubes issus de la différenciation de myoblastes de patients. Néanmoins, le signal de STIM1 observé dans les myotubes TAM est similaire au signal observé dans les myotubes contrôles. Cette absence de différence pourrait s'expliquer par le fait que les clusters observés en surexpression seraient beaucoup plus gros et donc plus facilement visibles et identifiables par rapport à des clusters formés de façon endogène. D'autre part, l'absence d'anticorps anti-STIM1 convenable pour l'étude de la localisation endogène de STIM1, tel que déjà mentionné par Smyth *et al* (Smyth, DeHaven et al. 2007) empêche de tirer une conclusion quant à la localisation endogène de STIM1 dans les myoblastes de patients. Ainsi, j'ai initié la production d'un anticorps polyclonal anti-STIM1 qui reconnaîtrait STIM1 humain et murin. En ce qui concerne la localisation de STIM1 endogène dans les myotubes, l'absence de fusion des myoblastes de patients rend difficile une comparaison fiable avec les myotubes contrôles qui à l'inverse sont très bien différenciés. En effet, j'ai pu observer un allongement des myoblastes issus de lignées de patients TAM au cours de la différenciation, mais j'ai noté une absence de fusion au bout de 12 jours de différenciation. Il est cependant peu probable que ce délai/défaut de fusion des myoblastes contrôles soit un phénotype de la maladie. Un défaut de fusion des myoblastes conduirait à un phénotype musculaire plus sévère chez les patients TAM tels que rapportés dans des modèles dystrophiques ou dans un modèle de souris invalidé pour Myomaker (Millay, O'Rourke et al. 2013)(Wu, 2013 : <http://www.slideshare.net/mpwu/defense-17473128> ). D'autre part Garibaldi *et al* (Garibaldi, Fattori et al. 2016) ont rapporté un cas de TAM lié à la mutation ORAI1 S97C et pour lequel la physiopathologie a été étudiée dans des myotubes différenciés à partir de myoblastes de patients. Ceci suggère que le délai de fusion observé avec les myoblastes de

patients en ma possession n'est pas un phénotype de la TAM, mais serait peut-être dû à des différences de protocole de différenciation.

Face aux limites posées par les cellules de patients, j'ai étudié la localisation de STIM1 WT ou muté dans des myotubes obtenus à partir de myoblastes transfectés et différenciés. A l'instar de Darbellay *et al* et Lee *et al* (Darbellay, Arnaudeau et al. 2010, Lee, Woo et al. 2013), j'ai montré qu'aussi bien STIM1 WT que les mutants EF-hands de STIM1 actifs de façon constitutive forment des dots dans le cytoplasme des myotubes au bout de 5 jours de différenciation. Ces dots sont plus petits que les clusters habituellement observés dans les myoblastes murins transfectés avec STIM1 muté. Mes résultats suggèrent donc une activation de STIM1 au cours de la différenciation en myotubes. Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Stiber *et al* (Stiber, Hawkins et al. 2008) qui ont montré un SOCE plus important dans les myotubes transfectés avec STIM1 WT ou D76A par rapport à des myotubes qui expriment STIM1 de façon endogène, ou dans lesquels l'expression de STIM1 a été diminuée par utilisation de shRNA. J'ai également observé que le signal de STIM1 WT est plus important autour des noyaux cellulaires dans des myotubes de 12 jours, alors que STIM1 D84G semble localisé majoritairement près de la membrane plasmique. Ceci suggère que STIM1 muté serait également constitutivement actif dans les myotubes. Il serait intéressant d'étudier la localisation des clusters de STIM1 muté dans les myotubes par TIRF, mais également en présence d'ORAI1. D'autre part, il conviendrait de mesurer l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans les myotubes exprimant STIM1 WT, D84G ou R304W à 5 et à 12 jours de différenciation.

### *2.2.2. Effet dominant négatif de STIM1 D84G ou R304W sur le clustering de STIM1 et STIM1L*

Mes travaux ont permis de montrer pour la première fois que les mutations TAM et Stormorken de STIM1 conduisent à un effet dominant négatif de la protéine mutée sur le clustering de la protéine WT. En effet, j'ai pu observer un co-clustering de STIM1 WT en présence de STIM1

muté. L'analyse de la distribution des signaux de STIM1 WT et muté sur l'épaisseur des cellules transfectées en Z montre que le recrutement de STIM1 WT aux clusters formés par STIM1 muté est partiel. En effet, alors que STIM1 muté forme presque entièrement des clusters localisés au niveau des points d'adhérence, STIM1 WT se retrouve aux clusters de STIM1 muté, mais aussi diffus en profondeur. L'on pourrait spéculer sur le fait que le flux permanent de  $Ca^{2+}$  dans les cellules serait à l'origine de cet état diffus de STIM1 WT. Ainsi, STIM1 WT pourrait être recruté aux clusters formés majoritairement par STIM1 muté. La formation des clusters de STIM1 majoritairement du côté où l'adhésion se fait suggère une potentielle interaction entre STIM1 et l'actine pour la localisation des clusters. En effet, STIM1 possède un domaine ERM, domaine permettant de lier l'actine à la membrane plasmique (Huang, Zeng et al. 2006).

STIM1L est un isoforme de STIM1 exprimé de façon spécifique dans le muscle de l'homme et de souris (Darbellay, Arnaudeau et al. 2011). Cette protéine forme des petits clusters permanents et entraîne une entrée robuste de  $Ca^{2+}$  lorsqu'elle lie et active ORAI1 (Sauc, Bulla et al. 2015). Ces pré-clusters de STIM1 colocalisent ou non avec ORAI1 indépendamment de la vidange des stocks calciques (Edwards, Neeb et al. 2010, Sauc, Bulla et al. 2015). Ainsi, j'ai étudié l'impact des mutations dans STIM1L sur le clustering de cet isoforme long et observé une similitude de motifs entre STIM1L WT et STIM1 muté dans les myoblastes murins co-transfectés avec les deux protéines. Mes résultats suggèrent que les mutants de STIM1 sont capables de recruter non seulement STIM1, mais aussi STIM1L au niveau des clusters. Au vu de la spécificité musculaire de STIM1L, l'on peut imaginer que les mutations TAM et Stormorken qui activent de façon constitutive le SOCE affectent plus sévèrement le muscle. Afin de confirmer ces résultats préliminaires, il conviendrait d'étudier par microscopie confocale et TIRF la localisation de STIM1L WT en présence de STIM1 muté D84G ou R304W. De plus, STIM1L ne forme pas de gros clusters comme STIM1, même en cas de déplétion calcique et est très peu recruté aux clusters à la jonction RE-MP (Sauc, Bulla et al.

2015). On pourrait donc étudier l'impact des mutations TAM et Stormorken sur la localisation de STIM1L par TIRF en introduisant ces mutations dans la séquence de STIM1L. On pourrait également comparer l'impact des mutations TAM dans STIM1 et STIM1L sur l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules transfectées.

### *2.2.3. Implication du cytosquelette d'actine dans le SOCE*

La localisation et les mouvements des protéines intracellulaires sont généralement dirigés par les protéines du cytosquelette, principalement constituées des réseaux d'actine et de microtubules. Ainsi, de nombreuses études ont cherché à comprendre le rôle du cytosquelette d'actine et de microtubules dans le SOCE. Certaines études ont présumé que ni le réseau d'actine ni les microtubules ne jouent un rôle dans le SOCE, en absence de modification de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à des traitements avec des drogues qui modulent la polymérisation des filaments d'actine ou des microtubules dans différents types cellulaires (Ribeiro, Reece et al. 1997, Patterson, van Rossum et al. 1999, Bakowski, Glitsch et al. 2001). D'un autre côté, de nombreux autres travaux ont montré l'implication du cytosquelette d'actine et de microtubules sur le SOCE (Rosado *et al*, 2000 ; Smyth *et al*, 2007 ; Galan *et al*, 2011). Par exemple, Smyth *et al* (Smyth, DeHaven et al. 2007) ont montré que bien que les microtubules interviennent dans la localisation de STIM1 et aident à la localisation des clusters, ils n'interviennent pas dans la formation et le maintien des clusters. De toutes ces études, il ressort que le cytosquelette d'actine ou les microtubules jouent ou non un rôle dans le SOCE en fonction des types cellulaires et de l'importance de ce réseau dans la structure des cellules. Dans cette étude, je me suis également intéressée au rôle de l'actine dans la localisation et le maintien des clusters de STIM1 dans les myoblastes C2C12. Au repos, STIM1 WT a un aspect fibrillaire et ne colocalise pas avec l'actine. STIM1 muté en revanche forme des clusters qui sont localisés de part et d'autre des filaments d'actine. Le traitement des cellules à la cytochalasine D entraîne une disruption des filaments d'actine et la formation de dots de STIM1 WT, alors que les clusters

de STIM1 muté sont plus petits qu'avant le traitement à la cytochalasine D. Ainsi, la rupture des filaments d'actine semble entraîner une désorganisation de STIM1. Il a été rapporté par Galan *et al* (Galan, Dionisio et al. 2011) qu'un traitement des cellules HEK 293T à la cytochalasine D augmente le SOCE induit par la TG sans toutefois modifier l'association entre STIM1 et ORAI1. Ces résultats pourraient expliquer la présence de petits clusters de STIM1 WT dans les cellules transfectées et traitées à la cytochalasine D. Mes résultats suggèrent que l'actine jouerait un rôle dans le maintien des clusters de STIM1 dans les cellules C2C12. Afin de comprendre le rôle que joue l'actine dans l'augmentation du SOCE observé dans les cellules de patients TAM et les cellules transfectées, il serait nécessaire de traiter ces cellules à la cytochalasine D par exemple et de mesurer l'entrée de  $Ca^{2+}$ . L'on pourrait procéder de la même façon avec STIM1L WT ou muté, cet isoforme possédant un domaine de liaison à l'actine. En ce qui concerne le rôle de STIM1 dans le maintien des clusters de STIM1, on pourrait étudier la localisation de STIM1 par TIRF et réaliser un time-lapse des cellules traitées à la cytochalasine D.

### 2.3.Recrutement d'ORAI1 aux clusters de STIM1

La migration des clusters de STIM1 à proximité de la membrane plasmique précède l'activation des canaux calciques (Wu, Buchanan et al. 2006). Dans cette étude, j'ai pu montrer que contrairement à STIM1 WT, ORAI1 WT ne forme pas des clusters dans les cellules HeLa et C2C12 transfectées même lorsque celles-ci sont traitées à la thapsigargine à l'exemple de Xu *et al* (Xu, Lu et al. 2006). J'ai également montré que les clusters de STIM1 colocalisent avec ORAI1 WT dans les cellules co-transfectées et traitées à la thapsigargine, ce qui suggère un recrutement des canaux calciques ORAI1. De façon intéressante, j'ai aussi observé un co-clustering de STIM1 et d'ORAI1 WT dans les cellules non traitées à la thapsigargine. Gwozdz *et al* (Gwozdz, Dutko-Gwozdz et al. 2008) ont rapporté la même observation de clustering de



STIM1 WT en présence d'ORAI1 WT dans 20 à 40% des cellules HEK 293T, à l'opposé de ChyuanNg *et al* (Ng, Ramduny et al. 2010) par exemple qui ont observé un signal diffus de STIM1 et ORAI1 WT dans des cellules du muscle lisse. La différence entre ces résultats pourrait s'expliquer par les différences de types cellulaires, ou éventuellement par le niveau de surexpression de STIM1 et d'ORAI1 WT dans les cellules transfectées.

Il a été montré par de nombreuses études, dont celles de Correll *et al* (Correll, Goonasekera et al. 2015) qu'une augmentation de l'expression de STIM1 entraîne une augmentation du SOCE, ce qui serait une conséquence directe du clustering de STIM1. Cependant, les cellules HeLa co-transfectées avec STIM1 WT et ORAI1 V107M, qui permet une entrée permanente de  $Ca^{2+}$ , ne montrent pas de clusters, mais un signal diffus de STIM1. L'entrée constitutive de  $Ca^{2+}$  à travers le canal ORAI1 muté V107M préviendrait donc la formation des clusters de STIM1 WT, ou entrainerait leur dissociation. A l'inverse, STIM1 muté forme des co-clusters aussi bien avec ORAI1 WT qu'avec ORAI1 V107M. Ceci suggère que l'interaction entre STIM1 muté et ORAI1 n'est pas abolie par l'entrée de  $Ca^{2+}$ . Ainsi, ORAI1 serait séquestré aux clusters de STIM1 muté en dépit de l'entrée de  $Ca^{2+}$ , ce qui expliquerait le taux basal de  $Ca^{2+}$  élevé observé dans les myoblastes de patients TAM. Afin de comprendre si ces clusters sont localisés près de la membrane plasmique et fonctionnels en dépit de l'entrée de  $Ca^{2+}$  médiée par ORAI1 V107M, il faudrait procéder par microscopie TIRF et mesure de  $Ca^{2+}$  dans les cellules C2C12 ou HeLa co-transfectées avec STIM1 WT ou muté et ORAI1 WT ou muté.

#### 2.4. Impact des mutations TAM et Stormorken sur l'entrée du $Ca^{2+}$

Les résultats publiés par Böhm *et al* (2013) ont mis en exergue une augmentation du niveau de  $Ca^{2+}$  basal dans les myoblastes de patients TAM, mais également une réponse plus importante de ces cellules à une augmentation de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire par rapport à des myoblastes contrôles. Ainsi dans cette étude, je me suis intéressée à la capacité des mutations

TAM et Stormorken dans STIM1 à induire l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans des cellules transfectées. La surexpression de STIM1 WT dans les cellules HeLa induit une augmentation du SOCE. Lorsque l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est mesurée suite à l'ajout d'une concentration physiologique de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM), l'amplitude du SOCE est plus élevée pour les cellules transfectées avec les mutants de STIM1 par rapport aux cellules exprimant STIM1 WT. Ceci suggère que les mutants de STIM1 activent plus fortement l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans des conditions testées. Nous avons également observé une diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique plus forte et plus rapide dans les cellules exprimant STIM1 WT par rapport à celles qui expriment STIM1 muté après ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu. Ceci pourrait indiquer une différence de cinétique de dissociation de STIM1 et ORAI.

## 2.5. Activation des voies dépendantes du $\text{Ca}^{2+}$

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un facteur physiologique clé impliqué dans l'activation de nombreuses voies cellulaires, dont la voie du NFAT et la voie du NF- $\kappa$ B. Bakkar *et al* (Bakkar, Wang et al. 2008) ont montré que bien qu'activé par le SOCE, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B ne joue pas un rôle majeur au cours de la différenciation musculaire. En revanche, Liou *et al* (2005) ont montré que la diminution de l'expression de STIM1 dans des cellules HeLa abroge la translocation du NFAT. Ainsi, je me suis intéressée à l'activation du facteur de transcription NFAT induite par le SOCE dans les cellules HeLa exprimant STIM1 WT, D84G ou R304W. L'analyse quantitative de mes résultats a révélé une augmentation du taux de translocation du NFAT dans les cellules transfectées avec STIM1 WT par rapport à des cellules non transfectées. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la surexpression de STIM1 entraîne une augmentation du SOCE, et donc par la suite la translocation du NFAT. De plus, j'ai pu montrer que les mutants TAM et Stormorken de STIM1 activent une translocation majeure du NFAT dans le noyau des cellules HeLa transfectées, alors que cette translocation n'est que partielle dans les cellules transfectées avec STIM1 WT et traitées à la caféine. Ces résultats sont en

adéquation avec les résultats publiés par Huang *et al* en 2006 (Huang, Zeng et al. 2006) qui montraient que STIM1 D76A entraîne une augmentation de la translocation du NFAT dans les cellules transfectées. Afin de compléter cette étude, il serait nécessaire d'étudier l'expression de gènes régulés par le NFAT tels que *STIM1*, *STIM2* et *ORAI1*, *ORAI2* et *ORAI3* par PCR quantitative et western blot dans des myoblastes ou extraits musculaires de patients. En effet, Daskoulidou *et al* (Daskoulidou, Zeng et al. 2015) ont montré qu'un fort taux de glucose conduit à l'augmentation des ARNm et des protéines STIM1, STIM2, ORAI1, ORAI2 et ORAI3 via l'activation de la voie calcineurine/NFAT dans des cellules endothéliales. Phuong *et al* (Phuong, Yun et al. 2013) ont par ailleurs montré dans des myoblastes murins C2C12 que la surexpression de l'isoforme NFATc3 conduit à une augmentation de l'expression des ARNm et de la protéine STIM1, conduisant à une augmentation du SOCE. A l'inverse, une diminution de l'expression de STIM1 par des siRNA entraîne une diminution d'expression de NFATc3. Ainsi, il existerait une boucle de régulation positive de l'expression de STIM1 et du NFAT dans les cellules C2C12, et celle-ci serait régulée par le SOCE. Il serait également intéressant d'étudier la réversibilité de la translocation du NFAT induite par les mutants de STIM1 en traitant les cellules avec des inhibiteurs des canaux calciques tels que SKF 96365. Huang *et al* (Huang, Zeng et al. 2006) ont montré qu'un traitement des cellules à cette drogue empêche la translocation du NFAT induite par STIM1 D76A. Par la suite il conviendrait d'étudier la translocation du NFAT dans les myoblastes et myotubes de patients TAM.

## 2.6. Formation des agrégats tubulaires *in vitro* et *in vivo*

Les agrégats tubulaires sont des empilements de simples ou de doubles membranes dérivées du RS mais dont le mécanisme de formation ainsi que la pathogénicité restent à étudier. Salviati *et al* (Salviati, Pierobon-Bormioli et al. 1985) ont montré que les agrégats tubulaires sont capables de stocker un excès de  $Ca^{2+}$ , proposant ainsi un rôle protecteur de ces structures pour empêcher

une apoptose des cellules musculaires induite par la surcharge calcique. Les agrégats tubulaires sont la seule marque histologique retrouvée dans les biopsies musculaires de patients atteints de TAM ou du syndrome de Stormorken. Ainsi, cette étude a également porté sur la capacité des mutations TAM et Stormorken dans STIM1 à induire la formation des agrégats tubulaires *in vitro* et *in vivo*.

### *2.6.1. Formation des agrégats tubulaires in vitro*

Les cellules HeLa et C2C12 qui surexpriment la construction YFP-STIM1 WT ne présentent pas d'agrégats tubulaires ni d'empilements de membranes du RE. En revanche, j'ai mis en évidence la présence d'empilements de membranes du RE dans le cytoplasme et à proximité de la membrane plasmique dans les cellules transfectées avec les constructions YFP-STIM1 D84G et R304W. Ces résultats vont dans le même sens que ceux publiés par Orci *et al* (Orci, Ravazzola et al. 2009). Ces derniers ont montré qu'une activation constitutive de STIM1 par la thapsigargine ou suite à l'introduction de la mutation D76A entraîne la formation de feuillet multiples du RE dans le cytoplasme des cellules HeLa et à proximité de la membrane plasmique. Ces empilements de membranes du RE ont toutefois une structure différente de celle des agrégats tubulaires retrouvés dans les biopsies musculaires. Deux hypothèses pourraient expliquer cette différence, la première étant que le muscle est un organe très structuré avec un réticulum spécialisé, et cette organisation ou certaines protéines spécifiques ainsi que le stress mécanique seraient nécessaires à la formation des agrégats tubulaires. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par le fait que les agrégats tubulaires sont spécifiques du muscle squelettique chez la souris et chez l'homme. La deuxième hypothèse serait que la génération d'agrégats tubulaires *in vitro* demanderait un laps de temps plus long que les 24 ou 48 heures post-transfection auxquels les cellules ont été fixées pour la ME au cours de notre étude et celle d'Orci *et al* (Orci, Ravazzola et al. 2009) respectivement. En effet, Chin *et al* (Chin, Luskey et al. 1982) ont montré la présence d'agrégats tubulaires dans des cellules ovariennes de hamster

(cellules CHO) surexprimant l'enzyme membranaire 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase, impliquée dans la synthèse de cholestérol après 5 jours. Pour compléter notre étude, il conviendrait donc d'étudier par microscopie électronique les agrégats tubulaires dans les cellules HeLa, dans les myoblastes C2C12 ou dans des myotubes exprimant STIM1 WT ou muté à différents temps post-transfection afin d'étudier le processus de formation des agrégats tubulaires *in vitro*.

### 2.6.2. Les agrégats tubulaires *in vivo* dans le muscle squelettique

Les agrégats tubulaires sont des empilements de membranes dérivées du RS (Chevessier, Marty et al. 2004, Chevessier, Bauche-Godard et al. 2005) et constituent la seule marque histologique visible dans les muscles de patients TAM. Ces structures sont également retrouvées dans le muscle de souris âgées dans des conditions normales (Agbulut, Destombes et al. 2000) ainsi que dans des conditions pathologiques (souris MRL<sup>+/+</sup> (Kuncl, Pestronk et al. 1989), souris hétérozygotes dystrophiques (Craig and Allen 1980), souris déficientes en créatine kinase (Steeghs, Benders et al. 1997, Steeghs, Oerlemans et al. 1998). Cependant, chez la souris les agrégats tubulaires sont retrouvés essentiellement dans les fibres de type II et chez les mâles uniquement (Chevessier, Marty et al. 2004) avec quelques exceptions chez des femelles âgées (Ludatscher, Silbermann et al. 1983). L'âge d'apparition des agrégats tubulaires dans le muscle normal de souris dépend du muscle, mais également de la souche de souris. En effet, Agbulut *et al* (2000) ont observé des agrégats tubulaires dès 5 mois dans le muscle gastrocnémien de souris de souche C57Bl6 alors que dans le muscle tibialis anterior, les agrégats tubulaires n'ont été observés qu'à partir de 14 mois. Des résultats obtenus par coloration Gomori trichrome au laboratoire ont montré que les agrégats tubulaires apparaissent dans les muscles TA de souris C57B6 à partir de 8 mois d'âge. Ainsi, afin d'étudier le potentiel des mutations TAM à induire la formation d'agrégats tubulaires, j'ai utilisé le système AAV afin d'exprimer STIM1 WT ou muté dans les muscles TA de souris sacrifiées à 4 et 6 mois. J'ai dans un premier temps

déterminé la concentration de virus à utiliser à partir de 3 concentrations différentes d'AAV STIM1 WT. J'ai pu observer un effet dose-réponse entre la concentration d'AAV utilisée et le niveau d'expression de STIM1. Afin d'exprimer STIM1 muté à des niveaux légèrement supérieurs au niveau d'expression endogène, j'ai utilisé la concentration d'AAV de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml. Chaque construction STIM1 WT, D84G et H109R a ensuite été injectée dans les muscles TA de souris âgées de 6 semaines. Dans les souris âgées de 4 mois, la surexpression de STIM1 WT n'a pas eu d'effet sur la formation d'agrégats tubulaires, et les souris injectées avec STIM1 D84G et H109R ne montraient pas de surexpression de ces constructions. Ceci est potentiellement dû à des problèmes de concentration en particules virales des lots d'AAV STIM1 muté.

Afin d'étudier un effet potentiel de l'expression faible de STIM1 H109R sur la fonction du muscle, j'ai entrepris de études de force musculaire. A cette concentration je n'ai pas observé de différence significative entre les TA injectés avec STIM1 WT par rapport aux TA injectés avec STIM1 H109R. J'ai comparé la force spécifique des TA de 4 mois (16 semaines) injectés avec STIM1 WT ou muté à celle de souris de souches 129 Pas, et dont la mesure de force et de fatigue a été réalisée avec l'aide du même expérimentateur (Cowling, Chevremont et al. 2014). J'ai ainsi pu noter une diminution de la force spécifique des TA surexprimant STIM1 WT ou H109R par rapport aux TA contrôles de cette étude. En revanche, aucune différence n'a été faite en ce qui concerne la fatigue musculaire, entre les TA des souris injectés avec STIM1 WT ou muté H109R et les TA contrôles. Afin de compléter cette étude, des cohortes de souris de 6 semaines ont été injectées avec une concentration de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml d'AAV STIM1 WT ou D84G dans un TA et avec des AAV vides dans le TA contrôle latéral. Je pourrai ainsi étudier le potentiel effet négatif dû à la surexpression de STIM1 WT.

Dans les TA de souris à 6 mois, j'ai mis en évidence par coloration de Gomori la présence d'agrégats tubulaires dans certaines fibres musculaires transduites avec STIM1 WT. Ces

agrégats sont petits et nombreux dans les TA injectés avec STIM1 WT mais n'apparaissent pas dans les TA présentant une expression faible de STIM1 H109R/D84G ou dans les TA injectés avec des AAV vides. Pour rappel, les résultats obtenus dans notre laboratoire et ceux d'Agbulut *et al*, les agrégats tubulaires étaient observés de manière naturelle dans les muscles tibialis anterior à 8 mois et 14 mois respectivement. Ceci laisse supposer que la surexpression de STIM1 WT induit la formation des agrégats tubulaires *in vivo*, effet qui pourrait être dû à l'augmentation du SOCE induite par une surexpression de STIM1, déjà observée et montrée *in vitro* (Phuong, Yun et al. 2013).

L'absence de surexpression de STIM1 muté D84G ou H109R dans les TA injectés avec une concentration de  $5 \times 10^{10}$  vg/ml d'AAV a limité l'étude de l'impact de ces mutations sur la formation des agrégats tubulaires *in vivo*. Les TA de souris de 10 semaines injectés avec une concentration de  $5 \times 10^{11}$  vg/ml ont quant à eux montré une surexpression de STIM1 WT ou D84G. Cependant, la coloration de Gomori n'a révélé aucun agrégat dans les fibres musculaires.

Mes résultats montrent donc que la surexpression de STIM1 WT ou muté D84G ne suffit pas à induire la formation d'agrégats tubulaires dans les muscles de souris à 10 semaines. Par contre, la surexpression de STIM1 WT induit la formation d'agrégats tubulaires dans les TA de souris à 4 mois (16 semaines), avec potentiellement une diminution de la force spécifique. A ma connaissance, les agrégats tubulaires les plus précoces ont été obtenus dans le muscle gastrocnémien des souris déficientes en cavéoline 2 à 3 mois (Schubert, Sotgia et al. 2007). Même les modèles de souris à sénescence accélérée présentent des agrégats tubulaires à 6 mois (Nishikawa, Takahashi et al. 2000). Ceci suggère que le temps nécessaire à la formation d'agrégats tubulaires *in vivo* est plus long que celui nécessaire *in vitro* (5 jours dans des cellules CHO, (Chin, Luskey et al. 1982)). La prochaine étape serait d'injecter une concentration de  $5 \times 10^{11}$  vg/ml d'AAV STIM1 WT ou muté et d'étudier la structure et la fonction du muscle à 4 et 6 mois. Néanmoins, mes résultats obtenus concernant l'injection d'AAV STIM1 dans les

muscles TA de souris valident l'approche expérimentale utilisée, ainsi que le modèle souris pour l'étude de la TAM. L'approche expérimentale consistant à injecter les AAV STIM1 WT ou muté dans le muscle TA de souris est rapide et permet de comparer l'impact de différentes mutations STIM1 dans le muscle de souris. Elle reste cependant limitée au muscle. Ainsi, il conviendrait de générer un modèle de souris knock-in pour la mutation R304W de STIM1 causant des symptômes plus variés, qui permettrait d'étudier l'impact de la mutation dans le muscle squelettique ainsi que dans les autres types tissulaires. Une autre alternative serait d'étudier la structure et la fonction du muscle squelettique chez le modèle de souris portant la mutation STIM1 D84G à l'état hétérozygote (souris *STIM1*<sup>sax</sup>, (Grosse, Braun et al. 2007)).



### 3. Les myoblastes C2C12 comme modèle d'étude de la TAM

Afin de se rapprocher du contexte musculaire de la maladie, j'ai dans un premier temps choisi d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la TAM dans les myoblastes murins C2C12. Cependant, je n'ai pas pu détecter d'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique en réponse à une augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire dans ces cellules transfectées aussi bien avec STIM1 WT ou muté TAM ou Stormorken. La surexpression du mutant ORAI1 V107M décrit comme perméable pour le  $\text{Ca}^{2+}$  de façon indépendante de STIM1 n'a pas non plus permis d'induire une entrée significative de  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces cellules. Par la suite, j'ai étudié la translocation du NFAT induite par les mutations TAM et Stormorken de STIM1 dans les cellules C2C12. Cette fois encore je n'ai pas pu observer aucune translocation des isoformes NFATc1 et NFATc2, isoformes exprimés de façon majoritaire dans le muscle. A l'inverse, Phuong *et al* (Phuong, Yun et al. 2013)2012 ont montré une activation du NFATc3, ainsi qu'une activité de ce facteur de transcription dans des cellules C2C12. Ces différences pourraient donc provenir de l'isoforme du NFAT utilisé, ou encore du fait que les cellules C2C12 utilisées par Phuong *et al* surexpriment STIM1 de façon stable. L'absence ou la forte réduction d'expression de l'isoforme ORAI1a dans la lignée de myoblastes C2C12 en notre possession pourrait également être à l'origine de l'absence de SOCE. Afin de confirmer l'absence d'ORAI1a comme facteur limitant du SOCE dans les myoblastes C2C12, il faudrait par la suite mesurer l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les C2C12 co-transfectés avec STIM1 et ORAI1 WT ou muté. En ce qui concerne la translocation du NFAT, il conviendrait d'étudier l'isoforme NFATc3 dans les C2C12 exprimant STIM1 WT ou muté. Je me suis ensuite intéressée à l'expression d'ORAI1 dans les TA de souris âgées de 3 semaines, 6 semaines et 6 mois. J'ai observé qu'ORAI1 est exprimé dans le TA de souris à 3 et 6 semaines, et son expression augmente dans les TA de souris à 6 mois. Ces résultats montrent que l'expression d'ORAI1a n'est pas le facteur limitant la formation des agrégats tubulaires *in vivo*.

## 4. Conclusion

Dans cette étude, j'ai montré que les mutations TAM et Stormorken dans STIM1 conduisent à une augmentation de l'expression de la protéine et ont un effet similaire sur les différentes étapes du SOCE testées. Ces mutations entraînent un clustering constitutif de la protéine, et les clusters ainsi formés sont capables de recruter la protéine normale ainsi que l'isoforme STIM1L. Les clusters de STIM1 sont localisés à proximité de la membrane plasmique, et se rapprocheraient de la membrane plasmique ou continueraient de se former après traitement à la thapsigargine. J'ai également montré que STIM1 muté recrute ORAI1 au niveau des clusters, où cette dernière protéine serait séquestrée, conduisant ainsi à une activation constitutive du SOCE et par la suite à l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$ . Mes résultats suggèrent également que les cellules exprimant STIM1 muté ont un niveau basal de  $\text{Ca}^{2+}$  plus élevé par rapport aux cellules exprimant la protéine sauvage. Cette activation constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  est confirmée par la translocation accrue du facteur de transcription NFAT dans les noyaux des cellules exprimant STIM1 muté D84G ou R304W par rapport à celles qui expriment STIM1 WT. Pour finir, j'ai montré que les mutations de STIM1 induisent *in vitro* la formation d'empilements de membranes du RE à proximité de la membrane plasmique. La surexpression de STIM1 WT dans les muscles TA de souris induit la formation d'agrégats tubulaires à 6 mois et potentiellement une diminution de la force musculaire spécifique à 4 mois.

En conclusion, mes résultats montrent que les mutations TAM D84G et Stormorken R304W entraînent un gain de fonction de la protéine et impactent de la même façon les différentes étapes du SOCE testées. Ils permettent une meilleure compréhension des mécanismes de la TAM et du syndrome de Stormorken, et suggèrent qu'ils appartiennent à une même maladie avec des spectres différents. De façon plus importante, les différentes étapes du SOCE testées constituent des « read-out » potentiels pour le traitement pharmacologique de la TAM et du syndrome de Stormorken. L'on pourrait en effet imaginer traiter les patients TAM ou

Stormorken avec des molécules qui diminueraient le clustering de STIM1, empêcheraient le recrutement d'ORAI1 aux clusters de STIM1 ou encore bloqueraient l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  ou la translocation accrue du NFAT.

# BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie

Agbulut, O., J. Destombes, D. Thiesson and G. Butler-Browne (2000). "Age-related appearance of tubular aggregates in the skeletal muscle of almost all male inbred mice." Histochem Cell Biol **114**(6): 477-481.

Al-Qusairi, L. and J. Laporte (2011). "T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases." Skelet Muscle **1**(1): 26.

Antigny, F., S. Konig, L. Bernheim and M. Frieden (2014). "Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor 1 is a key player of human myoblast differentiation." Cell Calcium **56**(6): 513-521.

Arvanitis, D. A., E. Vafiadaki, G. C. Fan, B. A. Mitton, K. N. Gregory, F. Del Monte, A. Kontrogianni-Konstantopoulos, D. Sanoudou and E. G. Kranias (2007). "Histidine-rich Ca-binding protein interacts with sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1581-1589.

Bakkar, N., J. Wang, K. J. Ladner, H. Wang, J. M. Dahlman, M. Carathers, S. Acharyya, M. A. Rudnicki, A. D. Hollenbach and D. C. Guttridge (2008). "IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis." J Cell Biol **180**(4): 787-802.

Bakowski, D., M. D. Glitsch and A. B. Parekh (2001). "An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> current I(CRAC) in RBL-1 cells." J Physiol **532**(Pt 1): 55-71.

Beck, A., A. Fleig, R. Penner and C. Peinelt (2014). "Regulation of endogenous and heterologous Ca<sup>2+</sup>(+) release-activated Ca<sup>2+</sup>(+) currents by pH." Cell Calcium **56**(3): 235-243.

Biro, N. A. and A. E. Szent-Gyorgyi (1949). "The effect of actin and physico-chemical changes on the myosin ATP-ase system, and on washed muscle." Hung Acta Physiol **2**(1-4): 120-133.

Blaauw, B., P. Del Piccolo, L. Rodriguez, V. H. Hernandez Gonzalez, L. Agatea, F. Solagna, F. Mammano, T. Pozzan and S. Schiaffino (2012). "No evidence for inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> release in isolated fibers of adult mouse skeletal muscle." J Gen Physiol **140**(2): 235-241.

Block, B. A., T. Imagawa, K. P. Campbell and C. Franzini-Armstrong (1988). "Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle." J Cell Biol **107**(6 Pt 2): 2587-2600.

Bohm, J., F. Chevessier, C. Koch, G. A. Peche, M. Mora, L. Morandi, B. Pasanisi, I. Moroni, G. Tasca, F. Fattori, E. Ricci, I. Penisson-Besnier, A. Nadaj-Pakleza, M. Fardeau, P. R. Joshi, M. Deschauer, N. B. Romero, B. Eymard and J. Laporte (2014). "Clinical, histological and genetic characterisation of patients with tubular aggregate myopathy caused by mutations in STIM1." J Med Genet **51**(12): 824-833.

Bohm, J., F. Chevessier, A. Maues De Paula, C. Koch, S. Attarian, C. Feger, D. Hantai, P. Laforet, K. Ghorab, J. M. Vallat, M. Fardeau, D. Figarella-Branger, J. Pouget, N. B. Romero, M. Koch, C. Ebel, N. Levy, M. Krahn, B. Eymard, M. Bartoli and J. Laporte (2013). "Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy." Am J Hum Genet **92**(2): 271-278.

Bolton, T. B. (1979). "Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle." Physiol Rev **59**(3): 606-718.

Boncompagni, S., F. Protasi and C. Franzini-Armstrong (2012). "Sequential stages in the age-dependent gradual formation and accumulation of tubular aggregates in fast twitch muscle fibers: SERCA and calsequestrin involvement." Age (Dordr) **34**(1): 27-41.

Boncompagni, S., M. Thomas, J. R. Lopez, P. D. Allen, Q. Yuan, E. G. Kranias, C. Franzini-Armstrong and C. F. Perez (2012). "Triadin/Junctin double null mouse reveals a differential role for Triadin and Junctin in anchoring CASQ to the jSR and regulating Ca(2+) homeostasis." PLoS One **7**(7): e39962.

Brandl, C. J., N. M. Green, B. Korchak and D. H. MacLennan (1986). "Two Ca<sup>2+</sup> ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences." Cell **44**(4): 597-607.

Brandman, O., J. Liou, W. S. Park and T. Meyer (2007). "STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels." Cell **131**(7): 1327-1339.

Cai, X., Y. Zhou, R. M. Nwokonko, N. A. Loktionova, X. Wang, P. Xin, M. Trebak, Y. Wang and D. L. Gill (2016). "The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer." J Biol Chem.

Calloway, N., T. Owens, K. Corwith, W. Rodgers, D. Holowka and B. Baird (2011). "Stimulated association of STIM1 and Orai1 is regulated by the balance of PtdIns(4,5)P(2) between distinct membrane pools." J Cell Sci **124**(Pt 15): 2602-2610.

Cardenas, C., J. L. Liberona, J. Molgo, C. Colasante, G. A. Mignery and E. Jaimovich (2005). "Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptors regulate local Ca<sup>2+</sup> transients and modulate cAMP response element binding protein phosphorylation." J Cell Sci **118**(Pt 14): 3131-3140.

Carlsen, F. and G. G. Knappeis (1955). "The anisotropic and isotropic bands of skeletal muscle in light- and electron microscopy." Exp Cell Res **8**(2): 329-335.

Carreras-Sureda, A., G. Cantero-Recasens, F. Rubio-Moscardo, K. Kiefer, C. Peinelt, B. A. Niemeyer, M. A. Valverde and R. Vicente (2013). "ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation." Hum Mol Genet **22**(3): 519-530.

Chevessier, F., S. Bauche-Godard, J. P. Leroy, J. Koenig, M. Paturneau-Jouas, B. Eymard, D. Hantai and M. Verdier-Sahuque (2005). "The origin of tubular aggregates in human myopathies." J Pathol **207**(3): 313-323.

Chevessier, F., I. Marty, M. Paturneau-Jouas, D. Hantai and M. Verdier-Sahuque (2004). "Tubular aggregates are from whole sarcoplasmic reticulum origin: alterations in calcium binding protein expression in mouse skeletal muscle during aging." Neuromuscul Disord **14**(3): 208-216.

Chin, D. J., K. L. Luskey, R. G. Anderson, J. R. Faust, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1982). "Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(4): 1185-1189.

Chui, L. A., H. Neustein and T. L. Munsat (1975). "Tubular aggregates in subclinical alcoholic myopathy." Neurology **25**(5): 405-412.

Cognard, C., G. Romey, J. P. Galizzi, M. Fosset and M. Lazdunski (1986). "Dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian skeletal muscle cells in culture: electrophysiological properties and interactions with Ca<sup>2+</sup> channel activator (Bay K8644) and inhibitor (PN 200-110)." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(5): 1518-1522.

Correll, R. N., S. A. Goonasekera, J. H. van Berlo, A. R. Burr, F. Accornero, H. Zhang, C. A. Makarewich, A. J. York, M. A. Sargent, X. Chen, S. R. Houser and J. D. Molkenin (2015). "STIM1 elevation in the heart results in aberrant Ca<sup>2+</sup>(+) handling and cardiomyopathy." J Mol Cell Cardiol **87**: 38-47.

Cosens, D. J. and A. Manning (1969). "Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant." Nature **224**(5216): 285-287.

Costello, B., C. Chadwick, A. Saito, A. Chu, A. Maurer and S. Fleischer (1986). "Characterization of the junctional face membrane from terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum." J Cell Biol **103**(3): 741-753.

Cowling, B. S., T. Chevremont, I. Prokic, C. Kretz, A. Ferry, C. Coirault, O. Koutsopoulos, V. Laugel, N. B. Romero and J. Laporte (2014). "Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy." J Clin Invest **124**(3): 1350-1363.

Cowling, B. S., A. Toussaint, L. Amoasii, P. Koebel, A. Ferry, L. Davignon, I. Nishino, J. L. Mandel and J. Laporte (2011). "Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness." Am J Pathol **178**(5): 2224-2235.

Craig, I. D. and I. V. Allen (1980). "Tubular aggregates in murine dystrophy heterozygotes." Muscle Nerve **3**(2): 134-140.

Darbellay, B., S. Arnaudeau, C. R. Bader, S. Konig and L. Bernheim (2011). "STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca<sup>2+</sup> release." J Cell Biol **194**(2): 335-346.

Darbellay, B., S. Arnaudeau, D. Ceroni, C. R. Bader, S. Konig and L. Bernheim (2010). "Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2." J Biol Chem **285**(29): 22437-22447.



Darbellay, B., S. Arnaudeau, S. Konig, H. Jousset, C. Bader, N. Demaurex and L. Bernheim (2009). "STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation." J Biol Chem **284**(8): 5370-5380.

Daskoulidou, N., B. Zeng, L. M. Berglund, H. Jiang, G. L. Chen, O. Kotova, S. Bhandari, J. Ayoola, S. Griffin, S. L. Atkin, M. F. Gomez and S. Z. Xu (2015). "High glucose enhances store-operated calcium entry by upregulating ORAI/STIM via calcineurin-NFAT signalling." J Mol Med (Berl) **93**(5): 511-521.

DeHaven, W. I., J. T. Smyth, R. R. Boyles and J. W. Putney, Jr. (2007). "Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels." J Biol Chem **282**(24): 17548-17556.

del Villar Negro, A., J. Merino Angulo, J. M. Rivera Pomar and C. Aguirre Errasti (1982). "Tubular aggregates in skeletal muscle of chronic alcoholic patients." Acta Neuropathol **56**(4): 250-254.

Derler, I., M. Fahrner, M. Muik, B. Lackner, R. Schindl, K. Groschner and C. Romanin (2009). "A Ca<sub>2</sub>(+) release-activated Ca<sub>2</sub>(+) (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca<sub>2</sub>(+)-dependent inactivation of ORAI1 channels." J Biol Chem **284**(37): 24933-24938.

Donoso, P. and C. Hidalgo (1989). "Sodium-calcium exchange in transverse tubules isolated from frog skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **978**(1): 8-16.

Dorr, K., T. Kilch, S. Kappel, D. Alansary, G. Schwar, B. A. Niemeyer and C. Peinelt (2016). "Cell type-specific glycosylation of Orai1 modulates store-operated Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> entry." Sci Signal **9**(418): ra25.

Edwards, J. M., Z. P. Neeb, M. A. Alloosh, X. Long, I. N. Bratz, C. R. Peller, J. P. Byrd, S. Kumar, A. G. Obukhov and M. Sturek (2010). "Exercise training decreases store-operated Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> entry associated with metabolic syndrome and coronary atherosclerosis." Cardiovasc Res **85**(3): 631-640.

Endo, Y., S. Noguchi, Y. Hara, Y. K. Hayashi, K. Motomura, S. Miyatake, N. Murakami, S. Tanaka, S. Yamashita, R. Kizu, M. Bamba, Y. Goto, N. Matsumoto, I. Nonaka and I. Nishino (2015). "Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia

via constitutive activation of store-operated Ca(2)(+) channels." Hum Mol Genet **24**(3): 637-648.

Engel, W. K. (1964). "Mitochondrial Aggregates in Muscle Disease." J Histochem Cytochem **12**: 46-48.

Engel, W. K., D. W. Bishop and G. G. Cunningham (1970). "Tubular aggregates in type II muscle fibers: ultrastructural and histochemical correlation." J Ultrastruct Res **31**(5-6): 507-525.

Feng, J. M., Y. K. Hu, L. H. Xie, C. S. Colwell, X. M. Shao, X. P. Sun, B. Chen, H. Tang and A. T. Campagnoni (2006). "Golli protein negatively regulates store depletion-induced calcium influx in T cells." Immunity **24**(6): 717-727.

Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S. H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly and A. Rao (2006). "A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature **441**(7090): 179-185.

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

Fliegel, L., M. Ohnishi, M. R. Carpenter, V. K. Khanna, R. A. Reithmeier and D. H. MacLennan (1987). "Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(5): 1167-1171.

Fosset, M., E. Jaimovich, E. Delpont and M. Lazdunski (1983). "[3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle." J Biol Chem **258**(10): 6086-6092.

Franzini-Armstrong, C., L. J. Kenney and E. Varriano-Marston (1987). "The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study." J Cell Biol **105**(1): 49-56.

Franzini-Armstrong, C. and K. R. Porter (1964). "Sarcolemmal Invaginations Constituting the T System in Fish Muscle Fibers." J Cell Biol **22**: 675-696.

Fucile, S. (2004). "Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors." Cell Calcium **35**(1): 1-8.

Fukushima, M., T. Tomita, A. Janoshazi and J. W. Putney (2012). "Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities." J Cell Sci **125**(Pt 18): 4354-4361.

Fulton, D., P. M. Paez, R. Fisher, V. Handley, C. S. Colwell and A. T. Campagnoni (2010). "Regulation of L-type Ca<sup>++</sup> currents and process morphology in white matter oligodendrocyte precursor cells by golli-myelin proteins." Glia **58**(11): 1292-1303.

Galan, C., N. Dionisio, T. Smani, G. M. Salido and J. A. Rosado (2011). "The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca<sup>2+</sup> channel subunits Orai1 and TRPC1." Biochem Pharmacol **82**(4): 400-410.

Garcia, J. and K. G. Beam (1994). "Calcium transients associated with the T type calcium current in myotubes." J Gen Physiol **104**(6): 1113-1128.

Garibaldi, M., F. Fattori, B. Riva, C. Labasse, G. Brochier, P. Ottaviani, S. Sacconi, E. Vizzaccaro, F. Laschena, N. B. Romero, A. Genazzani, E. Bertini and G. Antonini (2016). "A novel gain-of-function mutation in ORAI1 causes late-onset tubular aggregate myopathy and congenital miosis." Clin Genet.

Gilchrist, J. M., M. Ambler and P. Agatiello (1991). "Steroid-responsive tubular aggregate myopathy." Muscle Nerve **14**(3): 233-236.

Goonasekera, S. A., J. Davis, J. Q. Kwong, F. Accornero, L. Wei-LaPierre, M. A. Sargent, R. T. Dirksen and J. D. Molkentin (2014). "Enhanced Ca<sup>(2+)</sup> influx from STIM1-Orai1 induces muscle pathology in mouse models of muscular dystrophy." Hum Mol Genet **23**(14): 3706-3715.

Grosse, J., A. Braun, D. Varga-Szabo, N. Beyersdorf, B. Schneider, L. Zeitlmann, P. Hanke, P. Schropp, S. Muhlstedt, C. Zorn, M. Huber, C. Schmittwolf, W. Jagla, P. Yu, T. Kerkau, H. Schulze, M. Nehls and B. Nieswandt (2007). "An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice." J Clin Invest **117**(11): 3540-3550.

Grumer, H. D. (1966). "[Metabolically conditioned forms of imbecility and their diagnosis. II. Galactosemia]." Z Klin Chem Klin Biochem **4**(3): 123-126.

Guharay, F. and F. Sachs (1984). "Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle." J Physiol **352**: 685-701.

Guido, D., N. Demarex and P. Nunes (2015). "Junctate boosts phagocytosis by recruiting endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> stores near phagosomes." J Cell Sci **128**(22): 4074-4082.

Gwack, Y., S. Feske, S. Srikanth, P. G. Hogan and A. Rao (2007). "Signalling to transcription: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes." Cell Calcium **42**(2): 145-156.

Gwozdz, T., J. Dutko-Gwozdz, V. Zarayskiy, K. Peter and V. M. Bolotina (2008). "How strict is the correlation between STIM1 and Orai1 expression, puncta formation, and ICRAC activation?" Am J Physiol Cell Physiol **295**(5): C1133-1140.

Hedberg, C., M. Niceta, F. Fattori, B. Lindvall, A. Ciolfi, A. D'Amico, G. Tasca, S. Petrini, M. Tulinius, M. Tartaglia, A. Oldfors and E. Bertini (2014). "Childhood onset tubular aggregate myopathy associated with de novo STIM1 mutations." J Neurol **261**(5): 870-876.

Hewavitharana, T., X. Deng, Y. Wang, M. F. Ritchie, G. V. Girish, J. Soboloff and D. L. Gill (2008). "Location and function of STIM1 in the activation of Ca<sup>2+</sup> entry signals." J Biol Chem **283**(38): 26252-26262.

Hitchcock, S. E., H. E. Huxley and A. G. Szent-Gyorgyi (1973). "Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin: a two-site model for troponin action." J Mol Biol **80**(4): 825-836.

Huang, G. N., W. Zeng, J. Y. Kim, J. P. Yuan, L. Han, S. Muallem and P. F. Worley (2006). "STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels." Nat Cell Biol **8**(9): 1003-1010.

Huxley, H. E. and J. Hanson (1959). "The structural basis of the contraction mechanism in striated muscle." Ann N Y Acad Sci **81**: 403-408.

Inesi, G., M. Kurzmack, C. Coan and D. E. Lewis (1980). "Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles." J Biol Chem **255**(7): 3025-3031.

Jacques, T. S., J. Holton, P. M. Watts, A. J. Wills, S. E. Smith and M. G. Hanna (2002). "Tubular aggregate myopathy with abnormal pupils and skeletal deformities." J Neurol Neurosurg Psychiatry **73**(3): 324-326.

- Jay, S. D., A. H. Sharp, S. D. Kahl, T. S. Vedvick, M. M. Harpold and K. P. Campbell (1991). "Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides." J Biol Chem **266**(5): 3287-3293.
- Jing, J., L. He, A. Sun, A. Quintana, Y. Ding, G. Ma, P. Tan, X. Liang, X. Zheng, L. Chen, X. Shi, S. L. Zhang, L. Zhong, Y. Huang, M. Q. Dong, C. L. Walker, P. G. Hogan, Y. Wang and Y. Zhou (2015). "Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca(2)(+) influx." Nat Cell Biol **17**(10): 1339-1347.
- Jones, L. R., L. Zhang, K. Sanborn, A. O. Jorgensen and J. Kelley (1995). "Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **270**(51): 30787-30796.
- Jousset, H., M. Frieden and N. Demaurex (2007). "STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca<sup>2+</sup> channels located close to sarco/endoplasmic Ca<sup>2+</sup> ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **282**(15): 11456-11464.
- Kawasaki, T., T. Ueyama, I. Lange, S. Feske and N. Saito (2010). "Protein kinase C-induced phosphorylation of Orail regulates the intracellular Ca<sup>2+</sup> level via the store-operated Ca<sup>2+</sup> channel." J Biol Chem **285**(33): 25720-25730.
- Kim, K. C., A. H. Caswell, J. P. Brunschwig and N. R. Brandt (1990). "Identification of a new subpopulation of triad junctions isolated from skeletal muscle; morphological correlations with intact muscle." J Membr Biol **113**(3): 221-235.
- Kobayashi, Y. M., B. A. Alseikhan and L. R. Jones (2000). "Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction." J Biol Chem **275**(23): 17639-17646.
- Kockskamper, J., A. V. Zima, H. L. Roderick, B. Pieske, L. A. Blatter and M. D. Bootman (2008). "Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **45**(2): 128-147.
- Korzeniowski, M. K., I. M. Manjarres, P. Varnai and T. Balla (2010). "Activation of STIM1-Orail involves an intramolecular switching mechanism." Sci Signal **3**(148): ra82.

Krapivinsky, G., L. Krapivinsky, S. C. Stotz, Y. Manasian and D. E. Clapham (2011). "POST, partner of stromal interaction molecule 1 (STIM1), targets STIM1 to multiple transporters." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(48): 19234-19239.

Kuncl, R. W., A. Pestronk, J. Lane and E. Alexander (1989). "The MRL  $+/+$  mouse: a new model of tubular aggregates which are gender- and age-related." Acta Neuropathol **78**(6): 615-620.

Lacruz, R. S. and S. Feske (2015). "Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1." Ann N Y Acad Sci **1356**: 45-79.

Leberer, E., B. G. Timms, K. P. Campbell and D. H. MacLennan (1990). "Purification, calcium binding properties, and ultrastructural localization of the 53,000- and 160,000 (sarcalumenin)-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **265**(17): 10118-10124.

Lee, H. G., H. Kang, D. H. Kim and W. J. Park (2001). "Interaction of HRC (histidine-rich Ca(2+)-binding protein) and triadin in the lumen of sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **276**(43): 39533-39538.

Lee, K. J., J. S. Woo, J. H. Hwang, C. Hyun, C. H. Cho, D. H. Kim and E. H. Lee (2013). "STIM1 negatively regulates Ca(2+)(+) release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal myotubes." Biochem J **453**(2): 187-200.

Lewis, R. S. and M. D. Cahalan (1989). "Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and transmembrane Ca<sup>2+</sup> current in human leukemic T cells." Cell Regul **1**(1): 99-112.

Li, L., S. Mirza, S. J. Richardson, E. M. Gallant, C. Thekkedam, S. M. Pace, F. Zorzato, D. Liu, N. A. Beard and A. F. Dulhunty (2015). "A new cytoplasmic interaction between junctin and ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels." J Cell Sci **128**(5): 951-963.

Li, P., Y. Miao, A. Dani and M. Vig (2016). "alpha-SNAP regulates dynamic, on-site assembly and calcium selectivity of Orail channels." Mol Biol Cell **27**(16): 2542-2553.

Liou, J., M. L. Kim, W. D. Heo, J. T. Jones, J. W. Myers, J. E. Ferrell, Jr. and T. Meyer (2005). "STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx." Curr Biol **15**(13): 1235-1241.

- Liu, G. and I. N. Pessah (1994). "Molecular interaction between ryanodine receptor and glycoprotein triadin involves redox cycling of functionally important hyperreactive sulfhydryls." J Biol Chem **269**(52): 33028-33034.
- Lopez, J. J., G. M. Salido, J. A. Pariente and J. A. Rosado (2006). "Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores." J Biol Chem **281**(38): 28254-28264.
- Ludatscher, R., M. Silbermann, D. Gershon and A. Reznick (1983). "The effects of enforced running on the gastrocnemius muscle in aging mice: an ultrastructural study." Exp Gerontol **18**(2): 113-123.
- Luik, R. M., M. M. Wu, J. Buchanan and R. S. Lewis (2006). "The elementary unit of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions." J Cell Biol **174**(6): 815-825.
- Lytton, J. (2007). "Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport." Biochem J **406**(3): 365-382.
- MacLennan, D. H., C. J. Brandl, B. Korczak and N. M. Green (1985). "Amino-acid sequence of a Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence." Nature **316**(6030): 696-700.
- MacLennan, D. H. and P. T. Wong (1971). "Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(6): 1231-1235.
- Manji, S. S., N. J. Parker, R. T. Williams, L. van Stekelenburg, R. B. Pearson, M. Dziadek and P. J. Smith (2000). "STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface." Biochim Biophys Acta **1481**(1): 147-155.
- Markello, T., D. Chen, J. Y. Kwan, I. Horkayne-Szakaly, A. Morrison, O. Simakova, I. Maric, J. Lozier, A. R. Cullinane, T. Kilo, L. Meister, K. Pakzad, W. Bone, S. Chainani, E. Lee, A. Links, C. Boerkoel, R. Fischer, C. Toro, J. G. White, W. A. Gahl and M. Gunay-Aygun (2015). "York platelet syndrome is a CRAC channelopathy due to gain-of-function mutations in STIM1." Mol Genet Metab **114**(3): 474-482.

Marty, I., D. Thevenon, C. Scotto, S. Groh, S. Sainnier, M. Robert, D. Grunwald and M. Villaz (2000). "Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin." J Biol Chem **275**(11): 8206-8212.

Maus, M., A. Jairaman, P. B. Stathopoulos, M. Muik, M. Fahrner, C. Weidinger, M. Benson, S. Fuchs, S. Ehl, C. Romanin, M. Ikura, M. Prakriya and S. Feske (2015). "Missense mutation in immunodeficient patients shows the multifunctional roles of coiled-coil domain 3 (CC3) in STIM1 activation." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(19): 6206-6211.

McCarl, C. A., C. Picard, S. Khalil, T. Kawasaki, J. Rother, A. Papolos, J. Kutok, C. Hivroz, F. Ledest, K. Plogmann, S. Ehl, G. Notheis, M. H. Albert, B. H. Belohradsky, J. Kirschner, A. Rao, A. Fischer and S. Feske (2009). "ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia." J Allergy Clin Immunol **124**(6): 1311-1318 e1317.

Mercer, J. C., W. I. Dehaven, J. T. Smyth, B. Wedel, R. R. Boyles, G. S. Bird and J. W. Putney, Jr. (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." J Biol Chem **281**(34): 24979-24990.

Miederer, A. M., D. Alansary, G. Schwarz, P. H. Lee, M. Jung, V. Helms and B. A. Niemeyer (2015). "A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry." Nat Commun **6**: 6899.

Mignen, O., J. L. Thompson and T. J. Shuttleworth (2001). "Reciprocal regulation of capacitance and arachidonate-regulated noncapacitance Ca<sup>2+</sup> entry pathways." J Biol Chem **276**(38): 35676-35683.

Mignen, O., J. L. Thompson and T. J. Shuttleworth (2007). "STIM1 regulates Ca<sup>2+</sup> entry via arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane." J Physiol **579**(Pt 3): 703-715.

Mignen, O., J. L. Thompson and T. J. Shuttleworth (2008). "Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective (ARC) channels." J Physiol **586**(1): 185-195.



Millay, D. P., J. R. O'Rourke, L. B. Sutherland, S. Bezprozvannaya, J. M. Shelton, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2013). "Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation." Nature **499**(7458): 301-305.

Misceo, D., A. Holmgren, W. E. Louch, P. A. Holme, M. Mizobuchi, R. J. Morales, A. M. De Paula, A. Stray-Pedersen, R. Lyle, B. Dalhus, G. Christensen, H. Stormorken, G. E. Tjonnfjord and E. Frengen (2014). "A dominant STIM1 mutation causes Stormorken syndrome." Hum Mutat **35**(5): 556-564.

Mori, Y., M. Wakamori, T. Miyakawa, M. Hermosura, Y. Hara, M. Nishida, K. Hirose, A. Mizushima, M. Kurosaki, E. Mori, K. Gotoh, T. Okada, A. Fleig, R. Penner, M. Iino and T. Kurosaki (2002). "Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes." J Exp Med **195**(6): 673-681.

Morin, G., N. O. Bruechle, A. R. Singh, C. Knopp, G. Jedraszak, M. Elbracht, D. Bremond-Gignac, K. Hartmann, H. Sevestre, P. Deutz, D. Herent, P. Nurnberg, B. Romeo, K. Konrad, M. Mathieu-Dramard, J. Oldenburg, E. Bourges-Petit, Y. Shen, K. Zerres, H. Ouadid-Ahidouch and J. Rochette (2014). "Gain-of-Function Mutation in STIM1 (P.R304W) Is Associated with Stormorken Syndrome." Hum Mutat **35**(10): 1221-1232.

Motiani, R. K., I. F. Abdullaev and M. Trebak (2010). "A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells." J Biol Chem **285**(25): 19173-19183.

Muik, M., M. Fahrner, I. Derler, R. Schindl, J. Bergsmann, I. Frischauf, K. Groschner and C. Romanin (2009). "A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels." J Biol Chem **284**(13): 8421-8426.

Muller, H. D., S. Vielhaber, A. Brunn and J. M. Schroder (2001). "Dominantly inherited myopathy with novel tubular aggregates containing 1-21 tubulofilamentous structures." Acta Neuropathol **102**(1): 27-35.

Mullins, F. M., C. Y. Park, R. E. Dolmetsch and R. S. Lewis (2009). "STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of CRAC channels." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(36): 15495-15500.

Nesin, V., G. Wiley, M. Kousi, E. C. Ong, T. Lehmann, D. J. Nicholl, M. Suri, N. Shahrizaila, N. Katsanis, P. M. Gaffney, K. J. Wierenga and L. Tsiokas (2014). "Activating mutations in STIM1 and ORAI1 cause overlapping syndromes of tubular myopathy and congenital miosis." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(11): 4197-4202.

Ng, L. C., D. Ramduny, J. A. Airey, C. A. Singer, P. S. Keller, X. M. Shen, H. Tian, M. Valencik and J. R. Hume (2010). "Orai1 interacts with STIM1 and mediates capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **299**(5): C1079-1090.

Nishikawa, T., J. A. Takahashi, T. Matsushita, K. Ohnishi, K. Higuchi, N. Hashimoto and M. Hosokawa (2000). "Tubular aggregates in the skeletal muscle of the senescence-accelerated mouse; SAM." Mech Ageing Dev **114**(2): 89-99.

Noury, J. B., J. Bohm, G. A. Peche, L. Guyant-Marechal, A. L. Bedat-Millet, L. Chiche, R. Y. Carlier, E. Malfatti, N. B. Romero and T. Stojkovic (2016). "Tubular aggregate myopathy with features of Stormorken disease due to a new STIM1 mutation." Neuromuscul Disord.

Novotova, M., I. Zahradnik, G. Brochier, M. Pavlovicova, X. Bigard and R. Ventura-Clapier (2002). "Joint participation of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the formation of tubular aggregates in gastrocnemius muscle of CK<sup>-/-</sup> mice." Eur J Cell Biol **81**(2): 101-106.

Ong, H. L., S. I. Jang and I. S. Ambudkar (2012). "Distinct contributions of Orai1 and TRPC1 to agonist-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signals determine specificity of Ca<sup>2+</sup>-dependent gene expression." PLoS One **7**(10): e47146.

Orci, L., M. Ravazzola, M. Le Coadic, W. W. Shen, N. Demaurex and P. Cosson (2009). "From the Cover: STIM1-induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19358-19362.

Palty, R., A. Raveh, I. Kaminsky, R. Meller and E. Reuveny (2012). "SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling." Cell **149**(2): 425-438.

Pandit, L., G. Narayanappa, I. G. Bhat and V. Thomas (2009). "Autosomal recessive tubular aggregate myopathy in an Indian family." Eur J Paediatr Neurol **13**(4): 373-375.

- Parekh, A. B. (2011). "Decoding cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations." Trends Biochem Sci **36**(2): 78-87.
- Park, C. Y., P. J. Hoover, F. M. Mullins, P. Bachhawat, E. D. Covington, S. Raunser, T. Walz, K. C. Garcia, R. E. Dolmetsch and R. S. Lewis (2009). "STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1." Cell **136**(5): 876-890.
- Parker, N. J., C. G. Begley, P. J. Smith and R. M. Fox (1996). "Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5." Genomics **37**(2): 253-256.
- Parvez, S., A. Beck, C. Peinelt, J. Soboloff, A. Lis, M. Monteilh-Zoller, D. L. Gill, A. Fleig and R. Penner (2008). "STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation." FASEB J **22**(3): 752-761.
- Patterson, R. L., D. B. van Rossum and D. L. Gill (1999). "Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: evidence for a secretion-like coupling model." Cell **98**(4): 487-499.
- Peinelt, C., M. Vig, D. L. Koomoa, A. Beck, M. J. Nadler, M. Koblan-Huberson, A. Lis, A. Fleig, R. Penner and J. P. Kinet (2006). "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)." Nat Cell Biol **8**(7): 771-773.
- Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." Muscle Nerve **35**(4): 430-442.
- Philipp, S., B. Strauss, D. Hirnet, U. Wissenbach, L. Mery, V. Flockerzi and M. Hoth (2003). "TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes." J Biol Chem **278**(29): 26629-26638.
- Phuong, T. T., Y. H. Yun, S. J. Kim and T. M. Kang (2013). "Positive feedback control between STIM1 and NFATc3 is required for C2C12 myoblast differentiation." Biochem Biophys Res Commun **430**(2): 722-728.
- Pozo-Guisado, E., V. Casas-Rua, P. Tomas-Martin, A. M. Lopez-Guerrero, A. Alvarez-Barrientos and F. J. Martin-Romero (2013). "Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein EB1." J Cell Sci **126**(Pt 14): 3170-3180.

Pozo-Guisado, E. and F. J. Martin-Romero (2013). "The regulation of STIM1 by phosphorylation." Commun Integr Biol **6**(6): e26283.

Prakriya, M. (2013). "Store-operated Orai channels: structure and function." Curr Top Membr **71**: 1-32.

Prakriya, M., S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao and P. G. Hogan (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." Nature **443**(7108): 230-233.

Prakriya, M. and R. S. Lewis (2003). "CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity." Cell Calcium **33**(5-6): 311-321.

Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." Cell Calcium **7**(1): 1-12.

Rana, A., M. Yen, A. M. Sadaghiani, S. Malmersjo, C. Y. Park, R. E. Dolmetsch and R. S. Lewis (2015). "Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels." J Cell Biol **209**(5): 653-669.

Reeves, J. P. and J. L. Sutko (1983). "Competitive interactions of sodium and calcium with the sodium-calcium exchange system of cardiac sarcolemmal vesicles." J Biol Chem **258**(5): 3178-3182.

Ribeiro, C. M., J. Reece and J. W. Putney, Jr. (1997). "Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling, but not for capacitative calcium entry." J Biol Chem **272**(42): 26555-26561.

Rios, E. and G. Brum (1987). "Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle." Nature **325**(6106): 717-720.

Roos, J., P. J. DiGregorio, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J. A. Kozak, S. L. Wagner, M. D. Cahalan, G. Velicelebi and K. A. Stauderman (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function." J Cell Biol **169**(3): 435-445.

Sabbioni, S., G. Barbanti-Brodano, C. M. Croce and M. Negrini (1997). "GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development." Cancer Res **57**(20): 4493-4497.

Sabbioni, S., A. Veronese, M. Trubia, R. Taramelli, G. Barbanti-Brodano, C. M. Croce and M. Negrini (1999). "Exon structure and promoter identification of STIM1 (alias GOK), a human gene causing growth arrest of the human tumor cell lines G401 and RD." Cytogenet Cell Genet **86**(3-4): 214-218.

Sacchetto, R., F. Turcato, E. Damiani and A. Margreth (1999). "Interaction of triadin with histidine-rich Ca(2+)-binding protein at the triadic junction in skeletal muscle fibers." J Muscle Res Cell Motil **20**(4): 403-415.

Salviati, G., S. Pierobon-Bormioli, R. Betto, E. Damiani, C. Angelini, S. P. Ringel, S. Salvatori and A. Margreth (1985). "Tubular aggregates: sarcoplasmic reticulum origin, calcium storage ability, and functional implications." Muscle Nerve **8**(4): 299-306.

Sauc, S., M. Bulla, P. Nunes, L. Orci, A. Marchetti, F. Antigny, L. Bernheim, P. Cosson, M. Frieden and N. Demaurex (2015). "STIM1L traps and gates Orai1 channels without remodeling the cortical ER." J Cell Sci **128**(8): 1568-1579.

Schaballie, H., R. Rodriguez, E. Martin, L. Moens, G. Frans, C. Lenoir, J. Dutre, D. Canioni, X. Bossuyt, A. Fischer, S. Latour, I. Meyts and C. Picard (2015). "A novel hypomorphic mutation in STIM1 results in a late-onset immunodeficiency." J Allergy Clin Immunol **136**(3): 816-819 e814.

Schubert, W., F. Sotgia, A. W. Cohen, F. Capozza, G. Bonuccelli, C. Bruno, C. Minetti, E. Bonilla, S. Dimauro and M. P. Lisanti (2007). "Caveolin-1(-/-)- and caveolin-2(-/-)-deficient mice both display numerous skeletal muscle abnormalities, with tubular aggregate formation." Am J Pathol **170**(1): 316-333.

Sharma, S., A. Quintana, G. M. Findlay, M. Mettlen, B. Baust, M. Jain, R. Nilsson, A. Rao and P. G. Hogan (2013). "An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry." Nature **499**(7457): 238-242.

Shuttleworth, T. J. and J. L. Thompson (1998). "Muscarinic receptor activation of arachidonate-mediated Ca<sup>2+</sup> entry in HEK293 cells is independent of phospholipase C." J Biol Chem **273**(49): 32636-32643.

Smyth, J. T., W. I. DeHaven, G. S. Bird and J. W. Putney, Jr. (2007). "Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca<sup>2+</sup> channel activator STIM1." J Cell Sci **120**(Pt 21): 3762-3771.

Soboloff, J., B. S. Rothberg, M. Madesh and D. L. Gill (2012). "STIM proteins: dynamic calcium signal transducers." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(9): 549-565.

Spassova, M. A., J. Soboloff, L. P. He, W. Xu, M. A. Dziadek and D. L. Gill (2006). "STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4040-4045.

Spudich, J. A., H. E. Huxley and J. T. Finch (1972). "Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin." J Mol Biol **72**(3): 619-632.

Srikanth, S., M. Jew, K. D. Kim, M. K. Yee, J. Abramson and Y. Gwack (2012). "Junctate is a Ca<sup>2+</sup>-sensing structural component of Orai1 and stromal interaction molecule 1 (STIM1)." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(22): 8682-8687.

Srikanth, S., H. J. Jung, K. D. Kim, P. Souda, J. Whitelegge and Y. Gwack (2010). "A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca<sup>2+</sup> sensor that stabilizes CRAC channels in T cells." Nat Cell Biol **12**(5): 436-446.

Stathopoulos, P. B. and M. Ikura (2009). "Structurally delineating stromal interaction molecules as the endoplasmic reticulum calcium sensors and regulators of calcium release-activated calcium entry." Immunol Rev **231**(1): 113-131.

Stathopoulos, P. B., G. Y. Li, M. J. Plevin, J. B. Ames and M. Ikura (2006). "Stored Ca<sup>2+</sup> depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca<sup>2+</sup> entry." J Biol Chem **281**(47): 35855-35862.

Stathopoulos, P. B., L. Zheng and M. Ikura (2009). "Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics." J Biol Chem **284**(2): 728-732.

Stathopoulos, P. B., L. Zheng, G. Y. Li, M. J. Plevin and M. Ikura (2008). "Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry." Cell **135**(1): 110-122.

Steeghs, K., A. Benders, F. Oerlemans, A. de Haan, A. Heerschap, W. Ruitenbeek, C. Jost, J. van Deursen, B. Perryman, D. Pette, M. Bruckwilder, J. Koudijs, P. Jap, J. Veerkamp and B. Wieringa (1997). "Altered Ca<sup>2+</sup> responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies." Cell **89**(1): 93-103.

Steeghs, K., F. Oerlemans, A. de Haan, A. Heerschap, L. Verdoodt, M. de Bie, W. Ruitenbeek, A. Benders, C. Jost, J. van Deursen, P. Tullson, R. Terjung, P. Jap, W. Jacob, D. Pette and B. Wieringa (1998). "Cytoarchitectural and metabolic adaptations in muscles with mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies." Mol Cell Biochem **184**(1-2): 183-194.

Stiber, J., A. Hawkins, Z. S. Zhang, S. Wang, J. Burch, V. Graham, C. C. Ward, M. Seth, E. Finch, N. Malouf, R. S. Williams, J. P. Eu and P. Rosenberg (2008). "STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle." Nat Cell Biol **10**(6): 688-697.

Stormorken, H., O. Sjaastad, A. Langslet, I. Sulg, K. Egge and J. Diderichsen (1985). "A new syndrome: thrombocytopathia, muscle fatigue, asplenia, miosis, migraine, dyslexia and ichthyosis." Clin Genet **28**(5): 367-374.

Takahashi, Y., M. Murakami, H. Watanabe, H. Hasegawa, T. Ohba, Y. Munehisa, K. Nobori, K. Ono, T. Iijima and H. Ito (2007). "Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca<sup>2+</sup> entry." Biochem Biophys Res Commun **356**(1): 45-52.

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

Tasca, G., A. D'Amico, M. Monforte, A. Nadaj-Pakleza, M. Vialle, F. Fattori, J. Vissing, E. Ricci and E. Bertini (2015). "Muscle imaging in patients with tubular aggregate myopathy caused by mutations in STIM1." Neuromuscul Disord **25**(11): 898-903.

Thompson, J. L. and T. J. Shuttleworth (2013). "How many Orai's does it take to make a CRAC channel?" Sci Rep **3**: 1961.

Tidball, J. G. (1991). "Myotendinous junction injury in relation to junction structure and molecular composition." Exerc Sport Sci Rev **19**: 419-445.

Treves, S., G. Feriotto, L. Moccagatta, R. Gambari and F. Zorzato (2000). "Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane." J Biol Chem **275**(50): 39555-39568.

Tskhovrebova, L. and J. Trinick (2010). "Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere." J Biomed Biotechnol **2010**: 612482.

Vassilopoulos, S., D. Thevenon, S. S. Rezgui, J. Brocard, A. Chapel, A. Lacampagne, J. Lunardi, M. Dewaard and I. Marty (2005). "Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **280**(31): 28601-28609.

Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.

Vig, M., A. Beck, J. M. Billingsley, A. Lis, S. Parvez, C. Peinelt, D. L. Koomoa, J. Soboloff, D. L. Gill, A. Fleig, J. P. Kinet and R. Penner (2006). "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." Curr Biol **16**(20): 2073-2079.

Wang, L., L. Zhang, S. Li, Y. Zheng, X. Yan, M. Chen, H. Wang, J. W. Putney and D. Luo (2015). "Retrograde regulation of STIM1-Orai1 interaction and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry by calsequestrin." Sci Rep **5**: 11349.

Wang, S., M. Choi, A. S. Richardson, B. M. Reid, F. Seymen, M. Yildirim, E. Tuna, K. Gencay, J. P. Simmer and J. C. Hu (2014). "STIM1 and SLC24A4 Are Critical for Enamel Maturation." J Dent Res **93**(7 Suppl): 94S-100S.

Wang, S., W. R. Trumble, H. Liao, C. R. Wesson, A. K. Dunker and C. H. Kang (1998). "Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." Nat Struct Biol **5**(6): 476-483.

Wei, L., E. M. Gallant, A. F. Dulhunty and N. A. Beard (2009). "Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin." Int J Biochem Cell Biol **41**(11): 2214-2224.



Williams, R. T., S. S. Manji, N. J. Parker, M. S. Hancock, L. Van Stekelenburg, J. P. Eid, P. V. Senior, J. S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P. J. Smith and M. A. Dziadek (2001). "Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins." Biochem J **357**(Pt 3): 673-685.

Williams, R. T., P. V. Senior, L. Van Stekelenburg, J. E. Layton, P. J. Smith and M. A. Dziadek (2002). "Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation." Biochim Biophys Acta **1596**(1): 131-137.

Wu, K. D., W. S. Lee, J. Wey, D. Bungard and J. Lytton (1995). "Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts." Am J Physiol **269**(3 Pt 1): C775-784.

Wu, M. M., J. Buchanan, R. M. Luik and R. S. Lewis (2006). "Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." J Cell Biol **174**(6): 803-813.

Wuytack, F., B. Papp, H. Verboomen, L. Raeymaekers, L. Dode, R. Bobe, J. Enouf, S. Bokkala, K. S. Authi and R. Casteels (1994). "A sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca<sup>2+</sup> pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells." J Biol Chem **269**(2): 1410-1416.

Wuytack, F., L. Raeymaekers, H. De Smedt, J. A. Eggermont, L. Missiaen, L. Van Den Bosch, S. De Jaegere, H. Verboomen, L. Plessers and R. Casteels (1992). "Ca(2+)-transport ATPases and their regulation in muscle and brain." Ann N Y Acad Sci **671**: 82-91.

Xiao, B., B. Coste, J. Mathur and A. Patapoutian (2011). "Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca(2)<sup>+</sup> influx and modulates gene expression." Nat Chem Biol **7**(6): 351-358.

Xu, P., J. Lu, Z. Li, X. Yu, L. Chen and T. Xu (2006). "Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1." Biochem Biophys Res Commun **350**(4): 969-976.

- Yamashita, M., A. Somasundaram and M. Prakriya (2011). "Competitive modulation of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel gating by STIM1 and 2-aminoethylidiphenyl borate." J Biol Chem **286**(11): 9429-9442.
- Yarotsky, V. and R. T. Dirksen (2012). "Temperature and RyR1 regulate the activation rate of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry current in myotubes." Biophys J **103**(2): 202-211.
- Yeromin, A. V., S. L. Zhang, W. Jiang, Y. Yu, O. Safrina and M. D. Cahalan (2006). "Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai." Nature **443**(7108): 226-229.
- Yu, F., L. Sun and K. Machaca (2010). "Constitutive recycling of the store-operated Ca<sup>2+</sup> channel Orai1 and its internalization during meiosis." J Cell Biol **191**(3): 523-535.
- Yuan, J. P., W. Zeng, M. R. Dorwart, Y. J. Choi, P. F. Worley and S. Muallem (2009). "SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels." Nat Cell Biol **11**(3): 337-343.
- Zampighi, G., J. Vergara and F. Ramon (1975). "On the connection between the transverse tubules and the plasma membrane in frog semitendinosus skeletal muscle. Are caveolae the mouths of the transverse tubule system?" J Cell Biol **64**(3): 734-740.
- Zhang, L., J. Kelley, G. Schmeisser, Y. M. Kobayashi and L. R. Jones (1997). "Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane." J Biol Chem **272**(37): 23389-23397.
- Zhang, Y., J. Fujii, M. S. Phillips, H. S. Chen, G. Karpati, W. C. Yee, B. Schrank, D. R. Cornblath, K. B. Boylan and D. H. MacLennan (1995). "Characterization of cDNA and genomic DNA encoding SERCA1, the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for Brody disease." Genomics **30**(3): 415-424.
- Zhou, Y., S. Mancarella, Y. Wang, C. Yue, M. Ritchie, D. L. Gill and J. Soboloff (2009). "The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels." J Biol Chem **284**(29): 19164-19168.

Zhou, Y., P. Srinivasan, S. Razavi, S. Seymour, P. Meraner, A. Gudlur, P. B. Stathopoulos, M. Ikura, A. Rao and P. G. Hogan (2013). "Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry." Nat Struct Mol Biol **20**(8): 973-981.

Zweifach, A. and R. S. Lewis (1995). "Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback." J Gen Physiol **105**(2): 209-226.

Zweifach, A. and R. S. Lewis (1995). "Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms." J Biol Chem **270**(24): 14445-14451.

# Georges Arielle PECHE

## Physiopathologie de la myopathie à agrégats tubulaires

### Résumé

La myopathie à agrégats tubulaires (TAM) est une maladie génétique qui se caractérise par la présence d'agrégats tubulaires dans les biopsies musculaires de patients. Notre équipe a identifié pour la première fois des mutations dans *STIM1* comme étant à l'origine de cette maladie. STIM1 (stromal interaction molecule 1) est le senseur calcique du réticulum sarco/endoplasmique (RE/RS). En effet, en cas de diminution du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le RE/RS, STIM1 se déplie, oligomérisse et migre à proximité de la membrane plasmique (MP) pour activer le canal calcique ORAI1 et permettre le remplissage des stocks. Ce mécanisme est le «store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry» (SOCE). D'autres équipes ont rapporté une mutation dans *STIM1* (p.R304W) conduisant à une TAM associée à d'autres symptômes, ou encore syndrome de Stormorken. Ainsi, ce travail a eu pour but d'étudier et de comparer l'impact des mutations TAM et Stormorken à différents niveaux du SOCE. Nous avons ainsi montré que les mutations TAM et Stormorken conduisent à une augmentation de l'expression de STIM1, à la formation de clusters constitutifs de STIM1 à proximité de la MP, ainsi qu'au recrutement du canal ORAI1 et à l'activation de la voie du NFAT, dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ .

Mots clés : Myopathie à agrégats tubulaires, STIM1, ORAI1, syndrome de Stormorken, Calcium, SOCE.

### Summary

Tubular aggregate myopathy (TAM) is a genetic disorder characterized by tubular aggregates in muscle biopsies of patients. Our team identified for the first time mutations in *STIM1* as causative of this disease. STIM1 (stromal interaction molecule 1) is the main calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sensor of the endo/sarcoplasmic reticulum (ER/SR). Following  $\text{Ca}^{2+}$  depletion of the ER/SR, STIM1 unfolds, oligomerizes and migrates close to the plasma membrane (PM) to activate the  $\text{Ca}^{2+}$  channel ORAI1, leading to  $\text{Ca}^{2+}$  entry. This mechanism is the «store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry» (SOCE). Several teams report a mutation in *STIM1* (p.R304W) leading to TAM associated with other symptoms, described as Stormorken syndrome. Therefore, this work aims to assess and compare the impact of TAM and Stormorken mutations at different stages of the SOCE pathway. We show that TAM and Stormorken mutations lead to an increase expression of the protein, a constitutive STIM1 clustering near the PM, to ORAI1 constitutive recruitment and to the activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pathway: the NFAT pathway.

Keywords: Tubular aggregate myopathy, STIM1, ORAI1, Stormorken syndrome, Calcium, SOCE.